

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

EFFECTO REPELENTE DE LA LOCIÓN A BASE DEL ACEITE ESENCIAL
DE *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (LIMÓN CRIOLLO) CONTRA
MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*

Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS:

Bach. GUADALUPE HUAMAN ARACELI AYMEE

Bach. VELA HOYOS NIXON JAMER

ASESOR:

Dr. BONILLA RIVERA PABLO ENRIQUE

Lima – Perú

2019

Dedicatoria

A Dios y a mis padres, Wuile e Irene por darme su apoyo, cariño y comprensión necesaria para lograr cada pasó que doy en la vida y ser una mejor persona.

A mi hermano, Bill que bien o mal estaba ahí para apoyarme con lo todo lo que necesitaba.

A mi compañero Jamer Vela, que con su perseverancia y empeño me ayudó a lograr una de mis metas.

Araceli Aymee Guadalupe Huaman

A mis padres.

Por darme la oportunidad de crecer bajo su protección y por haberme inculcado de valores, son mi principal fuente de crecimiento personal y profesional.

Mamá, gracias por confiar en mí y darme todo el apoyo que necesito día a día, por corregirme, por hacerme mejor persona, gracias a ti soy lo que soy.

Papá, por inculcarme de valores y predicarme siempre con el ejemplo de padre y persona que eres, por confiar en mí, por tus sabios consejos, por tu amor, Gracias.

A toda mi familia

Que de alguna manera estuvo involucrada en mi desarrollo personal y profesional, gracias, nada de esto hubiese logrado sin ustedes.

A mi compañera Ara, por soportarme durante todo este tiempo y por lograr juntos los objetivos que un día nos trazamos.

Nixon Jamer Vela Hoyos

Agradecimientos

A Dios, por darnos la inteligencia, la salud y guiarnos en cada paso que damos, por la fortaleza espiritual que se necesita en los momentos más difíciles.

A la nuestra casa mater del saber La Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por brindarnos todo el apoyo necesario para la culminación de nuestros estudios.

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, por aceptar ser nuestro asesor, por creer en nosotros e inculcarnos de conocimientos, por tenernos paciencia.

Al Dr. Américo Castro Luna, por brindarnos todo su apoyo en la extracción del aceite esencial y confiarnos las instalaciones de su laboratorio, además de sus sabios consejos; lo llevamos siempre presente.

A la Dra. Nora Herrera, por tenernos paciencia y apoyarnos en la revisión exhaustiva de nuestro proyecto de investigación, además de sus sabias enseñanzas inculcadas en la etapa universitaria.

A todos nuestros amigos que de alguna manera estuvieron involucrados en el desarrollo de esta tesis, a Pamela, Javier y en especial a nuestra amiga en común Elizabeth, por el apoyo moral y ayudarnos en la búsqueda de los excipientes usados en este trabajo.

Araceli Aymee Guadalupe Huaman y

Nixon Jamer Vela Hoyos

Abreviaturas

AE: Aceite esencial

BKC: Cloruro de benzalconio

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

CG: Cromatografía de Gases

CG-EM: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

CMC: Carboximetilcelulosa

DEET: N, N-dietil-meta-toluamida

DEN 1: Dengue tipo 1

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FID: Detector de Ionización de Llama

IR: Espectroscopia Infrarrojo

INS: Instituto Nacional de Salud

LABICER: Laboratorio de Investigación y Certificaciones

LC50: Concentración Letal 50

LC90: Concentración Letal 90

ME: Microencapsulado

NE: No Encapsulado

O/W: aceite en agua

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLISA: Plataforma de Información de Salud de las Américas

RENATU: Laboratorio de Recursos Naturales

SI: Índice de similitud

UNI: Universidad Nacional de Ingeniería

USP: Farmacopea de Estados Unidos

WHOPES: Plan de evaluación de plaguicidas de la OMS

W/O: agua en aceite

UV: Espectroscopía UV-Visible

V/V: Volumen, volumen

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Índice de tablas

Tabla 1. Principales componentes (cáscaras) de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	19
Tabla 2. Métodos analíticos para el control de calidad de aceites esenciales	22
Tabla 3. Relación de la densidad vs el índice de refracción en aceites esenciales. .	24
Tabla 4. Formulación del piloto N° 01	49
Tabla 5. Análisis del control de calidad del piloto N° 01	49
Tabla 6. Formulación del piloto N° 02	50
Tabla 7. Análisis de control de calidad del piloto N° 02	50
Tabla 8. Formulación del piloto N° 03	51
Tabla 9. Análisis de control de calidad del piloto N° 03	51
Tabla 10. Reacciones de coloración y precipitado para determinación de grupos funcionales	53
Tabla 11. Análisis de control de calidad de las formulaciones	61
Tabla 12. Resultados del screening fitoquímico del aceite esencial de limón criollo	62
Tabla 13. Lista de los componentes químicos del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	64
Tabla 14. Clasificación de los compuestos químicos encontrados en el aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.	65
Tabla 15. Estadísticas descriptivas de repelencia y Tiempo de protección eficaz por sujeto.....	71
Tabla 16. Número promedio de mosquitos repelidos por tiempo	71
Tabla 17. Estadísticas descriptivas de la cantidad total de mosquitos repelidos	73
Tabla 18. Estadísticas descriptivas del tiempo de protección eficaz (en minutos)....	76
Tabla 19. Prueba de homogeneidad de varianzas.....	78
Tabla 20. Prueba de Kruskal Wallis	78
Tabla 21. Comparaciones múltiples Games-Howell Total mosquitos repelidos.....	80
Tabla 22. Prueba de homogeneidad de varianzas.....	81
Tabla 23. Prueba de Kruskal Wallis	81
Tabla 24. Comparaciones múltiples Games-Howell	82

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de los principales componentes <i>Citrus aurantifolia</i> S; limoneno (1), β -pineno (2), geraniol (3), neral (4), α -terpineol (5), geranial (6), terpinen-4-ol (7), nerol (8), acetato de geranilo (9), y β -cariofileno (10).	18
Figura 2. Equipo de destilación por arrastre de vapor	20
Figura 3. Equipo Clevenger para hidrodestilación	20
Figura 4. Ciclo de vida del <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 5. Larva de <i>Aedes aegypti</i> y sus partes.....	32
Figura 6. Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	33
Figura 7. Diferencias de hembras (A) <i>Aedes aegypti</i> y (B) <i>Aedes albopictus</i> A) detalle de escamas blancas en forma de “lira” en el dorso torácico y B) detalle de escamas blancas en línea media del dorso torácico.	34
Figura 8. Morfología de <i>Aedes aegypti</i> , macho y hembra	34
Figura 9. Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.	63
Figura 10. Continuación de la Figura 9	63
Figura 11. α -pineno.....	65
Figura 12. canfeno.....	66
Figura 13. β -pineno	66
Figura 14. β -mirceno	66
Figura 15. terpinoleno.....	66
Figura 16. D-limoneno	67
Figura 17. β -cis-ocimeno	67
Figura 18. γ -terpineno.....	67
Figura 19. linalol	67
Figura 20. verbenol.....	68
Figura 21. terpinen-4-ol	68
Figura 22. α -cyclociral	68
Figura 23. α -terpineol	68
Figura 24. decanal.....	69
Figura 25. cis-geraniol	69

Figura 26. β -citronellol	69
Figura 27. cis-citral	69
Figura 28. citral.....	70
Figura 29. cariofileno	70
Figura 30. α -bergamoteno	70
Figura 31. α -farneseno	70
Figura 32. Evolución del número promedio de mosquitos repelidos en los intervalos de exposición	72
Figura 33. Total de mosquitos repelidos.....	74
Figura 34. Evolución del porcentaje de repelencia en los intervalos de exposición .	75
Figura 35. Porcentaje de repelencia total de los tratamientos con respecto al grupo control.....	75
Figura 36. Distribución del tiempo de protección eficaz promedio en minutos	77
Figura 37. Distribución del valor medio del total de mosquitos repelidos por Tratamiento	79

Índice de anexos

Anexo 1. Plantaciones de limón criollo Sayán - Huaura	98
Anexo 2. Limón criollo en la etapa de floración Sayán - Huaura	98
Anexo 3. Árboles de limón criollo seleccionados para la recolección de frutos	99
Anexo 4. Limón criollo en etapa de cuaje Sayán - Huaura	99
Anexo 5. Sr. Pillaca propietario del fundo de dos hectáreas y media del cultivo de limones criollos en Sayán - Huaura.....	100
Anexo 6. Proceso de pelado de los limones.....	100
Anexo 7. Montaje del equipo de destilación por arrastre de vapor de agua – Laboratorio de Recursos Naturales (RENATU) UNMSM.	101
Anexo 8. Dr. Américo Castro Luna, Coordinador de RENATU – UNMSM	101
Anexo 9. Separación de las dos fases; aceite esencial e hidrolato	102
Anexo 10. Proceso pesado en la fabricación de la loción a base de los aceites esenciales	102
Anexo 11. Proceso de filtrado de las lociones preparadas.	103
Anexo 12. Lociones terminadas al 2, 4, 10 y 15 por ciento; y a la izquierda el aceite esencial de limón.....	103
Anexo 13. Constancia del análisis taxonómico del limón criollo	104
Anexo 14. Resultados del screening fitoquímico	105
Anexo 15. Larvas de <i>Aedes aegypti</i> donadas por el INS (izquierda); alimento de larvas (derecha)	105
Anexo 16. Larvario (izquierda); larvas de <i>Aedes aegypti</i> de 6 días de edad aproximadamente.....	106
Anexo 17. Separación de pupas usando pipeta de Pasteur.	106
Anexo 18. Pupas próximas a eclosionar y jaula de eclosión, dentro, especímenes.	106
Anexo 19. Consentimiento informado; voluntario 1.	107
Anexo 20. Consentimiento informado; voluntario 2.	108
Anexo 21. Consentimiento informado; voluntario 3	109
Anexo 22. Consentimiento informado; voluntario 4	110

Anexo 23. Manguera transportadora + lupa (izquierda); proceso del transporte de los especímenes (derecha).....	111
Anexo 24. Jaula zancudera y dentro una ovitrampa (vista superior).	111
Anexo 25. Alimento de especímenes machos, glucosa 10% (izquierda); hematofagia en los voluntarios de las hembras (centro) y mano del voluntario post alimentación (derecha).....	112
Anexo 26. Trampa de oviposición con huevos de <i>Aedes aegypti</i> (izquierda); huevos de <i>Aedes aegypti</i> sumergidos en agua para su eclosión (derecha).	112
Anexo 27. Frascos de exposición.	113
Anexo 28. Exposición de voluntarios (Control negativo C-).....	113
Anexo 29. Especímenes sacrificados (izquierda); proceso de llenado de la ficha de recolección de datos mediante el frotis de sangre (derecha).	114
Anexo 30. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 1.....	114
Anexo 31. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 1.	115
Anexo 32. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 1.	115
Anexo 33. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 1.	116
Anexo 34. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 1.	116
Anexo 35. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 1	117
Anexo 36. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 2.....	117
Anexo 37. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 2.	118
Anexo 38. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 2.	118
Anexo 39. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 2.	119
Anexo 40. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 2.	119
Anexo 41. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 2.	120
Anexo 42. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 3.....	120
Anexo 43. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 3.	121
Anexo 44. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 3.	121
Anexo 45. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 3.	122
Anexo 46. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 3.	122

Anexo 47. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 3.	123
Anexo 48. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 4.....	123
Anexo 49. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 4.	124
Anexo 50. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 4.	124
Anexo 51. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 4.	125
Anexo 52. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 4.	125
Anexo 53. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 4.	126
Anexo 54. Diagrama del planteamiento del problema.	126
Anexo 55. Diagrama de la extracción del aceite esencial.....	127
Anexo 56. Diagrama de elaboración de las formas farmacéuticas.....	128
Anexo 57. Diagrama de la obtención del <i>Aedes aegypti</i>	129
Anexo 58. Diagrama del Test de repelencia.....	130
Anexo 59. Matriz de consistencia	131
Anexo 60. Autorización de la donación de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , INS.....	132
Anexo 61. Formulario de salida de <i>Aedes aegypti</i> , INS	133
Anexo 62. Solicitud para la donación del material biológico presentado al INS	134
Anexo 63. Recibo digital turnitin.	135
Anexo 64. Informe del programa turnitin.....	136

Resumen

Se investigó el efecto repelente del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, en mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. El aceite esencial se obtuvo a partir de las cáscaras frescas del limón criollo mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua, los compuestos fitoquímicos se detectaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS). Se formularon cuatro lociones a diferentes concentraciones, 2%, 4%, 10% y 15% (v/v) del aceite esencial. El efecto repelente se realizó mediante el método de cebo humano, en cuatro voluntarios hombres y mujeres de 18 y 28 años de edad. El método consiste en exponer el antebrazo izquierdo de cada voluntario a los mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti* en estado de inanición de entre 3 y 6 días de edad criadas en cautiverio. Además se realizó un comparativo de las lociones preparadas del aceite esencial con un repelente comercial a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET). Los resultados evidenciaron: La presencia de compuestos tipo terpenoides (monoterpenos: hidrocarburos y fenólicos) y (sesquiterpenos: hidrocarburos); las lociones al 2%, 4%, 10% evidenciaron tener efecto repelente ($p < 0.05$), con tiempos de protección eficaz de 60, 120 y 157.5 minutos respectivamente, excepto la loción al 15% la cual no evidenció un efecto significativo; los resultados de la comparación evidenciaron una diferencia significativa y positiva a favor de DEET ($p < 0.05$). Se concluye que la loción al 10% tiene buen efecto repelente, sin embargo no mayor que el repelente comercial.

Palabras clave: *Citrus aurantifolia*, *Aedes aegypti*, CG-MS, aceite esencial, efecto repelente.

Abstract

The repellent effect of the essential oil of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle was investigated in mosquitoes of the *Aedes aegypti* species. The essential oil was obtained from the fresh peels of the Creole lemon by means of the steam distillation of water, the phytochemical components were detected by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS). Four lotions were formulated at different concentrations, 2%, 4%, 10% and 15% (v / v) of the essential oil. The repellent effect was performed by the human bait method, in four male and female volunteers aged 18 and 28 years. The method consists of exposing the left forearm of each volunteer to the female mosquitoes of the *Aedes aegypti* species in a state of starvation between 3 and 6 days of age bred in captivity. Furthermore, the lotions prepared from the essential oil was compared with a commercial repellent based on DEET. The results depicted that: The presence of terpenoid compounds (monoterpenes: hydrocarbons and phenolics) and (sesquiterpenes: hydrocarbons), lotions at 2%, 4%, 10% depicted a repellent effect ($p < 0.05$), with effective protection times of 60, 120 and 157.5 minutes respectively, except the 15% lotion which did not display a significant effect; the results of the comparison showed a significant and positive difference in favor of N, N-diethyl-meta-toluamida (DEET) ($p < 0.05$). In conclusion, the 10% lotion exhibits an efficiently repellent effect, although no greater than the commercial one.

Keywords: *Citrus aurantifolia*, *Aedes aegypti*, GC-SM, essential oil, repellent effect.

Índice

Acta de sustentación

Dedicatoria

Agradecimiento

Abreviaturas

Índice de tablas

Índice de figuras

Índice de anexos

Resumen

Abstract

Índice

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	1
1.2 Formulación del problema	2
1.2.1 Problema General.....	2
1.2.2 Problemas específicos.....	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Justificación e importancia del estudio	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes del estudio	5
2.1.1 Nacionales	5
2.1.2 Internacionales	7
2.2 Bases Teóricas.....	13
2.2.1 <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle (limón criollo)	13
2.2.2 Aceites esenciales	15
2.2.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales	19

2.2.4	Métodos analíticos para el control de calidad de aceites esenciales	22
2.2.5	Repelentes.....	27
2.2.6	Historia de los repelentes	27
2.2.7	Clasificación de los repelentes	27
2.2.8	Vectores que transmiten enfermedades	29
2.2.9	Mosquitos transmisores de enfermedades	29
2.2.10	Animales de experimentación.....	34
2.2.11	La piel y sus características.....	36
2.2.12	Formas farmacéuticas	36
2.2.13	Formas farmacéuticas de aplicación sobre piel y mucosas	36
2.2.14	Formas farmacéuticas líquidas de uso tópico.....	37
2.2.15	Forma farmacéutica mejor aplicada en repelentes	38
2.3	Hipótesis	39
2.3.1	Hipótesis general	39
2.3.2	Hipótesis específicas	39
2.4	Variables	39
2.4.1	Variable independiente	39
2.4.2	Variable dependiente.....	39
2.4.3	Operacionalización de variables	40
2.5	Marco Conceptual	41
CAPÍTULO III: MÉTODO.....		43
3.1	Tipo de estudio.....	43
3.2	Diseño a utilizar.....	43
3.3	Población	43
3.3.1	Población del material vegetal.....	43
3.3.2	Población del material biológico	44
3.3.3	Población de voluntarios.....	44
3.4	Muestra	44
3.4.1	Muestra del material vegetal.....	44
3.4.2	Muestra del material biológico	44
3.4.3	Muestra de los voluntarios.....	44
3.5	Equipos, materiales y reactivos.....	45

3.5.1	Equipos.....	45
3.5.2	Materiales	45
3.5.3	Reactivos.....	46
3.6	Procedimientos.....	47
3.6.1	Recolección y clasificación taxonómica de la especie vegetal	47
3.6.2	Extracción del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	47
3.6.3	Rendimiento del aceite esencial	48
3.6.4	Pre formulación de la forma farmacéutica	48
3.6.5	Formulación de las lociones a partir del aceite esencial de limón	52
3.6.6	Identificación de metabolitos secundarios del aceite esencial de limón	53
3.6.7	Obtención y crianza de los mosquitos de <i>Aedes aegypti</i>	54
3.6.8	Proceso de separación de las hembras de <i>Aedes aegypti</i>	56
3.6.9	Selección de las hembras de <i>Aedes aegypti</i> , ávidas de alimento.	57
3.6.10	Unidades experimentales del estudio	57
3.6.11	Preparación de la zona de exposición	58
3.6.12	Bioensayo de laboratorio	58
3.6.13	Análisis del tiempo de protección eficaz	59
3.6.14	Determinación del porcentaje de repelencia.....	59
3.7	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	59
3.8	Procesamiento de datos.....	60
CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		61
4.1	Presentación de resultados.....	61
4.1.1	Extracción y rendimiento del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.....	61
4.1.2	Control de calidad de las lociones preparadas	61
4.1.3	Screening fitoquímico del aceite esencial de limón	62
4.1.4	Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM).....	63
4.1.5	Espectro y estructura química de los componentes encontrados en el aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	65
4.1.6	Resultados del test de repelencia.....	71
4.2	Contrastación de hipótesis	77
4.2.1	Cantidad promedio de mosquitos repelidos.....	77
4.2.2	Tiempo de protección eficaz.....	80

4.3	Discusión de los resultados.....	83
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		86
5.1	Conclusiones.....	86
5.2	Recomendaciones.....	87
REFERENCIAS.....		88
ANEXOS		98

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción de la realidad problemática

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce al mosquito hembra de *Aedes aegypti* como el vector principal causante del dengue (DEN 1 – DEN 4). Estos mosquitos también transmiten la fiebre chikungunya, la fiebre amarilla y la infección por el virus de Zika.(1)

Solo en el 2017, la Plataforma de Información en Salud de las Américas (PLISA) reportó un total de 584,165 casos de dengue y dengue grave, además de 306 personas fallecidas para Las Américas, en la subregión andina. El Perú se ubica en el primer lugar con 76,093 casos de dengue, seguido por Colombia y Ecuador con 26,279 y 11,387 de casos totales respectivamente.(2) En nuestro país, las regiones que presentaron más casos de dengue en el 2017 fueron: Piura, La Libertad, Tumbes, Ica, Ancash, y Lambayeque, esto es debido al fenómeno “El Niño” que azotó con más fuerza a éstas regiones.(3)

El dengue, es la enfermedad transmitida por los vectores más importantes de Las Américas. Se desarrolla principalmente en las zonas urbanas reemergentes con mala calidad de vivienda, dificultoso acceso al agua potable, mal manejo de desechos sólidos, limitada integración de la población a programas sociales de prevención, laboratorios no implementados para la detección temprana del virus y personal poco capacitado en zonas de alto riesgo.(4)

La OMS plantea tres tipos de estrategias de lucha para el control de vectores, entre ellas la gestión ambiental, control químico y control biológico. Para el control químico se recomienda uso de larvicidas para tratar hábitats larvarios de *Aedes aegypti*, imagocidas para mosquitos adultos con la finalidad de reducir la densidad y longevidad de los mismos y solo como complemento al control ambiental en casos de emergencia.(1)

Las soluciones de Temefos 1 mg/L, Metopreno 1 mg/L, Piriproxifen 0.01 mg/L, *Bacillus thuringiensis israelensis* 1-5 mg/L, son larvicidas recomendados por la OMS, que pueden aplicarse incluso en aguas para el consumo humano. También se usan insecticidas para el control de vectores adultos, como organofosforados y piretroides

solo para mencionar algunos de ellos, Fenitrothion, Malathion, Pirimifos metil y Biorresmetrin, Cyflutrina, Cipermetrina, Etofenprox, respectivamente. Cabe recalcar el alto grado de toxicidad de los mismos por lo que se recomienda el buen estado y calibración apropiada de los equipos para su correcta aplicación.(5)

Otras medidas de protección contra el *Aedes aegypti* son el uso de repelentes sintéticos especialmente los que contienen N, N-dietil-meta-toluamida (DEET) (25,15, 7.7 y 5%) y Picaridina (16%) con tiempos de protección entre 1 y 6 horas aproximadamente, siendo uno de los más eficaces el DEET al 25% con tiempo de protección > 6 horas, sin embargo, a concentraciones menores el tiempo de protección disminuye.(6)

Los aceites esenciales son una potencial alternativa en la lucha por atenuar las enfermedades transmitidas por vectores, ya sea como repelentes o larvicidas considerando su reducida toxicidad y limitado impacto sobre el medio ambiente, su bajo costo y fácil acceso a ellos, además pueden ser muy eficaces sin necesidad de obtener un activo químicamente puro, se ha demostrado que incrementan sus efectos sinérgicamente entre sus componentes o las mezclas de los mismos pueden incluso llegar a reemplazar a los repelentes sintéticos de uso frecuente.(7) Este trabajo tiene la finalidad de usar el aceite esencial de limón criollo como una alternativa a los repelentes a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET), a un costo menor, fácil acceso y principalmente dirigido a las personas que buscan repelentes naturales.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

1. ¿Tendrá actividad repelente la loción elaborada a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** contra mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Qué tipos de metabolitos secundarios estarán presentes en el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle?
2. ¿Cuál será el efecto repelente de la loción elaborada a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** contra los mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***?
3. ¿La loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** será tan efectiva como la loción a base de N, N-dietil-*meta*-toluamida (DEET)?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

1. Evaluar la actividad repelente de la loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** contra mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle**.
2. Preparar una loción a partir del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** y determinar su efecto repelente contra los mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***.
3. Determinar la actividad repelente de la loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** en comparación con la loción repelente a base de N, N-dietil-*meta*-toluamida (DEET).

1.4 Justificación e importancia del estudio

El desarrollo de este proyecto nos lleva a plantear nuevas soluciones a problemas que aquejan a gran parte de la población de escasos recursos económicos y con poco acceso a sistemas preventivos de salud. Además de plantear una solución viable y eficaz como la que nos brindan los productos de origen botánico, abriendo así el camino para futuras investigaciones donde se aíse el o los activos responsables de la acción repelente y aplicarlos a nivel industrial, con la posibilidad de poder expendirse en establecimientos farmacéuticos, a bajos costos, y de alguna manera reemplazar los activos sintéticos que se usan hoy en día como el N, N-dietilmeta-toluamida (DEET), que a altas concentraciones y frecuentes exposiciones pueden alterar el equilibrio normal de la piel y así mismo estar expuestos a futuras patologías.(8)

Los aceites esenciales se están usando como repelentes de mosquitos en países como España y los EE.UU., por mencionar un ejemplo los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en Inglés) mencionan entre la lista de repelentes eficaces y seguros, al aceite esencial de eucalipto de limón.(9)

Por lo que se ha creído conveniente usar el aceite esencial de limón criollo, ya que posee diversos usos en la medicina tradicional, entre ellos la actividad repelente; además de ser accesible, económico y de fácil extracción, sería una excelente alternativa para prevenir las enfermedades transmitidas por vectores, entre la más importante, el dengue.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

2.1.1 Nacionales

Dávila C (2016). “**Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia *Culicidae*”** tuvo como objetivo evaluar la actividad repelente de *Minthostachys mollis* Grisebach (muña), mediante la formulación de una crema para repeler insectos. La extracción del aceite esencial se realizó mediante destilación por arrastre de vapor, a partir del cual prepararon soluciones al (10, 15 y 20% v/v en aceite mineral cosmético USP), además formularon una crema al 10%, para el test de repelencia “in vitro” según método propuesto por Talukder y Howse. Concluyendo que tanto los aceites esenciales extraídos de *Minthostachys mollis* Grisebach (muña) y la crema al 10% presentan actividad repelente frente a zancudos de la familia *Culicidae*.(10)

Otiniano G y Roldan J. (2014). “**Actividad repelente y tiempo de protección experimental del aceite del endospermo de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) en *Aedes aegypti*”** tuvieron como objetivo determinar la actividad repelente y el tiempo de protección del aceite esencial del endospermo de *Ricinus communis* en *Aedes aegypti*. El aceite esencial se extrajo por el método de soxhlet con solvente hexano a 85- 86 °C. Prepararon soluciones al 25, 50, 75 y 100% v/v en etanol al 98.6%. Para el test de repelencia emplearon especímenes hembras de la especie *Aedes aegypti* cepa Rockefeller (control), una población experimental natural procedente de La Esperanza (Trujillo, Perú) de 3 - 8 días de edad, en estado de inanición durante tres días y especímenes adultos de conejo, *Oryctolagus cuniculus*. En las orejas, se aplicó 1 mL/22.5 cm² del aceite a las concentraciones señaladas y se utilizó 50 especímenes por cada concentración, además de los grupos control positivo de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET al 20%) y negativo (diluyente: Etanol). La exposición se realizó durante tres minutos a intervalos de 30 min, hasta que se produzca la primera picadura. El ensayo se realizó en cuatro repeticiones,

evaluándose el porcentaje de repelencia y el tiempo de protección. Concluyendo que, el aceite del endospermo de *Ricinus communis* tiene actividad repelente en todas las concentraciones y la mayor actividad repelente se obtuvo sobre la población natural a la mayor concentración experimentada, con un tiempo de protección de 180 minutos.

La actividad repelente, se debería a las moléculas flavonoides: quercetina, quercitrina y rutina presentes en el extracto hidroetanólico de las hojas de *Ricinus communis*; entre otras sustancias químicas que generarían cierto rechazo frente a los mosquitos de *Aedes aegypti* están los ácidos linoleico y oleico abundantes en el aceite esencial.(11)

Díaz A. (2008). **“Caracterización de los componentes volátiles del aceite esencial de la lima (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle)”** tuvo como objetivo determinar los principales componentes del aceite esencial extraído de las cáscaras de la fruta fresca de la lima cambray, por el método de arrastre de vapor de agua. La separación de sus componentes mayoritarios se realizó mediante Cromatografía en columna y la caracterización e identificación de sus componentes principales se realizó mediante cromatografía de gases (CG), cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS), espectroscopias IR y UV. Para la elucidación estructural de los componentes mayoritarios se emplearon los espectros UV, IR, CG-EM, RMN-¹H y RMN-¹³C. Se identificaron 9 componentes principales, de los cuales los mayoritarios fueron: limoneno (60.34%), acetato de linalilo (22.99%), β-pineno (5.08%), β-mirceno (5.08%) y (Z)-β-ocimeno (1.40%) además características físicas como: gravedad específica promedio 0.85088, Índice de refracción en la línea D del sodio entre 1.4679 – 1.4705 y el porcentaje de residuo de evaporación igual a 2.15%, indicadores de la calidad del aceite esencial.(12)

Baca L y Yábar F. (2016). **“Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cimnopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano), *Citrus aurantifolia* Swingle (limón) y *Citrus sinensis* (naranja), frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans*, cusco 2016”** tuvieron como objetivo determinar el efecto antibacteriano de los

aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Cymbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano), *Citrus aurantifolia* Swingle (limón) y *Citrus sinensis* (naranja), en comparación con gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los aceites esenciales (AE) se obtuvieron por el método de destilación por arrastre de vapor. El examen microbiológico se realizó a una concentración del 100% para todos los aceites esenciales; en medios de cultivos Agar Müller Hinton enriquecido con 5% de sangre humana, estos AE fueron comparados con un patrón control que fue el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%. Para cada tipo de AE se realizaron tres repeticiones usando el método Kirby Bauer o método de difusión de discos, donde se incorporó 10uL de cada aceite esencial y del patrón control sobre las cepas de *Streptococcus mutans*. Para determinar la efectividad antibacteriana se midió los halos de inhibición a las 24 horas. Donde concluyen que los aceites esenciales de *Cymbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano), *Foeniculum vulgare* (hinojo) y *Citrus sinensis* (naranja) presentan mayor efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mientras que el aceite esencial *Citrus aurantifolia* Swingle (limón) no presenta efecto antibacteriano. (13)

2.1.2 Internacionales

Misni N et al. (2017). “**Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites**” tuvieron como objetivos formular una loción repelente y evaluar su efecto de los aceites microencapsulados (ME) y no encapsulados (NE) de *Alpinia galanga* (frutos), *Citrus grandis* (rizomas) y *Citrus aurantifolia* (hojas) y comparar con un repelente a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET) contra *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio.

Los aceites esenciales se extrajeron mediante hidrodestilación con un aparato tipo Clevenger y secados con sulfato de magnesio anhidro. Tanto los aceites esenciales y el DEET, se formularon en lociones al (5, 10,15 y 20% p/v) y se microencapsularon mediante la técnica química de precipitación interfacial, que consiste en hacer reaccionar la macromolécula anfifílica carboximetilcelulosa (CMC) con el reactivo

complementario cloruro de benzalconio (BKC), formando una loción microencapsulada (ME). Además formularon otra loción no encapsulada (NE), todas las formulaciones preparadas se evaluaron por su actividad repelente contra *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio, también realizaron evaluaciones de campo en tres sitios distintos de la Península de Malasia, para comparar con repelentes comerciales entre ellos Citriodiol® (Mosiquard®) y los repelentes a base de citronela (KAPS®, MozAway® y BioZ Natural®).

Donde concluyen que: todos los aceites esenciales investigados tienen actividad repelente y potencian sus efectos al ser microencapsulados. Sin embargo estos siguen teniendo menor efecto que la loción microencapsulada de a base de DEET, pero tuvieron el mismo efecto que los repelentes comerciales como Citriodiol® (Mosiquard®), por lo tanto este aceite esencial puede ser comercializado como un repelente de origen vegetal.(13)

Hazarika S et al (2012). “**Repellent Activity of Some Essential Oils Against *Simulium* Species in India**”. Evaluaron la actividad repelente de 5 aceites esenciales, extraídos por destilación con vapor de agua con el equipo de Clevenger, se usaron las especies vegetales *Homalomena aromatica* Schott (rizomas), *Pogostemon heyneanus* Bentham (hojas), *Citrus aurantifolia* Swingle (hojas), *Vitex negundo* L. (hojas) y *Ageratum conizoides* L. (hojas) contra moscas negras de la especie *Simulium*, en la India. Los AE extraídos se diluyeron en aceite de girasol a concentraciones de 5, 7.5 y 10%. Para el test de repelencia usaron 6 voluntarios (3 hombres y 3 mujeres) entre los 18 y 50 años, no fumadores, no alcohólicos, y sin antecedentes conocidos a reacciones alérgicas por picadura de insectos, ni a los aceites esenciales. Para la prueba de repelencia se les aplicó 1.2 y 2.5 mL de la fórmula tanto en brazos como en las piernas respectivamente, previa desinfección de la piel, con alcohol. Cada una de las concentraciones formuladas se aplicaron a cada voluntario, y a un hombre y una mujer, se les aplicó solamente aceite de *Helianthus annus* (girasol) que sirvieron como grupo control. Todos los voluntarios se expusieron sentados, exponiendo el área tratada y separados a una distancia de 4 metros uno del otro. El tiempo de transcurrido hasta las dos primeras mordeduras consecutivas

que ocurrieron en el plazo de 30 minutos fue considerado como el tiempo de protección completo. Obteniendo como resultados que los aceites esenciales de *Homalomena aromatica*, *Vitex negundo* y *Ageratum conizoides*, proporcionaron una protección mayor a 2 horas a una concentración del 5% y una protección mayor a 5 horas a una concentración del 10%. Cabe recalcar que pasadas las 6 h de aplicación mantenían su efecto pero se redujeron a la mitad con la concentración más baja, al 10% seguían manteniendo un efecto al 90%, entre otros resultados los aceites esenciales de *P. heyneanus* y *C. aurantifolia*, pasadas las 2 h, a una concentración del 5% redujeron su actividad repelente a 88.42% y 85.26% respectivamente. Concluyen que el estudio proporciona evidencia del potencial de estos aceites esenciales en el desarrollo de nuevos repelentes contra las moscas negras.(14)

Effiom O et al (2012). **“Mosquito Repellent Activity of Phytochemical Extracts from Peels of Citrus Fruit Species”**. Se investigó la actividad repelente de mosquitos de los extractos fitoquímicos de las cáscaras de cinco especies de cítricos, *Citrus sinensis*, *Citrus limonum*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus reticulata* y *Citrus vitis*. Los extractos fitoquímicos volátiles se obtuvieron de las cáscaras de frutos secos al aire y sometidas a un proceso de pulverización para luego ser extraídas mediante Soxhlet y dietil éter como disolvente. Se prepararon cinco concentraciones diferentes al 5, 10, 15, 20 y 25% (v/v) de cada uno de los extractos, los mismos que se aplicaron sobre la piel descubierta (piernas, brazos y cara) de los 50 voluntarios elegidos al azar entre hombres y mujeres, previa firma de su consentimiento, además a 5 no se les aplicó el tratamiento los cuales sirvieron como grupo control; dichos estudios se realizaron por repetido en tres distintos lugares de Nigeria. Las observaciones se registraron a intervalos de 30 minutos. Teniendo como resultados que todos los extractos de los diferentes cítricos estudiados produjeron actividad repelente, excepto las preparaciones al 5 y 10% que no presentaron repelencia alguna. Los extractos preparados al 15% presentaron un efecto repelente de corta duración (menores a 1 h). Los efectos repelentes más pronunciados se presentaron a concentraciones elevadas (de 20% y 25%) con una duración del efecto mayores a 2 h y 5 h respectivamente. Concluyendo que los extractos fitoquímicos extraídos de las cáscaras de los cítricos antes mencionados son efectivos como repelentes de

mosquitos a concentraciones razonables. Sin embargo algunos voluntarios presentaron leves efectos adversos, como rash cutáneo y estornudos.(15)

Adusei-Mensah F et al. (2014). “**Comparative Evaluation of the Insecticidal and Insect Repellent Properties of the Volatile Oils of *Citrus aurantifolia* (Lime), *Citrus sinensis* (Sweet Orange) and *Citrus limon* (Lemon) On *Camponotus Nearcticus* (Carpenter Ants)**”. Estudiaron la actividad repelente y letal de los Aceites volátiles extraídos por destilación con arrastre de vapor, de las cáscaras de naranja dulce (*Citrus sinensis*), lima (*Citrus aurantifolia*) y limón (*Citrus limon*) y se evaluaron comparativamente en hormigas carpinteras (*Camponotus nearcticus*).

La actividad repelente se probó a una concentración del 2% p/v, con una versión modificada del método de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la prueba de repelente de mosquitos; obteniendo como resultados que los extractos tienen una buena actividad repelente en las hormigas ensayadas, *C. sinensis* registró la actividad más baja de 82.5% y *C. limon* registró la actividad más alta de 95.0%, sin guardar relación con la concentración de D-limoneno.

La actividad letal se determinó usando alícuotas de 2 mL a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80% p/v del aceite volátil en acetona. Esta actividad se determinó mediante un análisis Probit. Concluyendo que *C. aurantifolia* presenta la mayor actividad letal, y la menor para *C. sinensis*, y están relacionadas directamente a la concentración de D-limoneno. Además se ejecutó un experimento por duplicado junto con controles negativos y positivos para reducir cualquier falso positivo. La concentración letal (LC50) para *C. aurantifolia*, *C. limon* y *C. sinensis* fueron 4.54%, 6.95% y 17.02% respectivamente. Los valores de LC99 para *C. aurantifolia*, *C. limon* y *C. sinensis* fueron 86.01%, 71.01% y 66.43% respectivamente.(16)

Misni N et al (2016). “**New Candidates for Plant-Based Repellents Against *Aedes aegypti***” Tuvieron como objetivo estudiar el uso de nuevas especies etnobotánicas contra la picadura de mosquitos, en el Distrito de Kota Tinggi, estado de Johor, Malasia. Las especies vegetales utilizadas para dicho estudio, *Citrus aurantifolia* (hojas), *Citrus grandis* (cáscara de fruta) y *Alpinia galanga* (rizoma), se procesaron

por hidrodestilación para obtener los aceites esenciales. Posteriormente formularon lociones usando un proceso de microencapsulación y evaluar el efecto repelente contra *Aedes aegypti*. También prepararon bajo la misma formulación un repelente a base de DEET para ser usado como control. Otros cuatro repelentes comerciales naturales (KAPSH®, MozAwayH®, BioZ NaturalH® y MosiquardH®) también se incorporaron en el bioensayo para ser utilizados con fines comparativos. Concluyendo que con una concentración del 20%, todas las formulaciones repelentes demostraron una protección completa durante 2 h y un 90% durante 4 h después de la aplicación. La formulación basada en *A. galanga*, proporcionó el mayor nivel de protección (98.91%), que se extendió durante 4 h después de la aplicación y no fue significativamente diferente de DEET en una concentración similar. En comparación con los repelentes comerciales basados en plantas (KAPSH®, MozAwayH® y BioZ NaturalH®), las 3 formulaciones mostraron una protección significativamente mayor contra las picaduras de *Aedes aegypti*, proporcionando un 90% de protección durante 4 h. Concluyendo que las 3 formulaciones de loción a base de plantas, proporcionaron niveles aceptables de protección contra *Aedes aegypti*.(17)

Kiplang'at K y Mwangi R. (2013) "**Repellent Activities of *Ocimum basilicum*, *Azadirachta indica* and *Eucalyptus citriodora* Extracts on Rabbit Skin against *Aedes aegypti***". Tuvieron como objetivo evaluar la actividad repelente contra mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, los extractos de *Ocimum basilicum* (albahaca dulce), *Azadirachta indica* (Neem) y *Eucalyptus citriodora* (eucalipto de limón). Prepararon diferentes concentraciones de los aceites esenciales usando vaselina pura Jelly®; para el test de repelencia, utilizaron mosquitos hembras, hambrientas criadas bajo condiciones de laboratorio de la especie *Aedes aegypti*, sobre la piel de conejos. La recolección de datos se realizó bajo parámetros de observación basados en la frecuencia del aterrizaje de los mosquitos y la voracidad de sangre. El extracto de oleorresina cruda sinergizada del repelente de mosquitos Piretro y Ballet®, se incluyó como control positivo y la vaselina pura de petróleo® como control negativo. Los resultados mostraron que la oleorresina de Piretro sinergizada produjo una protección completa al 0,1% en comparación con el aceite

de eucalipto de limón y el aceite de albahaca dulce al 2 y 3% respectivamente. Los aceites de Neem y de Ballet® no proporcionaron protección completa. El porcentaje de repelencia del aceite de Neem al 5% fue 84.21 y el de Ballet® 66.84. Concluyen que los aceites de Eucalipto de limón y albahaca dulce pueden ser alternativos al Piretro como repelentes de mosquitos de origen vegetal.(18)

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limón criollo)

A. Generalidades del limón

Los limones criollos se cree que son originarios de los archipiélagos del Oeste de la India, otros nombres con los que son comúnmente conocidos a nivel mundial son: “Mexican”, “Key”, “Tahiti”, “Persian” y “Bearss”.(19) Es un árbol pequeño que puede crecer hasta 5 m de alto, muy ramificado con ramas espinosas. Las hojas tienen peciolos cortos y alados. La lámina ovalada a oblonga, de bordes crenulados que mide entre 5 a 7 cm de largo. Las flores son pequeñas, blancas en el botón. El cáliz y la corola se forman de 4 a 5 partes cada una, predominando el primer número. Los estambres son numerosos, de 20 a 25; el ovario de 9 a 12 celdas. El fruto es por lo general pequeño, de 2 a 5 cm de largo, muy grueso de 1.5 cm de ancho y suave; la pulpa es sólida, amarillenta o rojiza; las semillas amarillentas, monoembriónicas.(20)

El limón criollo crece a una temperatura mínima de 17.6 °C y una máxima de 38.6 °C siendo la óptima entre 22 °C a 28 °C, se estima que la altitud óptima para su cultivo es de 20 a 900 m.s.n.m., pero puede producirse a alturas mayores a 1,000 m.s.n.m.(21)

En el Perú se cultiva este cítrico en las regiones de Amazonas, Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Huánuco, Junín, Ica, La Libertad, Lambayeque, Lima, Loreto, Madre de Dios, Moquegua, Pasco, Piura, Puno, San Martín, Tumbes y Ucayali. Los principales mercados del mundo a los cuales se exporta este cítrico son: Chile, Panamá, EE.UU., Bélgica, Ecuador, España, Países Bajos, Suecia y Nicaragua.(22)

B. Clasificación taxonómica

Se determinó mediante el sistema de clasificación de Cronquist (1988); según el documento emitido por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **Anexo 13**

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: RUTACEAE

GÉNERO: *Citrus*

ESPECIE: *Citrus aurantifolia* (Christm.)
Swingle

Nombre vulgar: "limón criollo"

Determinada por: Blgo. Mario Benavente Palacios.

C. Usos en la medicina tradicional

Entre los usos comunes están la propiedad emenagoga, tranquilizante para los nervios, anticonceptiva, para el aborto, malestar del embarazo, dismenorrea, reumatismo, mordedura de perro, picadura de alacrán y de mosquitos. Es utilizada en trastornos del aparato digestivos como: acidez estomacal, diarreas, disentería, dolor de estómago, problemas hepáticos, fiebre tifoidea, vómito. En problemas respiratorios como: catarro, dolor de garganta y gripe. Para la elaboración de los remedios caseros son usadas diferentes partes del vegetal como hojas, flores, frutos y el sumo, pueden ser preparadas de diversas maneras como infusiones, gargarismos, emplastos entre otros.(23)

D. Valor agregado del limón y sus derivados para uso industrial

Entre los principales productos derivados del limón, producidos para la industria están la cáscara deshidratada, cáscara fresca, jugos clarificado y turbio, aceite centrifugado y destilado, el rendimiento aproximado para obtener el aceite esencial es de 2.7 kg/t, de limón fresco procesado.(24) El Perú exporta aceite esencial de limón a diferentes países del mundo como Canadá, Francia, Alemania, Irlanda, Japón, México, Holanda, Reino Unido y EE.UU., el 2017 nuestro país exportó un total de 516,216 kg con un promedio mensual de 43,019 kg, siendo El Reino Unido el país que más compró el año 2017; la región Piura es el principal productor del preciado fruto.(25)

2.2.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales, son compuestos aromáticos responsables de las fragancias extraídas de las flores, hojas, frutos, raíces u otros órganos de las plantas, se obtienen generalmente por arrastre de vapor de agua, expresión del pericarpio en el caso de cítricos, entre otros métodos; están presentes en muchas especies botánicas pero abundantes en coníferas, lamiáceas, opiáceas, mirtáceas, rutáceas y asteráceas, su principal función en las plantas es de repeler insectos y herbívoros pero atractivos aromáticos para los polinizadores.(26)

A. Características de los aceites esenciales

Los aceites esenciales por lo general constituyen el 0.1 y 1.0% del peso seco de la planta, son poco solubles en agua, pero si en alcoholes y solventes orgánicos; frescos y a temperatura ambiente, son de color blanco, al oxidarse cambian a amarillentos por el proceso de resinificación, sin embargo se puede contralar si se almacenan en envases de vidrio de color ámbar, herméticos y llenos en su totalidad para evitar que el oxígeno del espacio lo descompongan.(26) Estas sustancias aromáticas por lo general se sintetizan en las células excretoras de las plantas y se extraen de flores, frutos, semillas, yemas, hojas, cortezas o como es el caso del aceite esencial de limón, abundan en la piel del fruto o flavedo. Todos estos aceites por lo general son siempre solubles en etanol.

“Los aceites esenciales son mezclas de sustancias orgánicas de diversas series químicas (alifáticas, aromáticas, terpénicas, y a veces isocíclicas y heterocíclicas) y cada uno posee características que le confieren sus componentes”. Los aceites esenciales obtenidos por métodos físicos adecuados y completos en su composición se pueden denominar como “*oficinales*”, pero cambian si sufren modificaciones ya sea con fines de obtener derivados o mejorar sus características iniciales y se les puede llamar:

- ***Aceites esenciales rectificados***, que se obtienen por destilación de un aceite esencial oficial.
- ***Aceites esenciales concentrados***, principalmente es la eliminación de terpenos y sesquiterpenos del aceite original con la finalidad de mejorar su estabilidad y evitar posibles olores desagradables e incluso potenciar sus características aromáticas y conservación
- ***Aceites esenciales concretos***, por lo general se extraen de flores frescas o secas pero usando disolventes orgánicos los mismos que se evaporan para dar lugar a una masa aromática, mezclada con ceras y pigmentos.
- ***Aceites esenciales absolutos***, se obtienen a partir de los aceites esenciales concretos pero eliminando las ceras, pigmentos y compuestos no aromáticos.(27)

B. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican químicamente en cuestión de sus componentes mayoritarios, por ejemplo monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides; también se pueden clasificar según su origen y pueden ser: naturales si se obtienen directamente del material vegetal sin sufrir modificaciones físicas o químicas, la desventaja es su elevado costo; artificiales si tienden a enriquecerse con una o más sustancias, para mencionar un ejemplo la esencia de anís enriquecida con anetol; sintéticos si se obtienen mediante síntesis química y son más económicos, generalmente usados como saborizantes y aromatizantes en la industria alimentaria y cosmética (esencias de limón, vainilla, fresa, etc.).(28)

Otra manera de clasificarlos es según el grupo funcional que estos posean como por ejemplo:

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, tujona)
- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo)
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β -pineno)

C. Composición química de los aceites esenciales

Por lo general son mezclas complejas de constituyentes y casi en su totalidad terpenos, en menor medida aromáticos derivados del fenilpropano como aldehído cinámico, eugenol, anetol, aldehído anísico y safrol, entre otros. En otros casos son derivados de heterósidos como el de las almendras amargas y mostaza.

Los compuestos terpénicos están formados por unidades de isopreno (5 C), que pueden ser monoterpenos (10 C) y sesquiterpenos (15 C). Estos a su vez pueden ser, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, además de oxigenados y no oxigenados. Algunos aceites son casi monomoleculares, pero en su mayoría son polimoleculares, puesto que contienen 3 a 4 moléculas mayoritarias, un cierto número de moléculas minoritarias y trazas de centenares de moléculas diferentes.(26)

D. Composición química del aceite esencial de limón

Entre los principales componentes del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, según grupos funcionales, están los hidrocarburos terpénicos (94%), aldehídos (3.22%), ésteres (1.20%), alcoholes (0.44%), entre otros (1.14%) Según Albaladejo Q. (1999) (29). Se extrajeron los aceites esenciales de hojas y epicarpio de *Citrus aurantifolia* (Christm.)Swingle, por hidrodestilación, los componentes químicos se determinaron por CG y CG - M, los resultados mostraron un rendimiento de aceite esencial tanto para hojas y epicarpio de 0.61 y 0.36% respectivamente. Los principales compuestos encontrados en el aceite esencial extraído de las hojas de limón son limoneno (48.96%), acetato de bornilo (14,18%), geraniol (10,53%), geranial (3,93%); se encuentran mirceno (3,14%) y limoneno (59,09%), (Z)-

sabineno hidrato (7.53%), geranial (5.61%), mirtenol (5.02%) y terpinen-4-ol (3.48%) en el epicarpio, según Nguemezi S et al (2017) (30). Se evaluaron los componentes de los aceites esenciales de la especie citrus (familia: Rutaceae) entre ellas *C. aurantifolia*, *C. grandis*, *C. hystrix* y *C. microcarpa* se usaron las hojas y cáscaras frescas para ser extraídos por arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento del (39.33%) para *C. aurantifolia*; mediante CG-MS con dos columnas de diferente polaridad e índice de retención lineal, se obtuvieron de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle los compuestos más relevantes encontrados fueron: limoneno (39.3%), β -pineno (28.4%), geraniol (7.5%), neral (5.3%), α -terpineol (2.4%), geranial (2.1%), terpinen-4-ol (2.0%), nerol (5.3%), acetato de geranilo (0.6%), y β -cariofileno (0.8%).(31)

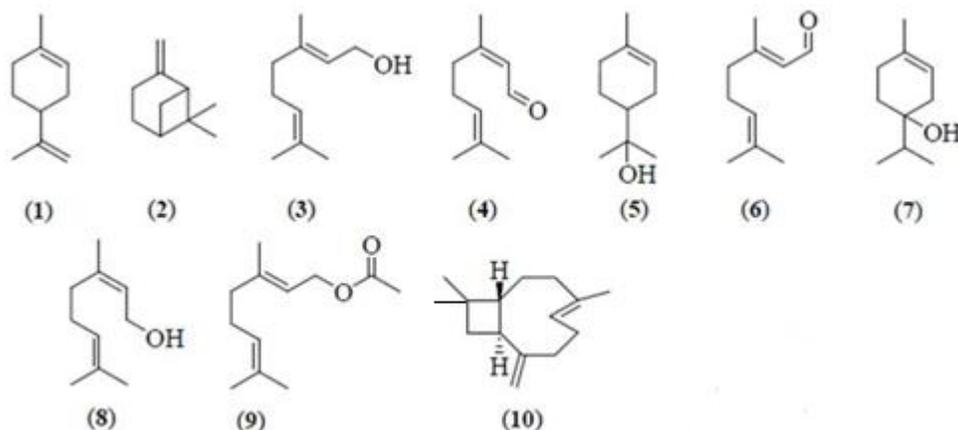


Figura 1. Estructura química de los principales componentes *Citrus aurantifolia* S; limoneno (1), β -pineno (2), geraniol (3), neral (4), α -terpineol (5), geranial (6), terpinen-4-ol (7), nerol (8), acetato de geranilo (9), y β -cariofileno (10).

Fuente: Othman S. et al (2016).(31)

Mientras que Jantan I. et al. (1998) citado por Othman S et al (2016) (31), en su investigación “**Chemical Composition of Some Citrus Oils from Malaysia**”, entre ellos el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* Swingle, para el cual usó cáscaras y hojas frescas de limón, obtenidos mediante destilación por arrastre de vapor de agua, y usando CG/MS para su elucidación estructural, obtuvo los siguientes compuestos (**Tabla 1.**)

Tabla 1. Principales componentes (cáscaras) de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

Components							
Monoterpene Hydrocarbon	%	Oxygenated Monoterpene	%	Sesquiterpene Hydrocarbon	%	Oxygenated Sesquiterpene	%
α -Pinene	1.5	Terpinen-4-ol	2.0	β -Caryophyllene	0.8	(Z)-Nerolidol	0.6
β -Pinene	28.4	α -Terpineol	2.4	α -Bergamotene	0.4	α -Eudesmol	0.1
β -Myrcene	1.0	Neral	5.3	α -Humulene	0.1	β -Eudesmol	0.1
δ -3-Carene	0.5	Geraniol	7.5	(Z)- β -Farnesene	0.4	Elemol	0.1
Limonene	39.3	Geranial	2.1	(E)- β -Farnesene	1.5		
γ -Terpinene	0.8	Geranyl acetate	0.6				

Fuente: Modificado de Othman S et al (2016).(31)

2.2.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales

Los métodos de extracción para aceites esenciales se pueden agrupar en convencionales como: destilación por arrastre de vapor, hidrodestilación, extracción con disolventes orgánicos y los métodos alternativos como: extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas, siendo los métodos convencionales los más fáciles de aplicar pero requieren de mayor tiempo en el proceso, mientras los métodos alternativos son más usados a escala de laboratorio, consumen menos energía y son más complicados en su aplicación.(32)

A. Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor de agua es una de las técnicas más aplicadas para la destilación de aceites esenciales volátiles, apreciada por su fácil aplicación, eficiencia y alta pureza en los resultados, produciendo aceites esenciales de calidad.

Esta técnica se basa en la evaporación de dos líquidos inmiscibles sin alcanzar su punto de ebullición de los componentes volátiles, esto se logra mediante la aplicación de una corriente directa de vapor de agua, el mismo que es inyectado sobre la mezcla calentándolo hasta su punto de ebullición, pero al mismo tiempo disminuyendo la temperatura de ebullición por la presión que este ejerce sobre la

muestra, conservando así la integridad de los componentes lábiles. Los vapores que emergen de la mezcla se enfrían hasta lograr el punto de condensación y finalmente se colecta una mezcla de agua y aceite esencial los cuales se separan por gravedad.(32)

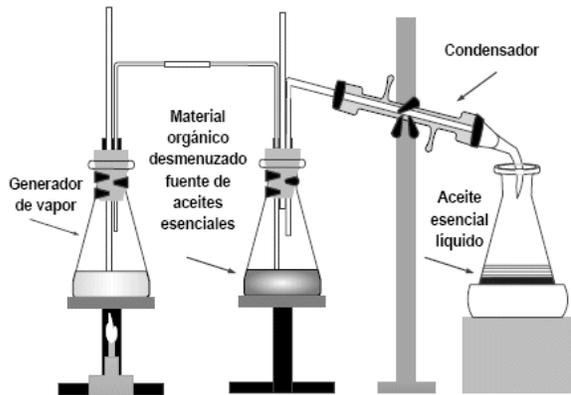


Figura 2. Equipo de destilación por arrastre de vapor

Fuente: Balboa M. (2016).

B. Hidrodestilación

La hidrodestilación también es muy utilizada para la extracción de aceites esenciales sin embargo difiere de la anterior por que la muestra vegetal está totalmente suspendida en agua durante todo el proceso, el mismo que se agita constantemente para evitar la sedimentación, esto ocasiona que se eleve la temperatura y deteriore los componentes lábiles del aceite esencial.(33)

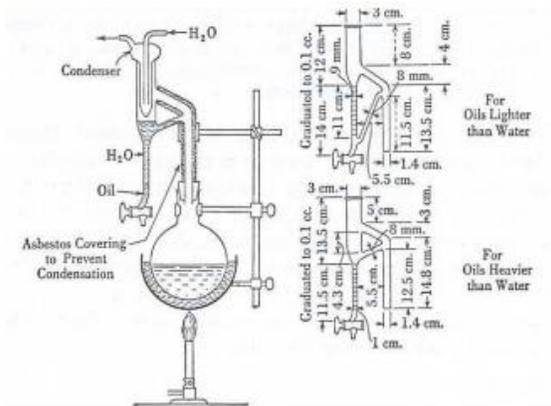


Figura 3. Equipo Clevenger para hidrodestilación

Fuente: Günther (1948).

C. Destilación con solventes orgánicos

En la extracción por solventes orgánicos, la muestra seca entra en contacto con los solventes que pueden ser alcohol, éter, cloroformo, entre otros. Estos solubilizan las esencias pero incluyendo algunas grasas y ceras obteniendo extractos impuros, se usan a nivel de laboratorio y con las desventajas notorias por sus alto costo y riesgo de explosiones e incendios, además si las esencias obtenidas se usará en la industria cosmética o alimentaria se debe que tener en cuenta la cantidad de residuos que estos pueden dejar, los mismos que pueden estar restringidos por alguna legislación; la extracción final con este método consistirá en filtrar y evaporar los solventes a baja presión y temperatura para evitar cualquier accidente.(32)

D. Extracción mediante fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos es uno de los métodos más recientes y modernos. Fluido supercrítico es cualquier compuesto químico que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, donde presentan propiedades medias entre un gas y un líquido: densidad alta (cercana a la del líquido), baja viscosidad (próxima a la del gas) además de un coeficiente de difusión mayor a la del líquido, características que permiten su penetración en una matriz sólida y fácil extracción disminuyendo el tiempo e incrementando la velocidad del proceso. Los compuestos más usados son: dióxido de carbono, etano, etileno, propano, propileno, trifluorometano, clorotrifluorometano, amoníaco, agua, ciclohexano, n-pentano y tolueno, siendo el CO₂ el más usado por su seguridad y por no dejar residuos en el producto.(34)

E. Extracción mediante el uso de microondas

El método de extracción de aceites esenciales con el uso de microondas, es una técnica que se apoya de un método convencional para su funcionamiento, como por ejemplo la destilación por arrastre de vapor, el mismo que se modifica el calentamiento por microondas y su eficiencia está basada en la extracción sin solventes a partir de muestra fresca u hidratando la muestra seca y drenando el excedente. El equipo utilizado básicamente es un horno microondas convencional el mismo que se apertura un orificio en la parte superior para el ingreso de un matraz

de base plana que estará conectado a un condensador y finalmente el producto es separado por gravedad.(32)

2.2.4 Métodos analíticos para el control de calidad de aceites esenciales

En la **Tabla 2** se muestran los principales parámetros y métodos que generalmente se utilizan en la evaluación de la calidad de un aceite esencial.

A. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Estas características se realizan usando los sentidos como: el olfato, el tacto y la visión, indispensables para describir propiedades organolépticas de los aceites esenciales.

Tabla 2. Métodos analíticos para el control de calidad de aceites esenciales

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia
DETERMINACIONES FÍSICAS	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Miscibilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación • Rango de destilación
ÍNDICES QUÍMICOS	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de éster • Índice de saponificación • Índice de acetilo • Índice de fenoles
CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil Cromatográfico por CG • Cuantificación de los principales componentes
CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta-visible • Infrarrojo
OTRAS DETERMINACIONES	<ul style="list-style-type: none"> • Pesticidas • Metales pesados

Fuente: Bandoni A.(35)

B. DETERMINACIONES FÍSICAS

1. Densidad

Según la Norma Técnica Peruana 319.081(1974) la densidad, es la relación entre la masa de un volumen dado de un aceite esencial y su volumen; y la densidad relativa, es la relación entre la densidad del aceite y la densidad del agua destilada a una temperatura de 20 °C. Según Gunter (1948) la gravedad específica, es un indicador importante, para determinar la calidad y pureza de un aceite esencial y fluctúa entre 0.696 y 1.188 a 15 °C.(36) La densidad se determina mediante una matriz de vidrio llamado picnómetro, aerómetro o densitómetro electrónico; la mayoría de los aceites esenciales tienen una densidad menor que el agua solo algunos aceites como el de clavo, canela, ajo y gaulteria son las excepciones.(35)

2. Poder rotatorio

El poder rotatorio específico, es la capacidad que tienen las sustancias para desviar el plano de la luz polarizada a una longitud de onda definida (589 nm), que atraviesa el espesor de un determinado aceite esencial, esta longitud es aquella que corresponde a la línea D del sodio.(36) La mayoría de los aceites esenciales cuando son sometidos a una luz polarizada, tienen la propiedad de rotar a un plano de polarización, a la derecha (dextrógiro) o la izquierda (levógiro); dado que el grado de rotación y la dirección de los mismos son criterios esenciales para definir la pureza de un aceite esencial.(37)

3. Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia dada, es la relación que hay entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de rayo de luz a evaluar de la sustancia. El ángulo de refracción se determina usando un refractómetro ABBE o electrónico a una temperatura específica de 20 °C según norma y oscila entre 1.43 y 1.62 y es considerado un parámetro que permite detectar impurezas en los aceites esenciales; en la **Tabla 3** se muestra la relación de la densidad vs el índice de refracción en aceites esenciales.(36)

4. Miscibilidad en etanol

Los aceites esenciales, son ligeramente solubles en agua y miscibles en etanol. Es la determinación del número de volúmenes de alcohol, a una graduación determinada, que se necesita para una completa solubilización, de un determinado volumen, de aceite esencial; es un indicador rápido en la evaluación de la calidad de un aceite esencial. “Los aceites esenciales ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en etanol diluido que los aceites en cuya composición predominan los hidrocarburos terpénicos”.(29)

Tabla 3. Relación de la densidad vs el índice de refracción en aceites esenciales.

Relación densidad vs, índice de refracción		Posibles componentes presentes
densidad (g/mL)	índice de refracción	
Menor a 0.9	Menor a 1.47	Alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos
Mayor a 0.9	Menor a 1.47	Compuestos oxigenados alifáticos
Menor a 0.9	Mayor a 1.47	Hidrocarburos aromáticos
Mayor a 0.9	Mayor a 1.47	Compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos

Fuente: Domínguez 1973, citado por Fontenla.(36)

5. Punto de congelación

Se utiliza para determinar y separar los aceites esenciales de distinto punto de solidificación, puede determinar el reflejo de la calidad de los aceites esenciales.(38)

6. Punto de inflamación

El punto de inflamación no es un indicador de calidad sin embargo son esenciales para tener cuidado en su manipulación y transporte cuando se usa en grandes volúmenes.(35)

7. Rango de destilación

Este método suele usarse para determinar la volatilidad de los aceites esenciales. Cuando comienzan a destilar los aceites esenciales y se va controlando la temperatura mínima y la máxima hasta cuando se haya destilado por completo. Se puede indicar también los porcentajes que se destilan a determinados rangos de temperatura y métodos de destilación.(35)

C. ÍNDICES QUÍMICOS

Son indicadores de calidad de bajo costo y prácticos al realizarlos, sin embargo son sustituidos por los métodos cromatográficas y espectroscópicos, obteniendo mejores resultados.(35)

1. Índice de acidez

Es un indicador del grado de acidez de un aceite esencial, y se define como número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos que contiene un gramo de aceite esencial.(38)

2. Índice de éster

Se determina el contenido de ésteres de la muestra, y se expresa el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar los ésteres que contiene un gramo de aceite esencial.(38)

3. Índice de saponificación

Es el resultado de la suma del índice de acidez y el índice de éster.(39)

4. Índice de acetilo

Utilizados para indicar la riqueza en grupos OH, el proceso de determinación de una previa acetilación seguido por una saponificación de los aceites esenciales.(39)

5. Índice de fenoles

Es un indicador de la cantidad de compuestos fenólicos contenidos en un determinado aceite esencial; se basa en el cambio de solubilidad que sufren los fenoles de las esencias al formar fenato, en medio básico, pasando de la fase oleosa a la fase acuosa.(39)

D. CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía de gases (CG) es considerada una de las técnicas más eficaces para la detección y cuantificación de los principales componentes de los aceites esenciales. Una de las ventajas es que se puede comparar los cromatogramas del aceite esencial analizado con los de un patrón ya conocido; sin embargo, tiene ciertas deficiencias ya que algunos aceites esenciales cuentan con una composición química muy compleja, dificultando un análisis certero si se usa un método cromatográfico simple; en casos específicos es necesario usar más de un tipo de columna (polares, no polares, quirales, etc.) y varios detectores (FID, de nitrógeno/fosforo, de azufre, acoplado a MS, IR, etc.) con la finalidad de garantizar la legitimidad de los resultados.(35)

E. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS

Se utilizan principalmente la espectroscopia ultravioleta-visible y la infrarroja.

1. Ultravioleta – visible

Se miden a una longitud de onda de 200 y 500 nm. Este método, proporciona información, de absorciones características de ciertos grupos funcionales.(40)

2. Infrarrojo

El espectro infrarrojo se obtiene en un intervalo de longitudes de onda de 4,000 y 626 cm^{-1} , con una celda óptica de cloruro de sodio de 0.025 mm de espesor, método por el cual fue analizado el aceite esencial de limón por Pennisi y Di Giacomo (1965) citado por Albaladejo Q (1999).(29)

2.2.5 Repelentes

Denominado repelente a toda sustancia de origen natural o sintético, que al ser aplicado sobre la piel, mediante una determinada forma farmacéutica de uso tópico, es capaz de ahuyentar o alejar a los mosquitos o algún otro insecto de la zona donde se aplicó el fármaco; se usan con la finalidad de evitar enfermedades transmitidas por vectores.(41)

2.2.6 Historia de los repelentes

El uso de repelentes se remonta a la antigüedad, los habitantes del antiguo Egipto usaban sustancias olorosas para ahuyentar mosquitos, descritas por Herodoto. Plinio describe el uso de aceites esenciales de plantas aromáticas, entre ellas el alcanfor, geranio, lavanda, canela, etc. usadas por los romanos. Los europeos en el siglo XVI, usaban el cáñamo, el extracto de ajo, el aceite de oliva, mientras que en la zona del Caribe, el aceite de coco y aceite esencial de *citronella* que aún se sigue usando. La era moderna de los repelentes, datan de la segunda guerra mundial donde se sintetizó en los Estados Unidos, el aun usado N, N-dietil-m-toluamida (DEET). En la década de 1990 se desarrolló el Icaridin, un derivado de la piperidina considerado de amplio espectro y cumpliendo con las atribuciones de seguridad, eficacia, tolerabilidad y excelentes prestaciones cosméticas.(42)

2.2.7 Clasificación de los repelentes

Según la procedencia del principio activo estos se clasifican en:

A. REPELENTE DE ORIGEN SINTÉTICO

- **DEET.** De nombre químico N, N-dietil-m-toluamida, considerado como repelente de amplio espectro, además de ser usado como estándar para introducir nuevos repelentes en el mercado, eficaz en la protección contra mosquitos, moscas y garrapatas; se comercializa a muchas concentraciones, que oscilan entre el 5 y el 40%. A concentraciones superiores al 40 – 45% no ofrece protección más allá de las 8 horas.(42)

- **IR 3535.** Es un éster etil N-acetil-N-butil del ácido aminopropiónico (butil-acetilaminopropionato de etilo), con excelentes prestaciones cosméticas. Ofrece una protección ligeramente inferior a la del DEET y a periodos ligeramente más corto, ya que es muy poco eficaz contra garrapatas y su eficacia contra mosquitos de la especie *Anopheles* es dudosa; se comercializa principalmente como repelente de mosquitos para niños a concentraciones que oscilan entre el 5 y el 25%.(42)
- **Icaridin.** Es una sustancia mucho más moderna, de nombre químico (1-piperidina ácido carboxílico, 2(2-hidroxietil)-, 1-metilpropiléster), comercializado en todo el mundo desde 1998. Este producto es eficaz, seguro y muy tolerable, según un informe reciente en el plan OMS de la evaluación de plaguicidas (WHOPES) lo describe como el repelente de elección para la prevención de la malaria en humanos. La agencia de protección ambiental (EPA) lo considera como no nocivo para el entorno medioambiental humano; asimismo Icaridin, cumple los requisitos de la Dirección de Cosméticos de la Unión Europea. En los estudios clínicos realizados, Icaridin ha demostrado ser de amplio espectro, con un 95% de eficacia hasta 8 horas si se usa al 20%, y disminuye proporcionalmente con la concentración; puede utilizarse en niños a partir de 2 años.(42)
- **Permetrinas.** Conocidas por su eficacia insecticida y pediculicidas, también presentan una buena actividad repelente ante otros insectos. No obstante, se aconseja que su uso como repelente se limite a impregnar mosquiteras, cortinas y ropa de cama en aquellas zonas con alta densidad de mosquitos.(43)

B. REPELENTE DE ORIGEN NATURAL

- **Aceite esencial de *Cymbopogon nardus*.** También conocido como aceite esencial de citronella. Produce una sensación desagradable a los insectos y los ahuyenta. No afecta al equilibrio ecológico, es bien tolerado y su olor es agradable, pero su eficacia es limitada además se recomienda usar en sociedad con protectores solares, si se usa frecuentemente o por periodos prolongados puede causar reacciones alérgicas.(43) En los Estados Unidos, se comercializa bajo la forma farmacéutica de loción, spray y toallitas a concentraciones de 0.05 y 15%, sin embargo, su tiempo de protección solamente alcanza las dos horas.(44)

- **Aceite esencial de *Eucalyptus citriodora*.** También conocido como aceite de eucalipto limón. El mecanismo de acción parece ser similar al anterior. En este caso a las ventajas de la citronella se añade un mayor nivel de repelencia, eficaz a una concentración de 40% y su uso se limita a niños menores de 3 años.(43) Cabe recalcar que presenta un tiempo de protección eficaz durante seis horas; en España se comercializan bajo el nombre comercial de Mosi-guard® en presentaciones de barra, crema y spray a concentraciones que oscilan entre los 30 y 55%; siendo una de las principales desventajas ya que se incrementa abismalmente el costo.(44)

2.2.8 Vectores que transmiten enfermedades

Los vectores son organismos vivos capaces de transmitir enfermedades infecciosas entre personas o también animal - hombre, en su mayoría son hematófagos, para mencionar algunos de ellos tenemos: garrapatas, moscas, flebótomos y pulgas pero sin duda los mosquitos son los más importantes. En el mundo más de 700,000 personas mueren cada año a causa de las infecciones transmitidas por vectores, 3,900 millones corren el riesgo de contraer dengue; el paludismo cada año causa la muerte de más de 400,000 personas y la gran parte son menores de cinco años, entre otras enfermedades como el dengue, la enfermedad de chagas, la leishmaniasis, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, tripanosomiasis africana humana y la esquistosomiasis entre otras; afectan a cientos de miles de personas en el mundo.(45)

2.2.9 Mosquitos transmisores de enfermedades

Los principales son los pertenecientes a los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* que afectan a las poblaciones más pobres de las zonas tropicales y subtropicales. Desde el 2014 se les atribuye el rebrote de enfermedades como el dengue, fiebre de chikungunya, fiebre amarilla y enfermedad por el virus de Zika.(45)

A. Mosquito *Aedes aegypti*

Es un mosquito que pertenece a la familia *Culicidae*, y subfamilia *Culicinae* que incluye los géneros *Aedes* y *Culex*. Las dos especies de interés médico del género *Aedes* son el *aegypti* y *albopictus*; se encuentran distribuidas ampliamente en los climas tropicales y subtropicales específicamente entre los 35° y 45°, latitudes N y S, a una altura que fluctúa entre los 1,200 y 2,400 msnm. Su hábitat generalmente se encuentran en las zonas urbanas, pero pueden encontrarse en zonas periurbanas y en algunos casos silvestres; los sitios de cría por lo general son: cementerios, baldíos, basurales, bebederos de animales, neumáticos, floreros, botellas, latas abiertas, entre otros; en condiciones de presión de sobrepoblaciones tienden a adaptarse a lugares de ovoposición como por ejemplo: axilas de bromeliáceas, huecos de árboles, cañas de bambú entre otros. Pueden dispersarse desde sus criaderos volando entre 1 y 2 kilómetros, además de dispersarse pasivamente en distintos medios de transporte, siendo este último el método de transmisión de los virus entre las regiones.(46)

B. Taxonomía del *Aedes aegypti*

La clasificación taxonómica del zancudo-mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) .(47)

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexápoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Culicidae

Género: *Aedes*

Especie: *Aedes aegypti*

C. Ciclo de vida del *Aedes aegypti*

El ciclo de vida del vector muestra una metamorfosis completa, esto significa que las formas inmaduras son totalmente distintas a las adultas, siendo acuáticas y posteriormente aéreas, aunque algunas investigaciones muestran que las pupas extraídas del medio acuático, pueden permanecer vivas hasta tres días en tierra y completar su metamorfosis hacia adultas, pero afectadas por los rayos solares en su mayoría.(48) El ciclo consta de cuatro estadios, los cuales son: huevo, larva, pupa y adulto. Cabe recalcar que en condiciones de temperatura y alimentación optimas éste se completa en aproximadamente 10 días.(49)

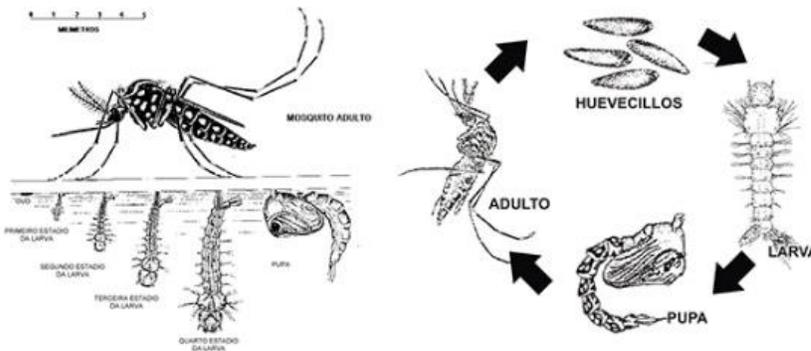


Figura 4. Ciclo de vida del *Aedes aegypti*

Fuente: Araguaia M.

1. Huevos del *Aedes aegypti*

Los huevos tienen un tamaño aproximado de 0.8 mm, son de color blanco al inicio, y se tornan a negro a medida que desarrolla el embrión, las hembras pueden poner entre 50 y 150 huevos, los mismos que eclosionan entre 2 a 3 días si las condiciones de temperatura y humedad son las adecuadas, sin embargo, los huevos pueden sobrevivir muchos meses hasta un año en condiciones de temperatura y desecación extremas.(49) Las hembras colocan entre 10 y 20% de sus huevos directamente sobre el agua y lo demás pegados a la superficie del recipiente, esto con la finalidad de incrementar los índices de supervivencia de la especie, ya que vuelven a eclosionar si son inundados de agua, característica fundamental a tomar en cuenta para la prevención de la proliferación de la especie, ya que se puede controlar si hacemos una adecuada práctica en la eliminación de potenciales criaderos.(46)

2. Larvas de *Aedes aegypti*

Al eclosionar los huevos, dan lugar a las formas larvarias las cuales se desarrollan mediante un ciclo de cuatro estados larvarios; al inicio miden aproximadamente 1 mm y desarrollan hasta los 6 o 7 mm en el IV ciclo, “poseen como caracteres morfológicos típicos; fuertes espículas torácicas quitinizadas, peine de escamas unilineal en el octavo segmento y sifón en forma de oliva corta que destaca por su color negro; se alimentan mediante cerdas bucales en forma de abanico, esencialmente de zoo y fitoplancton y de material orgánico suspendido o acumulado en los recipientes”.(49) Son acuáticas, nadadoras y de respiración aérea, presentan cabeza y tórax de forma ovoide de abdomen nona segmentado y presencia de 4 branquias lobuladas en el segmento posterior, esenciales para la regulación osmótica, y un sifón corto, que lo distingue de otras especies de mosquitos. Reposan en la superficie del agua de forma vertical, son fotosensibles y al ser amenazados nadan hacia el interior de forma contorneada; la fase, en condiciones de temperatura óptimas (25 a 29 °C) se completa entre 5 a 14 días, mientras que a temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 45 °C, no resisten.(46)

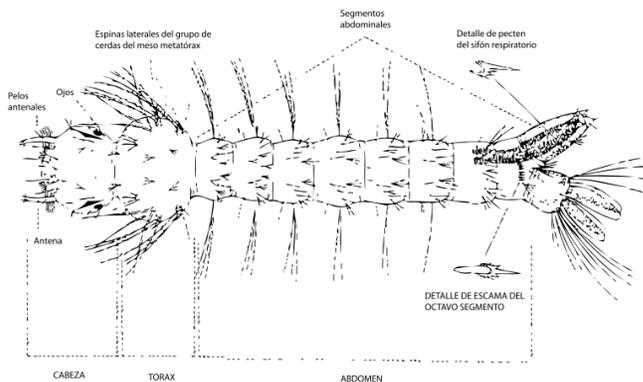


Figura 5. Larva de *Aedes aegypti* y sus partes

Fuente: Eiman et al (46)

3. Pupa de *Aedes aegypti*

Las pupas no requieren alimentación, en condiciones de temperatura óptimas entre los 28 y 32 °C el ciclo se completa entre 1 y 3 días, a temperaturas mayores el ciclo se puede extender; permanecen el mayor tiempo en reposo en la superficie del agua,

por su flotabilidad, característica que les permiten emerger a especímenes adultos; entre sus cualidades anatómicas poseen un par de tubos o trompetas en la base del tórax, que les permiten respirar, además de un par de paletas o remos en la base del abdomen, que lo usan para movilizarse en el agua cuando se sienten amenazados.(46)

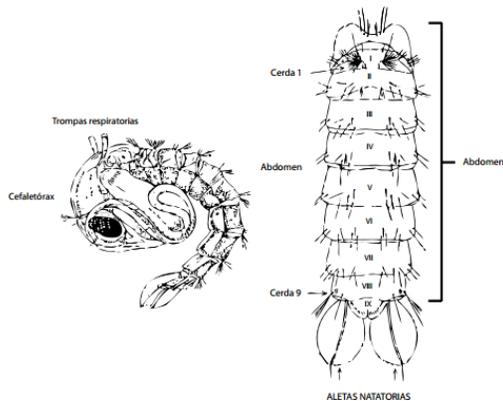


Figura 6. Pupa de *Aedes aegypti*

Fuente: Eiman M et al (46)

4. Mosquitos adultos de *Aedes aegypti*

“Los mosquitos adultos, son de color negro con diseños blanco – plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una “lira” en el dorso del tórax, y mostrando un anillo característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas”.(49) Permanecen en reposo después de pasar del estado de pupas, con la finalidad de endurecer su sistema exoesquelético y alas; ambos sexos son fitófagos pero a diferencia de los machos, las hembras son hematófagas, característica esencial para la maduración de sus huevos por alto contenido de la proteína albúmina que contiene la sangre, normalmente se alimentan durante el día, y tienen gran afinidad por los humanos, las hembras detectan el gas emitido por estos, que por lo general es CO₂ y cuando están cerca, tienen sistemas visuales, olfativos, térmicos y táctiles que les permiten localizar el sitio de alimentación; se aparean por única vez después de las 24 horas que emergen de pupas, los machos se diferencian de las hembras ya que estos poseen antenas plumosas y palpos pequeños, éstas últimas no tienen plumas y son más pequeñas.(46)

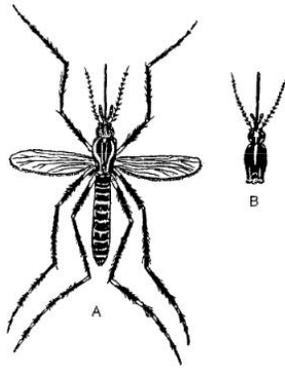


Figura 7. Diferencias de hembras (A) *Aedes aegypti* y (B) *Aedes albopictus* A) detalle de escamas blancas en forma de “lira” en el dorso torácico y B) detalle de escamas blancas en línea media del dorso torácico.

Fuente: Salvatella A.(49)

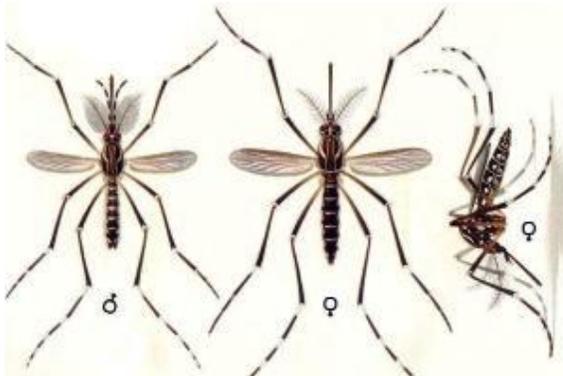


Figura 8. Morfología de *Aedes aegypti*, macho y hembra

Fuente: Araguaia M.

2.2.10 Animales de experimentación

Los animales de experimentación, poseen características propias de tener en cuenta al momento de realizar un ensayo, si bien es cierto, cualquier animal se puede usar ya sea una mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) hasta el hombre, sin embargo la legislación que regula la experimentación animal, solo protege a los vertebrados que se usan con fines científicos.

Cabe recalcar que, para ser considerados como animales de experimentación, estos deben ser criados solo con tales fines, en centros dedicados a la crianza de animales

de experimentación (animalarios, bioterios, estabularios o unidades de producción y/o experimentación animal).(50)

A. Estandarización de los individuos

Cabe recalcar que la selección de los individuos estarán limitadas a la pureza del animal por lo tanto deberá ser controlada, vigilada y contrastada, teniendo en cuenta que pueden ser susceptibles a la contaminación y tener un efecto distorsionador sobre los resultados; entre los requisitos esenciales para la selección de dichos animales se debe tener en cuenta:

- **Homogeneidad somática:** igualdad de sexo, peso y edad. Fácil en roedores y difícil en animales grandes (carnívoros, primates, herbívoros).
- **Homogeneidad genética:** obtenida por una tasa de consanguinidad elevada.
- **Homogeneidad sanitaria:** tendencia a evitar posibles perturbaciones debidas a estados patológicos no deseados, que influyen en la expresión genética del animal (genotipo), condicionando a largo plazo el fenotipo y a corto plazo el estado físico.

El objetivo final será tener animales “biológicamente estandarizados” sometidos a constantes controles a los que adicionalmente se unen los ambientales como temperatura, ventilación, humedad, luz y las variables de comportamiento o etología. Estos factores pueden afectar la estandarización del animal, y como consecuencia, los resultados.(50)

B. Las especies más utilizadas

No cabe duda que entre las especies más utilizadas están las ratas (*Rattus norvegicus*) y los ratones (*Mus musculus*) por su tamaño, alta prolificidad, su facilidad de manejo y mantenimiento, etc. Entre otros están el hámster chino y dorado (*Cricetulus griseus* y *Mesocricetus auratus*), cobaya (*Cavia porcellus*), jerbo (*Meriones unguiculatus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*); animales de granjas, como ovejas (*Ovisaries ligerensis*), cerdos (*Sus scrofa domesticus*), o puede ser el caso del uso de animales carnívoros entre los que se destacan gatos (*Felis cattus*) y perros (*Canis familiaris*), etc. cada una de ellas con características experimentales

específicas que cada investigador debe tener en cuenta al seleccionar dicho “reactivo biológico”.(50)

2.2.11 La piel y sus características

Considerado el órgano más grande del cuerpo humano, cumple funciones importantes entre ellas metabólicas, de barrera, secretoras, excretoras, de información sensorial y regulación térmica; constituye el 6% del peso corporal y contiene aproximadamente el 30% del total de sangre, varían con diversos factores como por ejemplo la edad, color, raza, variables topografías, algunas patologías etc., el pH varía con el sexo, raza y la edad, incluso en el mismo individuo puede variar según la parte del cuerpo en la que se localice, las secreciones acumuladas sobre la superficie de la piel, le confieren un pH entre 4.5 a 5.5, y se incrementa en las capas más profundas llegando a un pH entre 7.1 a 7.3 en la dermis; esta última característica es muy importante para formulaciones farmacéuticas de uso tópico.(51)

2.2.12 Formas farmacéuticas

Asociación de principio(s) activo(s) y excipientes, para constituir la presentación final de un medicamento, con la finalidad de mantener sus especificaciones en el tiempo de vida del mismo. Debe cumplir con ciertos requisitos ejemplo: estabilidad, consistencia, pH adecuado, olor agradable, facilidad de manejo, almacenamiento, costo accesible y aceptación por el usuario.(52)

2.2.13 Formas farmacéuticas de aplicación sobre piel y mucosas

Llamadas así aquellas que se aplican sobre la piel ya sea con fines terapéuticos o cosméticos, clasificadas según su naturaleza fisicoquímica.

Formas farmacéuticas

- **Formas líquidas**, son uso frecuente y pueden prepararse como soluciones, suspensiones o emulsiones

- **Formas sólidas**, se encuentran los polvos suavizantes y lubricantes y las barras o lapiceros con contenidos medicamentosos.
- **Formas de consistencia semisólida**. En este grupo se encuentra la mayoría de formulaciones de aplicación sobre la piel y mucosas, en la que podemos mencionar, las pomadas (*hidrófobas, absorbentes de agua, hidrófilas*), cremas (*hidrófilas, hidrófobas*), geles (*oleogeles, hidrogeles*) y pastas.(27)

2.2.14 Formas farmacéuticas líquidas de uso tópico

Existe un número considerable de formas farmacéuticas líquidas, más o menos viscosas y untuosas, que se aplican sobre la piel ya sea con fines dermatológicos o cosméticos. Por lo general contienen agua, mezclas hidroalcohólicas y aceites como vehículos, los mismos que tienen importancia para su denominación ya que pueden ser de consistencia acuosa u oleosa; aunque no tiene una definición puntual en muchos países y por lo general se les denomina “**lociones**” a las que contengan agua o bajo contenido de alcohol como vehículo, y sustancias activas, disueltas o suspendidas que pueden ser de viscosidad variable, por la presencia de coadyuvantes que se agregan con fines de estabilidad, o mejorar la adherencia sobre la piel. Existe otra denominación para formas dermatológicas líquidas, y es la de “**linimentos**”, que por lo general se aplica a aquellos preparados cuyo vehículo es un aceite de viscosidad variable, y con la sustancia activa disuelta o interpuesta en forma de emulsión, agua en aceite (W/O).(27)

A. Lociones de uso tópico

Son formas farmacéuticas de consistencia líquida o semisólida, que puede variar en su grado de viscosidad a temperatura ambiente, y contener uno o más ingredientes farmacéuticos activos; generalmente están destinadas para ser aplicados sobre la piel. “El término loción se aplica a soluciones, suspensiones o emulsiones aplicadas tópicamente”.(53)

B. Suspensión de uso tópico

Se trata de un sólido, que se dispersa en otro sólido, un líquido o un gas, entre ellas y tenemos: las lociones, geles, pastas, pomadas y supositorios.(52)

C. Emulsión de uso tópico

En este sistema un líquido está disperso en otro líquido, como pequeñas gotitas sin diluirse, y la viscosidad dependerá de la cantidad de sustancia emulsificante que contenga. En este grupo se encuentran las cremas, que se conoce como emulsiones líquidas viscosas o semisólidas, aceite en agua (O/W) si el medio dispersante es agua, es la de uso más frecuente o agua en aceite (W/O) si el medio dispersante es aceite. Son de aspecto lechoso, a diferencia de las soluciones que son transparentes, y si se usa una grasa como medio dispersante, esta será de consistencia más cremosa.(52)

2.2.15 Forma farmacéutica mejor aplicada en repelentes

Entre las características de una buena formulación de un repelente se debe tener en cuenta:(51)

- Eficacia repelente a más de una especie de mosquitos
- No presentar toxicidad, ni reacciones alérgicas
- Efecto prolongado en diversas circunstancias de su uso
- Olor agradable
- Presentar buena estabilidad
- Que pueda lavarse con facilidad
- Tendencia a no manchar
- De fácil aplicación
- De excelentes prestaciones cosméticas
- Bajo costo

2.3 Hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

1. La loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** tiene actividad repelente contra mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. Los terpenoides son los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle**.
2. La loción elaborada a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** tiene efecto repelente contra los mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***.
3. La loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** tiene efecto repelente comparado con la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET).

2.4 Variables

2.4.1 Variable independiente

- Metabolitos secundarios de la loción a base del aceite esencial de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle**

2.4.2 Variable dependiente

- Efecto repelente contra mosquitos hembras adultas de la especie ***Aedes aegypti***.

2.4.3 Operacionalización de variables

Variables	Dimensión	Indicadores
<p>Variable Independiente</p> <p>Metabolitos secundarios de la loción a base de aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle</p>	<p>Fitoquímica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Terpenoides • Compuestos fenólicos
<p>Variable Dependiente</p> <p>Efecto repelente contra mosquitos hembras adultas de la especie <i>Aedes aegypti</i></p>	<p>Entomología</p>	<ul style="list-style-type: none"> • % mosquitos repelidos • Tiempo de exposición • Tiempo de protección • N° de picaduras

Fuente: Elaboración propia

2.5 Marco Conceptual

- **Subregión Andina:** se entiende por subregión andina a los países: Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.
- **Las Américas:** se entiende el continente americano comprende América del sur; centro, norte y las Bahamas
- **Hematófagos:** nutrirse de la sangre de otro animal.
- **Esquistosomiasis:** “la esquistosomiasis o bilharziasis es una infección intravascular común causada por el parásito Schistosoma o bilharzia, un gusano trematodo”. Es la segunda enfermedad tropical más prevalente después de la malaria y se encuentra en la lista de enfermedades tropicales olvidadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS).(54)
- **Larvicidas:** es un químico que se aplica al producto que destruye las larvas.
- **Imagocidas:** insecticida de mosquitos en la etapa adulta.
- **Organofosforados:** los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados
- **Piretroides:** compuestos sintéticos basados estructuralmente de la molécula de piretrina.
- **Medicina convencional:** es ciencia que busca prevenir, tratar y curar las enfermedades mediante el uso de fármacos.
- **Elucidar:** proceso mediante el cual se identifica la estructura molecular de una sustancia química.
- **Insectario:** instalación en la que se conservan y crían insectos
- **Rash cutáneo:** se denomina rash cutáneo al enrojecimiento, erupción y picazón de la piel que se produce, entre otras cosas, por la reacción adversa hacia algún medicamento.(55)
- **Monoembriónicas:** son semillas que contienen un solo embrión que dará origen a una planta que contendrá los genes de ambos progenitores.
- **Emenagoga:** propiedad de una sustancia o planta medicinal con acción estrogénica, facilitadora de la menstruación.

- **Dismenorrea:** la dismenorrea es el dolor intenso pélvico y supra púlica que aparece en la mujer antes o durante la menstruación.(56)
- **Disentería:** la disentería es como se conoce a los trastornos o infecciones intestinales que causan la inflamación del colon y los intestinos. Es un dolor abdominal severo, vómitos y problemas al defecar, causado por la bacteria llamada Shigella y el parásito llamado entamoeba.(57)
- **Emplastos:** preparado farmacéutico de uso tópico, sólido, moldeable y adhesivo
- **Arrastre con vapor:** la destilación por arrastre con vapor, es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables.(32)
- **Método de extracción por expresión:** es un método muy utilizado, para la extracción de cítricos como el limón, la naranja, la bergamota, la mandarina o la lima. Este método de extracción presenta la ventaja de no someter los aceites esenciales a temperaturas elevadas. Sin embargo, estos entran en contacto con el agua, por lo que se dispersan importantes componentes hidrosolubles.(32)

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1 Tipo de estudio

El presente trabajo está elaborado bajo el planteamiento metodológico del enfoque cuantitativo, ya que se busca comprobar la hipótesis previamente establecida, así como los objetivos trazados.

Teniendo en cuenta que este enfoque, según Hernández et al (2010). “Usa la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías”.(58)

3.2 Diseño a utilizar

El presente estudio tiene un diseño experimental de tipo “experimental puro” pues es el que mejor se adapta a las necesidades del estudio.

El diseño experimental consiste en manipular intencionalmente una o más variables independientes en forma aleatoria, para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador.(58)

3.3 Población

“Una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones”. Selltiz et al (1980). Citado por Hernández et al (2010).(58)

3.3.1 Población del material vegetal

El material vegetal se recolectó a partir de una plantación de limón criollo, de una parcela de 2,500 m², que contenían aproximadamente 2,000 árboles de 8 años de edad en etapa productiva, de los cuales se seleccionaron los que tenían contenido para extraer un total de 50 kg de frutos semimaduros, de forma aleatoria.

3.3.2 Población del material biológico

Se obtuvieron 50 larvas de *Aedes aegypti*, donadas por el Instituto Nacional de Salud (INS), área de Entomología; criadas y reproducidas en cautiverio, tanto mosquitos machos y hembras a humedad y temperatura ambiente.(59).

3.3.3 Población de voluntarios

Posibles 12 sujetos de ambos sexos de entre los 18 a 28 años de edad.

3.4 Muestra

“La muestra es un subgrupo de la población de interés sobre el cual se recolectan datos, y que tiene que delimitarse con precisión, éste deberá ser representativo de dicha población, ya que los que los resultados encontrados en la muestra, logren extrapolarse a la población”.(58)

3.4.1 Muestra del material vegetal

Se utilizaron los frutos semimaduros de limón criollo (50 kg); de los cuales se usó solo el flavedo (cáscaras), un total de 8 kg.

3.4.2 Muestra del material biológico

Se seleccionaron 1,710 mosquitos hembras hambrientas de la especie ***Aedes aegypti*** de aproximadamente 3 a 6 días de edad.(59)

3.4.3 Muestra de los voluntarios

Cuatro sujetos, dos hombres y dos mujeres adultos, las mismas que accedieron voluntariamente ser sometidos al presente estudio.

3.5 Equipos, materiales y reactivos

3.5.1 Equipos

Balanza analítica Mettler. Sensibilidad 0.1 mg

Balanza electrónica

Cromatógrafo de Gases SHIMADZU, GC-2010 Plus

Equipo de destilación por arrastre de vapor

3.5.2 Materiales

Bagueta

Capsulas de vidrio

Cinta de aluminio

Embudo de vidrio

Filtros para jeringa de nylon 0.45 μm

Frascos viales ámbar

Guantes de barrera

Jaula zancudera pequeña y grande

Jeringas 10 mL

Larvario de plástico transparente

Levadura de cerveza MasoN natural[®]

Pera de bromo

Pipeta graduada

Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL

Propipeta

Tachos de plástico

Taper plástico de boca ancha cilíndrico

Tela tul

Tijeras de poda

Transportador de mosquitos

Tubos de ensayo

Vasos de precipitado de 10, 15, 50 y 100 mL

3.5.3 Reactivos

Agua destilada

Alcohol puro 96°

Alcohol etílico

Cloruro férrico

Draguendorff

Emulgin RH 40 ®

Gelatina

Glicerina

Hipoclorito de Sodio

Liebermann Burchard

Mayer

Metilparabeno

Na₂SO₄

Ninhidrina

Plasdone K 30 ®

Propilenglicol

Sulfato de sodio anhidro P.A.

Tergitol NP 9

Tiras reactivas de pH

Trietanolamina

Tween 80 ®

3.6 Procedimientos

3.6.1 Recolección y clasificación taxonómica de la especie vegetal

La especie vegetal, de ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** (limón criollo), se recolectó a 668 m.s.n.m. En el distrito de Sayán, provincia de Huaura, región Lima, situada en la zona centro-occidental del Perú en el mes de diciembre del 2018. Los frutos se seleccionaron por uniformidad de color (verde con rasgos amarillos), de 30 árboles en la etapa de producción de aproximadamente 8 años de edad, recolectando un total de 50 kg; para el proceso se usó guantes de barrera y tijeras de poda; los materiales se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio al 1%. El producto recolectado se almacenó en bolsas de polietileno para posteriormente ser transportados y procesados en el laboratorio de Recursos Naturales (RENATU) de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La clasificación taxonómica de la especie vegetal, se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

3.6.2 Extracción del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

Los 50 kg de frutos recolectados, se lavaron en una tina con abundante agua potable e hipoclorito de sodio al 1%, luego se secaron con papel toalla y posteriormente se retiró el flavedo usando un pelador metálico previamente desinfectado con alcohol al 96°, obteniendo un total de 8 kg de cáscaras frescas. Se procedió a montar el equipo de destilación por arrastre de vapor de agua y se destiló durante dos horas a presión y temperatura controlada. El proceso se realizó en dos fracciones de 4 kg cada uno, esto debido a la capacidad del equipo de destilación; el destilado se recibió en una

pera de decantación para facilitar la separación del aceite esencial con el hidrolato. Una vez separado el aceite esencial se desecó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y usando un filtro de membrana estéril de 0.22 μm de porosidad, se retiró los residuos ajenos al aceite esencial; posteriormente se envasó en viales herméticos de color ámbar y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.6.3 Rendimiento del aceite esencial

Para la determinación del rendimiento se procedió a medir la cantidad del aceite esencial obteniendo (28 mL). El porcentaje de rendimiento se calculó bajo la siguiente fórmula.(51)

$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Vol. AE}}{\text{P. muestra}} \times 100$	$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{28 \text{ mL}}{8000 \text{ g}} \times 100$
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

Dónde:

Vol. AE: volumen del aceite esencial en mililitros; **P.muestra:** peso de la muestra fresca en gramos.

El rendimiento del aceite esencial fue 0.35 por ciento v/p.

3.6.4 Pre formulación de la forma farmacéutica

Con el propósito de encontrar los excipientes que mejor se adecue al aceite esencial de limón, se formularon los siguientes pilotos:

Piloto N° 01

Tomando en cuenta los criterios de formulación de Daza y Flores (2006); se utilizaron los excipientes que se detallan en la **Tabla 4.**(60)

Tabla 4. Formulación del piloto N° 01

MATERIA PRIMA	CANTIDAD PARA 100 g	FUNCIÓN
Aceite aceite de limón	20%	Repelente de mosquitos
Propilenglicol	12%	Humectante, fijador de los aceites esenciales
Tergitol NP 9	8%	Dispersante, emulsificante y estabilizante
Metilparabeno	0.5%	Preservantes
Plasdone K 30 ®	0.5%	Agente dispersante
Agua	c.s.p	Vehículo

Fuente: modificado de Daza y Flores (2006).

Tabla 5. Análisis del control de calidad del piloto N° 01

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Color	-----	Blanco
Olor	-----	Característico a limón
Homogeneidad	-----	No
pH	5.5 – 7.5	5.5
Partículas extrañas	Ninguno	Conforme
Estado físico	-----	Semisólido

Fuente: elaboración propia

- Los resultados de esta formulación no fueron los adecuados, ya que su consistencia y textura presentó apariencia jabonosa, por la que fue descartada.

Piloto N° 02

Para la siguiente formulación se tomó en cuenta la loción realizada por Álvarez y Ochoa (2013).(61) Se formuló a dos concentraciones; 3.5 y 12% de aceite esencial, con la finalidad de optimizar los resultados para los cuales se usaron los excipientes que se detallan en la **Tabla 6.**

Tabla 6. Formulación del piloto N° 02

MATERIA PRIMA	C.S.P 100 g	FUNCIÓN
Aceite esencial de limón	3.5 y 12%	Repelente de mosquitos
Propilenglicol	5%	Humectante, fijador de los aceites esenciales
Tween 80 ®	10%	Agente tensoactivo
Alcohol etílico	60%	Vehículo alcoholica, solvente de los aceites esenciales
Agua	c.s.p	Vehículo

Fuente: Modificado de Álvarez y Ochoa (2013).(61)

Tabla 7. Análisis de control de calidad del piloto N° 02

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS	
		Loción al 3.5%	Loción al 12%
Color	-----	Amarillento	Blanco
Olor	-----	Característico a limón	Característico a limón
Homogeneidad	-----	si	no
pH	5.5 – 7.5	6	6
Partículas extrañas	Ninguno	Conforme	Conforme
Estado físico	-----	Líquido	Líquido

Fuente: Elaboración propia.

- Los resultados de estos dos pilotos, muestran conformidad a la menor concentración y excelentes resultados; mientras tanto, al modificar la dosis del aceite esencial de limón, muestra un cambio repentino en las características fisicoquímicas, entre la más notoria, la separación de dos fases, la acuosa de la oleosa, por lo tanto, se descartan estas formulaciones.

Piloto N° 03

Para elaborar el siguiente piloto se tomó como referencia la elaboración de una loción no emulsionada planteada por Olmedo et al (51), donde obtuvieron excelentes resultados; las proporciones de los excipientes se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Formulación del piloto N° 03

MATERIA PRIMA	C.S.P 100 g	FUNCIÓN
Aceite esencial de limón	2; 4%	Repelente de mosquitos
Glicerina	15%	Humectante, disminuye el efecto drástico del alcohol
Emulgin RH 40 ®	20%	Cosolvente, Solubilizante no iónico
Trietanolamina	0.05%	Regulador pH
Alcohol etílico	40%	Vehículo
Agua	c.s.p	Vehículo

Fuente: Modificado de Olmedo R et al (2003)

Tabla 9. Análisis de control de calidad del piloto N° 03

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	
		Loción al 2%	Loción al 4%
Color	-----	Trasparente	Trasparente
Olor	-----	Característico a limón	Característico a limón
Homogeneidad	-----	Si	Si
pH	5.5 – 7.5	6.5	6.5
Partículas extrañas	Ninguno	Conforme	Conforme
Estado físico	-----	Líquido	Líquido

Fuente: Elaboración propia.

- Los resultados del piloto N° 03 mostraron excelentes prestaciones, ya que presentan conformidad en todos los análisis realizados; los mismos que se tomarán en cuenta para plantear las formulaciones propiamente dichas que se utilizarán para el experimento.

3.6.5 Formulación de las lociones a partir del aceite esencial de limón

Se formularon lociones a partir del aceite esencial de limón, a concentraciones de 2, 4, 10 y 15% según la proporción de excipientes que se especifican en la **Tabla 8**.

Procedimiento para la elaboración de la loción repelente a partir del aceite esencial de limón

1. Se lavaron todos los materiales e instrumentos a utilizar con detergente y se enjuagó con abundante agua potable; posteriormente se enjuagó con agua destilada y se desinfectó con alcohol al 96%.
2. Verificación de todos los materiales, materia prima y equipos a utilizar.
3. Se pesaron las materias primas: aceite esencial de limón, glicerina, Emulgin RH 40 ®, trietanolamina, alcohol etílico y agua destilada.
4. Se tara un vaso de precipitado de 100 mL; se pesó Emulgin RH 40 ® y alcohol etílico, se agita hasta su dilución completa; luego se agrega el aceite esencial de limón y se agita. (**fase A**)
5. En otro vaso de precipitado de 100 mL se agrega, agua destilada, glicerina y trietanolamina; se agita constantemente hasta homogenizar. (**fase B**)
6. Se unen las dos fases: (**A** sobre **B**), la fase alcohólica sobre la acuosa, se agita constantemente usando una bagueta durante 3 minutos.
7. Posteriormente se realiza una filtración usando una jeringa de 10 mL adaptada a un filtro de membrana de 0.22 µm.
8. Se realiza el control de calidad, ver resultados en la **Tabla 11**
9. Envasado.
10. Rotulado y almacenamiento hasta su uso.

3.6.6 Identificación de metabolitos secundarios del aceite esencial de limón

1. REACCIONES DE COLORACIÓN Y PRECIPITADO

En la **Tabla 10**, se muestran los diferentes reactivos; preparación de los mismos y la coloración o precipitado que muestran al reaccionar con los distintos grupos funcionales de la muestra, con los cuales se determinará cualitativamente los distintos compuestos presentes en el aceite esencial del limón criollo.

Tabla 10. Reacciones de coloración y precipitado para determinación de grupos funcionales

Metabolitos secundarios	Reactivo	Procedimiento	Coloración
Taninos	Gelatina	10 gts. Ms + 2 gts. De reactivo	Precipitado intenso
Aminoácidos	Ninhidrina	10 gts. Ms + 2 gts. De reactivo	Vira a violeta
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	R: 1 gt FeCl ₃ /100 mL H ₂ O. 10 gts. Ms + 1 gt R.	Colores intensos
Quinonas	NaOH	10 gts. Ms + 2 gts. De reactivo	Tonos rojos
Terpenoides	Liebermann Burchard	10 gts. Ms + pocas gotas de HOAc + 3 mL de Ac ₂ O/H ₂ SO ₄ proporción(1:50)	Verde, azul verdoso (vira rojo o azul)
Alcaloides	Mayer	10 gts. Ms + 2 gts. De reactivo	Precipitado blanco
	Draguendorff	10 gts. Ms + 2 gts. De reactivo	Precipitado naranja

Fuente: Lock O, (1994).(62)

El análisis se realizó directamente con el aceite esencial destilado y filtrado y los resultados del análisis se detallan en la **Tabla 12**.

2. CROMATOGRAFÍA DE GASES / ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)

Dos mililitros de muestra se llevó al Laboratorio de Investigación y Certificación (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), para la identificación química de los metabolitos secundarios. Para el análisis se utilizó un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de masas (CG/MS) marca SHIMADZU, modelo: SHIMADZU, GC-2010 Plus; el análisis se realizó bajo las siguientes condiciones: Columna GC: RESTEK, RTX-5MS 30 m de largo; 0.25 mm de diámetro interno (ID); tamaño de poro 0.25 μm , temperatura inicial 50 °C, 3 °C/min., temperatura final 250 °C (0.5 min), temperatura de inyección 220 °C y volumen de inyección de 200 μL . El gas transportador fue Helio UHP (5.0). La lista de los compuestos del aceite esencial fue obtenida gracias al resultado probabilístico del software del equipo GC-MS solution de SHIMADZU utilizando la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). La probabilidad se mide por el Similarity Index (SI) que se encuentra en cada espectro de masa.

3.6.7 Obtención y crianza de los mosquitos de *Aedes aegypti*

Se obtuvieron 50 larvas gracias a la donación realizada por el Instituto Nacional de Salud (INS), área de Entomología. Estas fueron llevadas en dos probetas cónicas graduadas herméticamente cerradas al laboratorio de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), donde se les acondicionó un larvario elaborado a partir de un taper de plástico transparente de 25 x 17 x 8 cm (largo, ancho y alto) con tapa, la cual se modificó haciendo una apertura en la misma de 8 x 25 cm, el mismo que se cubrió con una tela (Tul) y se pegó usando cinta de aluminio (**Anexo 16**); al envase antes mencionado se le agregó 600 mL de agua potable previamente hervida y en reposo por dos días con la finalidad de bajar las proporciones de cloro (11), el agua se renovó cada dos días para evitar la propagación de hongos que podrían matar las larvas, el larvario se lavó con abundante agua potable y las larvas se tamizaron y limpiaron con agua corriente antes de ser devueltas al larvario, durante el estadio de larvas se les alimentó con media tableta diaria de levadura de cerveza Mason

natural[®] previamente pulverizada y disuelta en 50 mL de agua hervida fría.(18) Se monitoreó constantemente hasta observar que estas cambien a estadio de pupas.

Las pupas se retiraron diariamente, a medida que estas iban apareciendo en el recipiente usando una pipeta de Pasteur plástica previamente recortada en la punta para aumentar su orificio y facilitar la extracción, hacia un vaso descartable pequeño con aproximadamente tres cuartas partes de agua, el mismo que lo colocó dentro de una cámara de crianza donde se produjo la eclosión.

La cámara de crianza estaba fabricada a partir de una caja de tecnopor de 20 x 22 x 19 cm (largo, ancho y alto) con recortes cuadrados en los cinco lados superiores los mismos que estaban cubiertas de tela (tul), en uno de los lados se realizó un orificio donde se colocó una manga fabricada de la misma tela, por la que se realizó toda manipulación (**Anexo 18**). Finalmente cuando estaban en estado adulto se pasaron hacia otra cámara de crianza de mayor tamaño con ayuda de una manguera de transporte.

Esta segunda cámara de crianza se fabricó a partir de una bandeja de plástico transparente de 32 x 23 x 19 cm (largo, ancho y alto) con orificios en tres de sus lados los mismos que estaban cubiertas de tela (tul) y pegada firmemente con cinta de aluminio. (**Anexo 24**). También dentro de la jaula zancudera de le colocó el alimento; que consistía en agua azucarada al 10% (30 mL) dentro de un vial de 100 mL trasparente y como dispensador un mechón elaborado de algodón por dentro y envoltura de gasa estéril el mismo que por capilaridad asciende el alimento; tanto la solución azucarada y el dispensador se cambiaron cada tres días para evitar contaminación; además de ello, las hembras requieren de alimentación sanguínea, propiedad que les permite madurar sus huevos, para el cual se expuso el antebrazo y mano desnudo del voluntario durante unos minutos hasta observar que todas se hayan alimentado, este proceso se realizó tres veces por semana (18), (11) (**Anexo 25**).

Para la recolección de los huevos se colocó una trampa de oviposición (**Anexo 26**), fabricado de un vaso mediano de plástico, adherido a su pared interna un trozo de

papel toalla embebido en 40 mL de agua; a los dos días se realiza la recolección del papel que contiene los huevos, se dejó secar a temperatura y humedad ambiental por dos días para facilitar la maduración de los mismos y se almacenaron hasta su utilización.

Los huevos maduros impregnados en el papel se sumergieron en 600 mL de agua potable hervida y reposada, dentro del larvario. Los primeros huevos eclosionaron a partir del tercer día y se criaron bajo las condiciones antes mencionadas, a partir de estos se obtuvo la segunda generación de mosquitos, los que se utilizaron para realizar el efecto repelente, cabe recalcar que se criaron especímenes independientemente para cada voluntario con el fin de evitar algún tipo de contaminación.

3.6.8 Proceso de separación de las hembras de *Aedes aegypti*

Los mosquitos hembras se separaron de los machos usando una “manguera de transporte”, este instrumento se fabricó caseramente a partir de un filtro de gasolina, para motocicleta nuevo, al mismo que se le conectó a cada lado de las válvulas, dos mangueras plásticas transparentes, de 23 y 30 cm de largo y de un diámetro adecuado para que encaje perfectamente a presión, además a la manguera de succión (de entrada), se le adaptó un trozo de tela tul, con la finalidad de evitar que los mosquitos lleguen al filtro y queden atrapados (**Anexo 23**), para posteriormente colocarlos en los “frascos de exposición”, los mismos se fabricaron a partir de táperes de plástico transparente, que tenían forma cilíndrica de 20 cm de alto por 40 cm de diámetro, modificados de tal manera que la base estaba cubierto con una tela tul y adherida con cinta de aluminio, mediante la cual se realizó la exposición. La tapa se mantuvo cerrada pero se le realizó una pequeña perforación por la cual nos permitió ingresar a los mosquitos y cerrado con una cinta de aluminio para mantenerlo como una puerta de tal manera que se pudiera abrir y cerrar cuando sea necesario (**Anexo 27**). El método de transporte consistió en aspirar con la boca solo a los mosquitos que lleguen a alimentarse de sangre, para el cual se acercó el antebrazo desnudo del voluntario hacia la cámara de crianza por medio de la tela tul

que recubre la base de la jaula; además se observó las características físicas que estas presentan, como por ejemplo, las antenas plumosas que las diferencian de los machos. (Figura 8).

3.6.9 Selección de las hembras de *Aedes aegypti*, ávidas de alimento.

Se determinó colocando los “frascos de exposición” antes mencionados, los mismos que contenían 10 mosquitos hembras de aproximadamente 3 a 6 días de edad, sobre el antebrazo desnudo del voluntario destinado al experimento; donde se observó el aterrizaje de los mosquitos sobre la zona de exposición pero se los retiró antes que estos tomen una bocanada de sangre; al final se seleccionaron y rotularon solo a los frascos que contenían a los mosquitos con mayor cantidad de aterrizajes, y descartando a los que presentaron la menor actividad. Este proceso se realizó diariamente a medida que iban eclosionando las hembras adultas, entre las 8:00 y 18:00 horas, considerando el horario de alimentación de estos especímenes.

3.6.10 Unidades experimentales del estudio

Para el análisis se utilizaron 1,710 mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti*, de aproximadamente 3 a 6 días de edad y privadas de alimento sanguíneo. Se establecieron cuatro grupos experimentales, de las lociones preparadas a base del aceite esencial de limón al 2, 4, 10 y 15%; dos grupos control: Control positivo (C+) se realizó con una loción de DEET 15% para ello se utilizó el repelente sintético y comercial de la marca Floresta EXTREMO® del Laboratorio PORTUGAL S.R.L. Con fecha de vencimiento mayo de 2020 y N° de lote 1054677 y Control negativo (C-) se realizó sin tratamiento alguno y bajo las mismas condiciones experimentales. El efecto repelente se realizó mediante el método de cebo humano de Effiom et al (2012) (15), (18), (14), (11), (63). Los análisis se realizaron en cuatro repeticiones usando voluntarios distintos para cada experimento.

3.6.11 Preparación de la zona de exposición

La preparación de la zona de exposición, se realizó lavando la cara interna del antebrazo izquierdo del voluntario, con jabón neutro y enjuagado con abundante agua potable, posteriormente se secó con papel toalla.

3.6.12 Bioensayo de laboratorio

El bioensayo se inicia con el grupo control negativo (C-) (sin tratamiento), para el cual se tomó al azar un “frasco de exposición” que contenía los mosquitos destinados al experimento y se colocó posando la base del mismo sobre la zona de exposición del voluntario durante tres minutos, posteriormente los mosquitos fueron sacrificados usando el vapor de agua producido por una hervidora eléctrica, luego se contabilizó y registro a cada uno de ellos.

Para los grupos experimentales al 2, 4, 10 y 15 por ciento y el control positivo (C+), se aplicó el tratamiento correspondiente de forma homogénea sobre la zona de exposición del voluntario y se dejó secar al ambiente durante un minuto, seguidamente se realizó la exposición por 3 minutos. Los análisis se repitieron en intervalos de 30 minutos, y hasta observar que el total de moquitos destinados para cada periodo de tiempo se hayan alimentado.

También se tomó como dato el tiempo en segundos, que transcurre desde el inicio de la exposición hasta que ocurra la primera y segunda picadura; al finalizar cada periodo experimental los especímenes fueron sacrificados exponiéndolos directamente sobre el vapor de agua producida por una hervidora eléctrica justo al momento que alcanzó su máximo punto de ebullición, seguidamente se los retiró y vertió sobre una ficha de recolección de datos (**Anexo 29**) donde se los aplastó colocándolos ordenadamente sobre cada casillero de la hoja de recolección de datos, de tal manera que produjeran un frotis de sangre solo si estos se habían alimentado, de lo contrario se dedujo que no lo habían hecho; luego fueron analizadas bajo el siguiente criterio: (con contenido sanguíneo = no repelidos; sin contenido sanguíneo = repelidos).

Todos los ensayos se repitieron por 4 veces gracias al apoyo de 4 voluntarios (13) hombres y mujeres de raza mestiza entre los 18 y 28 años de edad, estos reportan no tener alergias conocidas a medicamentos ni a picadura de mosquitos, y se sometieron a dicho estudio previa firma de su consentimiento (**Anexo 19 - Anexo 22**), ya que se les garantizó que los mosquitos no representaban riesgo alguno contra su salud, teniendo en cuenta que estos fueron criados bajo cautiverio y exentos de contagio; accediendo así ser parte del experimento.

3.6.13 Análisis del tiempo de protección eficaz

Se considera un tiempo de protección completo, al tiempo que transcurre desde el momento que se aplica el tratamiento hasta que ocurra la segunda picadura continua en el mismo periodo de tiempo (64), (65), (66).

3.6.14 Determinación del porcentaje de repelencia

Para la determinación del porcentaje de repelencia de cada tratamiento se contabilizaron los mosquitos repelidos, y se analizaron bajo la siguiente formula (13), (18), (67), (64). Los resultados se muestran en la **Figura 35**.

$$\% \text{ de repelencia} = \frac{(C - T)}{C} 100$$

Dónde: C= Número de mosquitos que se alimentaron de la piel no tratada y T= Número de mosquitos que se alimentaron de la piel con tratamiento.

3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Entre las técnicas usadas para el propósito de dicho estudio está la observación sistemática usada para evaluar el contenido gástrico de los especímenes y el experimento propiamente dicho.

Como instrumentos de recolección de datos, se usaron fichas especialmente diseñadas para el experimento, con la finalidad de facilitar y garantizar la veracidad de los datos. (**Anexo 30 - Anexo 53**)

3.8 Procesamiento de datos

Los datos obtenidos del experimento, fueron trasladados a un archivo en Excel versión 2016; luego de verificada la consistencia de los mismos, la información se trasladó a un fichero de SPSS versión 24.0; mediante el cual se calcularon las estadísticas descriptivas como la media y la desviación estándar además de los intervalos de confianza. La contrastación de las hipótesis se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, y las comparaciones múltiples de Games y Howell para comparar las medias, finalmente y para su mejor entendimiento todo fue acompañado de gráficos de barras y de líneas, los cuales se realizaron con el programa Excel versión 2016, para luego ser editados mediante el programa Word 2016.

CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Presentación de resultados

4.1.1 Extracción y rendimiento del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

Con la aplicación del método de destilación por arrastre de vapor de agua a temperatura y presión controlada, se logró un rendimiento de 0.35 por ciento v/p.

4.1.2 Control de calidad de las lociones preparadas

Tabla 11. Análisis de control de calidad de las formulaciones

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO DE LAS FORMULACIONES			
		Loción al 2%	Loción al 4%	Loción al 10%	Loción al 15%
Color	-----	Trasparente	Trasparente	Lechoso	Lechoso
Olor	-----	Característico a limón	Característico o a limón	Característico o a limón	Característico o a limón
Homogeneidad	-----	Si	Si	Si	Si
pH	5.5 – 7.5	6.5	6.5	6.8	6.5
Partículas extrañas	Ninguno	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Estado físico	-----	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido

Fuente: Elaboración propia.

4.1.3 Screening fitoquímico del aceite esencial de limón

Tabla 12. Resultados del screening fitoquímico del aceite esencial de limón criollo

Metabolitos secundarios	Reactivo	Coloración	Resultado	Descripción
Taninos	Gelatina	Precipitado intenso	–	Se observó separación de dos fases, mas no un precipitado
Aminoácidos	Ninhidrina	Vira a violeta	–	No se observaron cambios
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Colores intensos	++	Tenue color marrón
Quinonas	NaOH	Tonos rojos	–	No se observaron cambios
Terpenoides	Liebermann Burchard	Verde, azul verdoso (vira rojo o azul)	+++	Se observó un intenso color rojo violáceo
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco	–	No se observa cambios, solo separación de dos fases
	Draguendorff	Precipitado naranja	–	No se observa cambios, solo separación de dos fases
Leyenda: (-) Negativo; (+) Positivo leve; (++) Positivo intermedio; (+++) Positivo muy marcado.				

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 12**, evidencia la presencia de compuestos fenólicos en la que se observa un tenue color marrón al ser sometida la muestra al reactivo de tricloruro férrico; además, se evidencia la presencia muy marcada de compuestos terpenoides presenciando un color violáceo intenso al ser sometida la muestra al reactivo de Liebermann Burchard.

4.1.4 Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

El detalle de los componentes químicos identificados mediante la Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), se pueden observar en la **Tabla 13**, y en las **Figura 9 - Figura 31**.

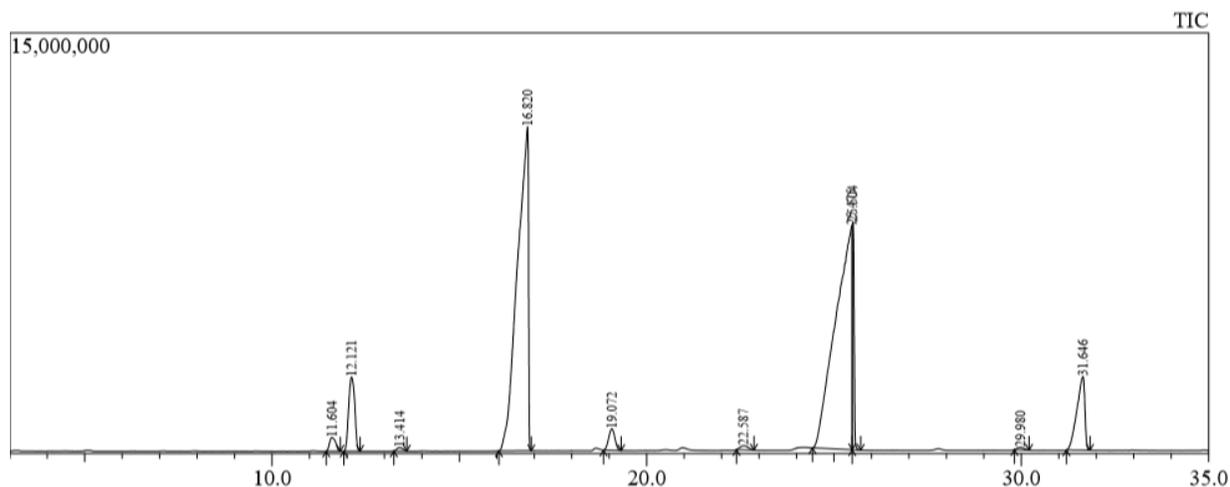


Figura 9. Cromatograma de gases del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle.

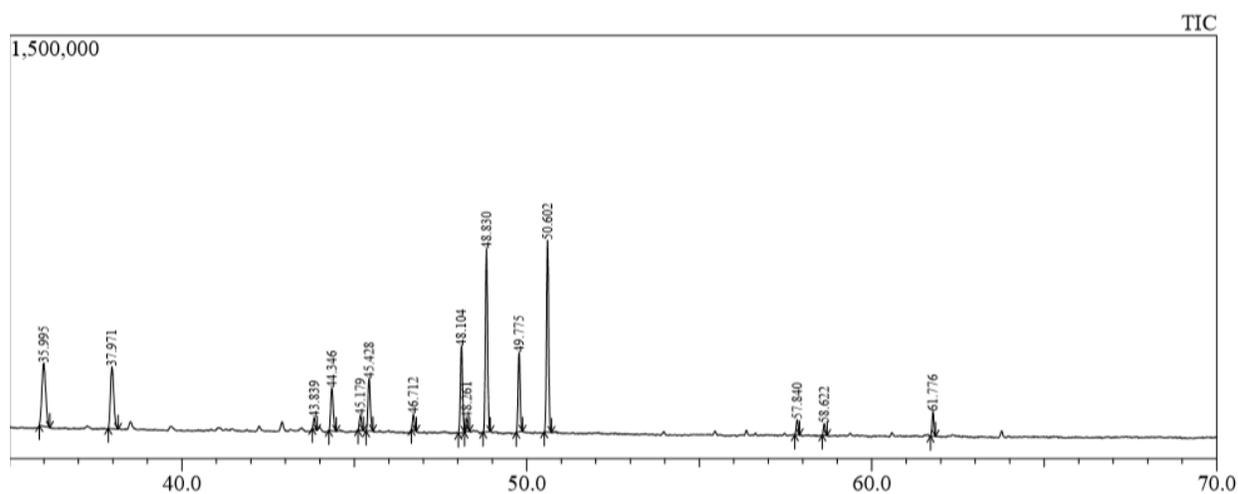


Figura 10. Continuación de la **Figura 9**.

Tabla 13. Lista de los componentes químicos del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle.

NÚMERO	COMPONENTES QUÍMICOS	TIEMPO DE RETENCIÓN (T.R.) (en minutos)	% DE ÁREA RELATIVA
1	α -tujona	11.604	0.91%
2	α -pineno	12.121	4.91%
3	canfeno	13.414	0.23%
4	β -pineno	16.820	38.69%
5	β -mirceno	19.072	1.46%
6	terpinoleno	22.587	0.37%
7	D-limoneno	25.475	44.48%
8	β -cis-ocimeno	29.980	0.18%
9	γ -terpineno	31.646	6.36%
10	linalol	37.971	0.24%
11	verbenol	43.839	0.03%
12	terpinen-4-ol	44.346	0.13%
13	α -cyclociral	45.179	0.04%
14	α -terpineol	45.428	0.15%
15	decanal	46.712	0.04%
16	cis-geraniol	48.104	0.22%
17	β -citronellol	48.261	0.03%
18	cis-citral	48.830	0.47%
19	citral	50.602	0.47%
20	cariofileno	57.840	0.03%
21	α -bergamoteno	58.622	0.03%
22	α -farneseno	61.776	0.05%

Fuente: LABICER- UNI

Tabla 14. Clasificación de los compuestos químicos identificados en el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle.

Monoterpenos Hidrocarburos	Monoterpenos Oxigenados	Sesquiterpenos Hidrocarburos
α -tujona	linalol	cariofileno
α -pineno	verbenol	α -bergamoteno
canfeno	terpinen-4-ol	α -farneseno
β -pineno	α -terpineol	
β -mirceno	cis-geraniol	
terpinoleno	β -citronellol	
D-limoneno	α -cyclociral	
β -cis-ocimeno	decanal	
γ -terpineno	cis-citral	
	citral	

Fuente: Elaboración propia

4.1.5 Espectro y estructura química de los componentes encontrados en el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

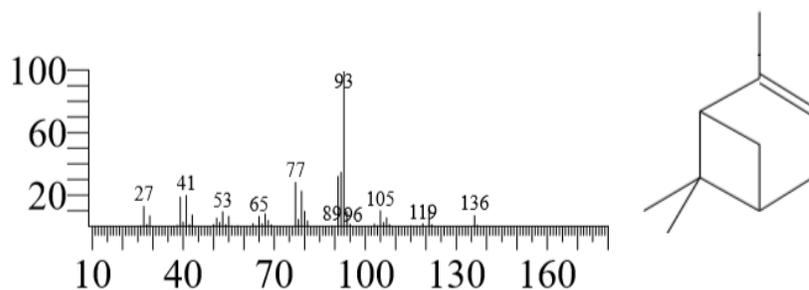


Figura 11. α -pineno

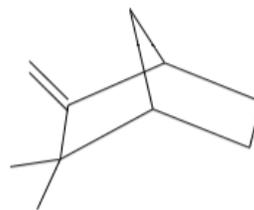
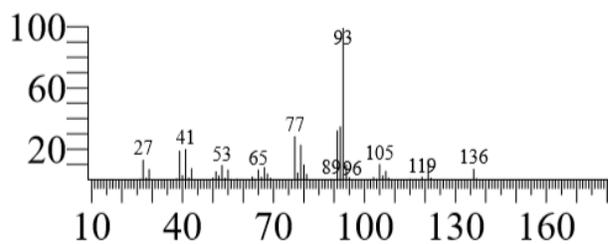


Figura 12. canfeno

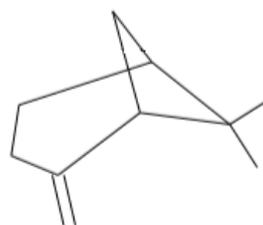
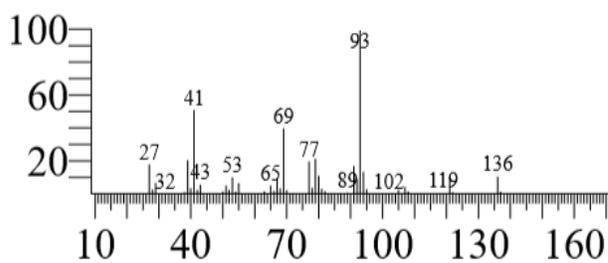


Figura 13. beta-pineno

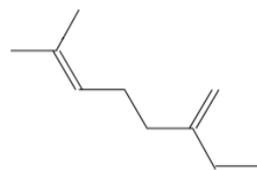
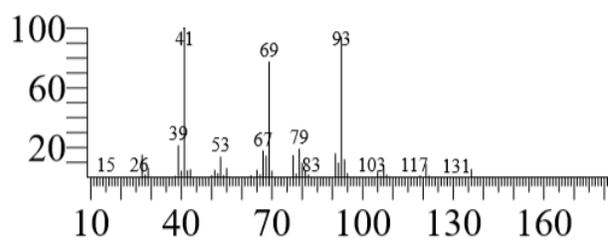


Figura 14. beta-mirceno

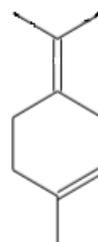
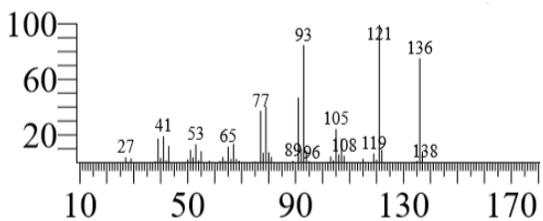


Figura 15. terpinoleno

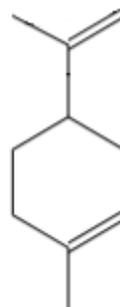
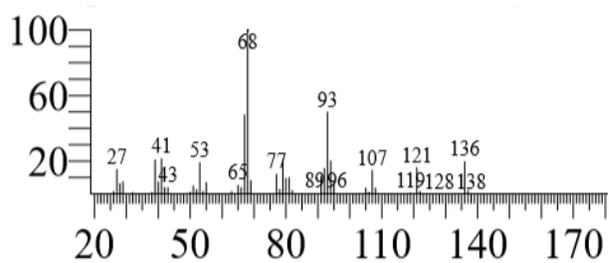


Figura 16. D-limoneno

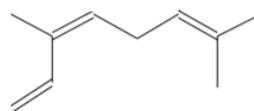
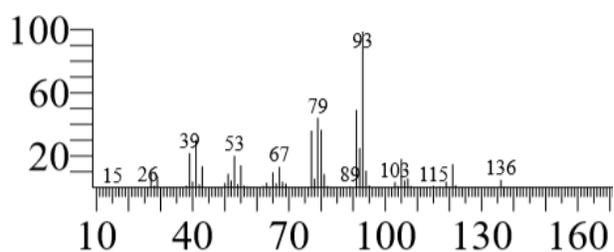


Figura 17. β-cis-ocimeno

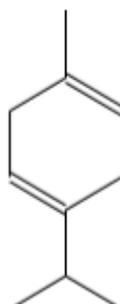
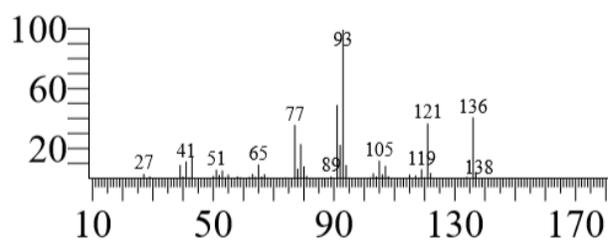


Figura 18. γ-terpineno

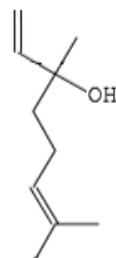
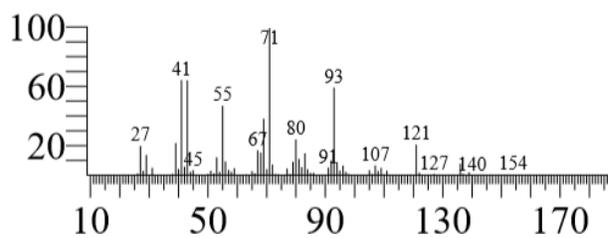


Figura 19. linalol

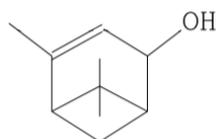
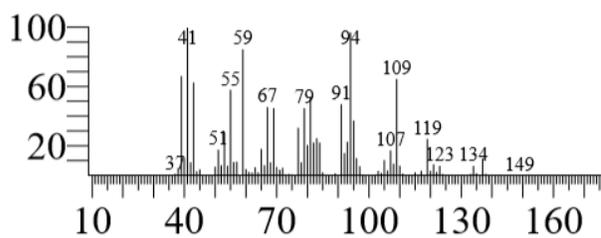


Figura 20. verbenol

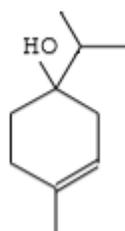
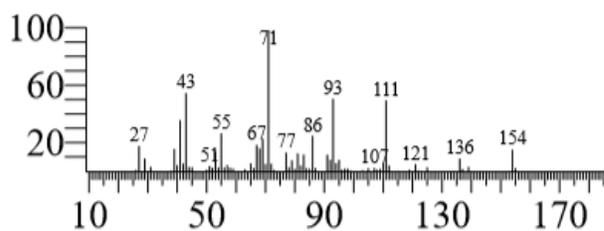


Figura 21. terpinen-4-ol

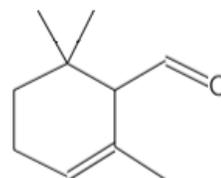
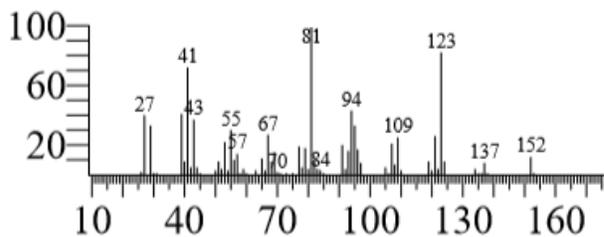


Figura 22. α -cyclociral

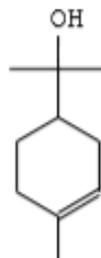
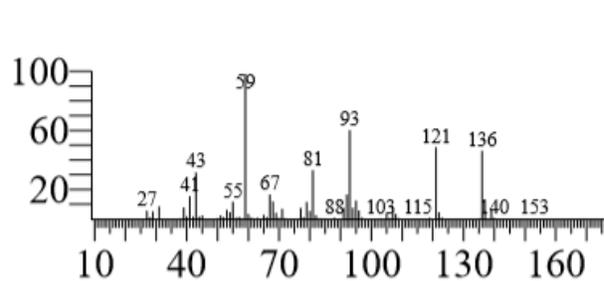


Figura 23. α -terpineol

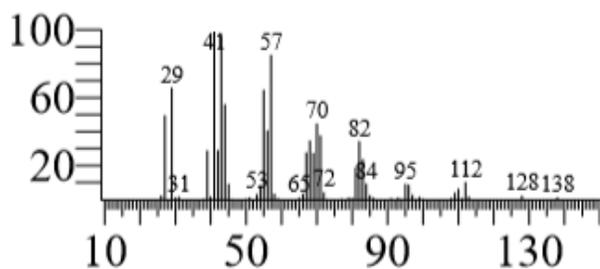


Figura 24. decanal

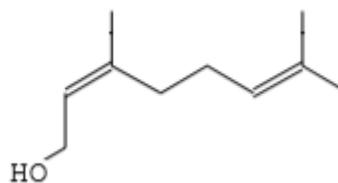
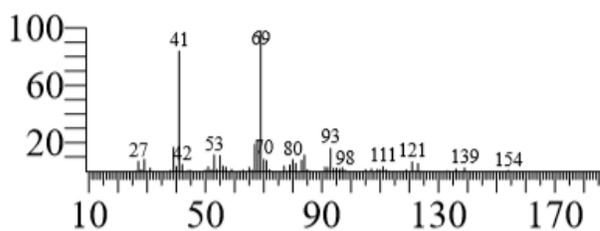


Figura 25. cis-geraniol

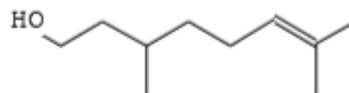
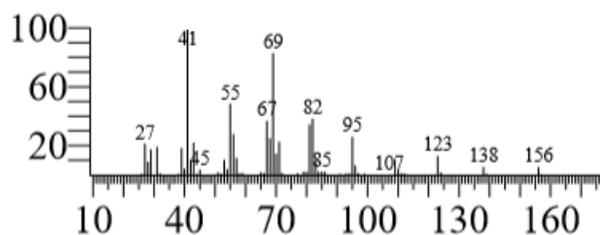


Figura 26. beta-citronellol

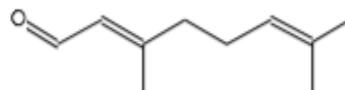
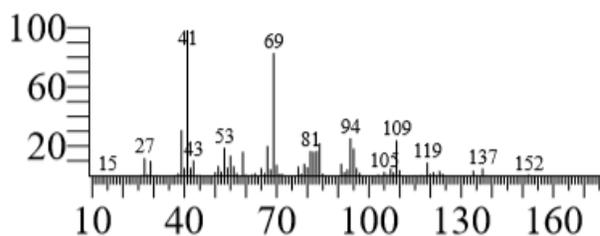


Figura 27. cis-citral

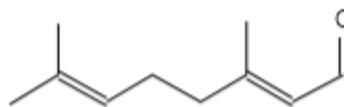
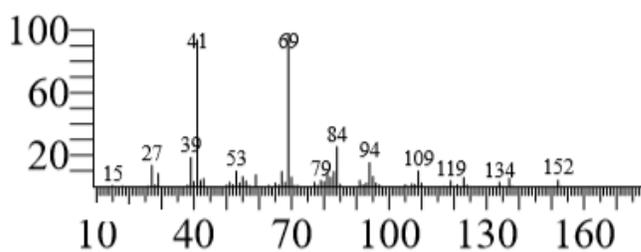


Figura 28. citral

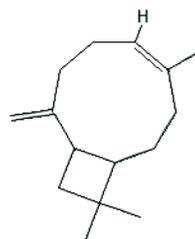
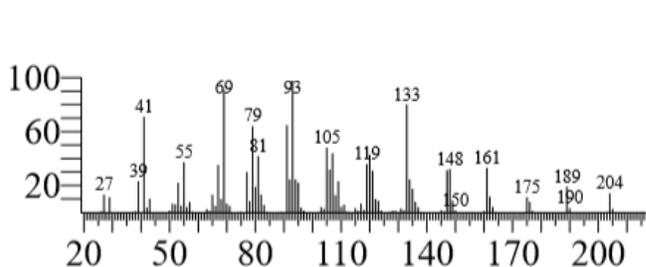


Figura 29. cariofileno

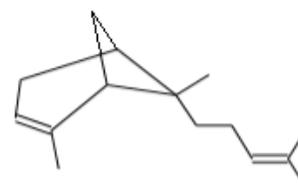
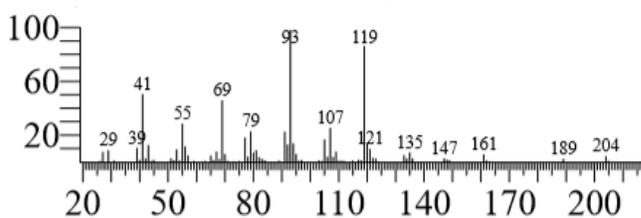


Figura 30. α -bergamoteno

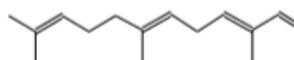
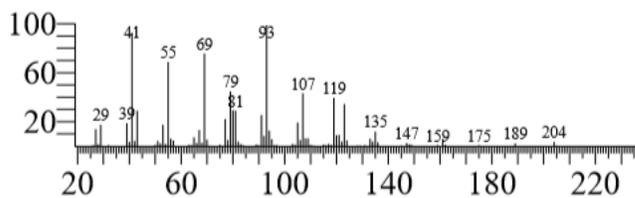


Figura 31. α -farneseno

4.1.6 Resultados del test de repelencia

A. CANTIDAD PROMEDIO DE MOSQUITOS REPELIDOS

Tabla 15. Estadísticas descriptivas de repelencia y Tiempo de protección eficaz por sujeto.

Sujeto	n	Total mosquitos repelidos			Tiempo de protección eficaz (en minutos)		
		Media	Desviación estándar	p valor ANOVA	Media	Desviación estándar	p valor ANOVA
Sujeto 1	6	58,17	32,96	0,964	130,0	86,26	0,951
Sujeto 2	6	49,83	29,49		100,0	72,66	
Sujeto 3	6	50,67	31,29		105,0	84,32	
Sujeto 4	6	50,67	29,32		105,0	84,32	
Total	24	52,33	28,93		110,0	77,46	

Fuente: Elaboración propia.

- La **Tabla 15** nos muestra el número de mosquitos repelidos en promedio por cada sujeto en las 6 pruebas (Control negativo, loción 2%, loción 4%, loción 10%, loción 15% y DEET) no se observaron diferencias significativas entre sujetos (p valor = 0.964), tampoco se observan diferencias en cuanto al Tiempo de protección eficaz (p valor = 0.951)

Tabla 16. Número promedio de mosquitos repelidos por tiempo

Tratamiento	Media de mosquitos repelidos por minuto											Total
	0´	30´	60´	90´	120´	150´	180´	210´	240´	270´	300´	
Control negativo	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Loción 2%	10.0	10.0	10.0	7.3	5.0	1.8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	44.3
Loción 4%	10.0	10.0	10.0	10.0	8.5	5.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	55.8
Loción 10%	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.5	7.5	1.5	0.0	0.0	0.0	68.5
Loción 15%	10.0	10.0	10.0	8.3	6.3	3.8	1.8	1.3	0.0	0.0	0.0	51.3
DEET	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.3	5.0	0.0	94.3
Total	8.8	8.3	8.3	7.6	6.6	5.0	3.6	2.1	1.5	0.8	0.0	52.8

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 16** muestra los valores promedio de mosquitos repelidos con la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en concentraciones de 2, 4, 10 y 15 por ciento comparados con el control negativo y la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET).
- Se observa que la loción a 2 y 4 por ciento presentan cierta actividad hasta pasados los 180 minutos con 0.3 y 2.3 mosquitos repelidos en promedio respectivamente, mientras que las lociones al 10 y 15 por ciento presentan actividad hasta pasado los 210 minutos con 1.5 y 1.3 mosquitos repelidos en promedio respectivamente, en contraste la loción (DEET) presentó actividad hasta pasados los 270 minutos.

Para mayor entendimiento se representa en la **Figura 32**.

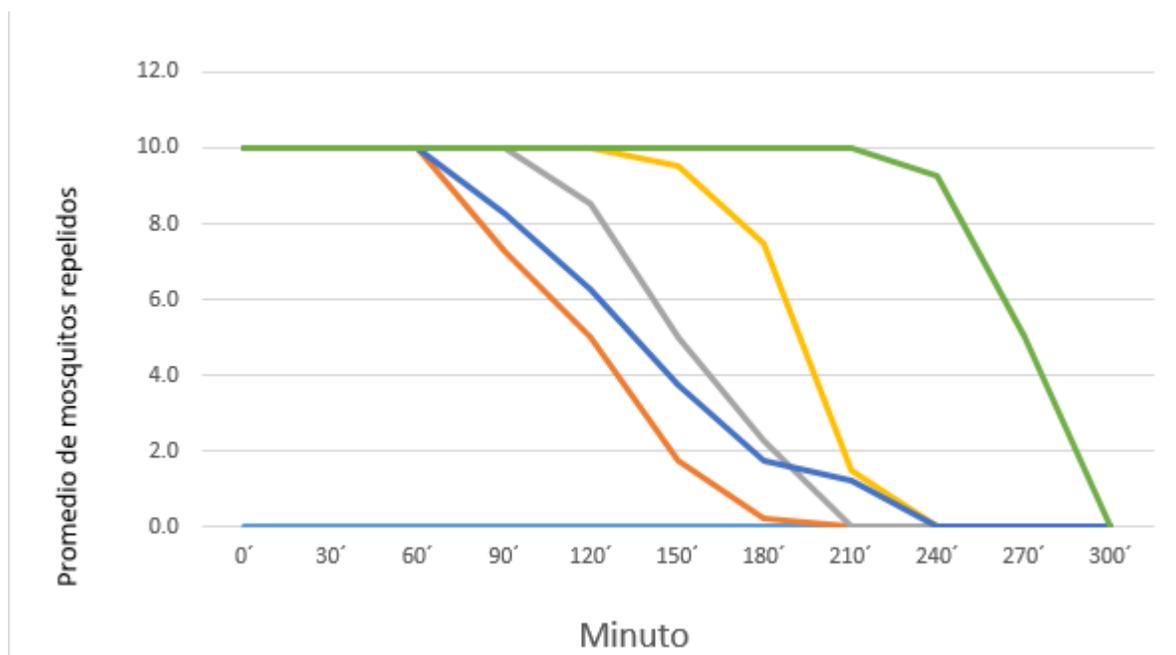


Figura 32. Evolución del número promedio de mosquitos repelidos en los intervalos de exposición

Fuente: Elaboración propia

Tabla 17. Estadísticas descriptivas de la cantidad total de mosquitos repelidos

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar (s)	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Control negativo	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Loción 2%	4	44,25	7,14	32,90	55,60	38,0	54,0
Loción 4%	4	55,75	9,18	41,14	70,36	45,0	66,0
Loción 10%	4	68,50	3,42	63,06	73,94	65,0	73,0
Loción 15%	4	51,25	14,91	27,53	74,97	39,0	72,0
DEET	4	94,25	2,87	89,68	98,82	92,0	98,0
Total	24	52,83	28,93	40,62	65,05	0,0	98,0

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 17** muestra que la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en concentraciones de 10 por ciento presenta, una mayor repelencia promedio por sujeto, 68.5 mosquitos durante todo el estudio, seguido de la loción al 4 por ciento; de otro lado la loción DEET mostró un valor superior con 94.25 mosquitos repelidos en promedio por cada sujeto.
- De otro lado se observa que la loción al 15 por ciento presenta una mayor variabilidad entre sujetos ($s=14.91$) lo cual podría suponer un problema de homogeneidad en las respuestas por sujeto.
- También se muestra los valores promedios estimados al 95 por ciento de confianza, la última columna indica que la mayor cantidad de repelencia fue de 98 mosquitos repelidos en uno de los sujetos cuando fue tratado con DEET y el valor mínimo de 0 cuando no recibió ninguna protección.

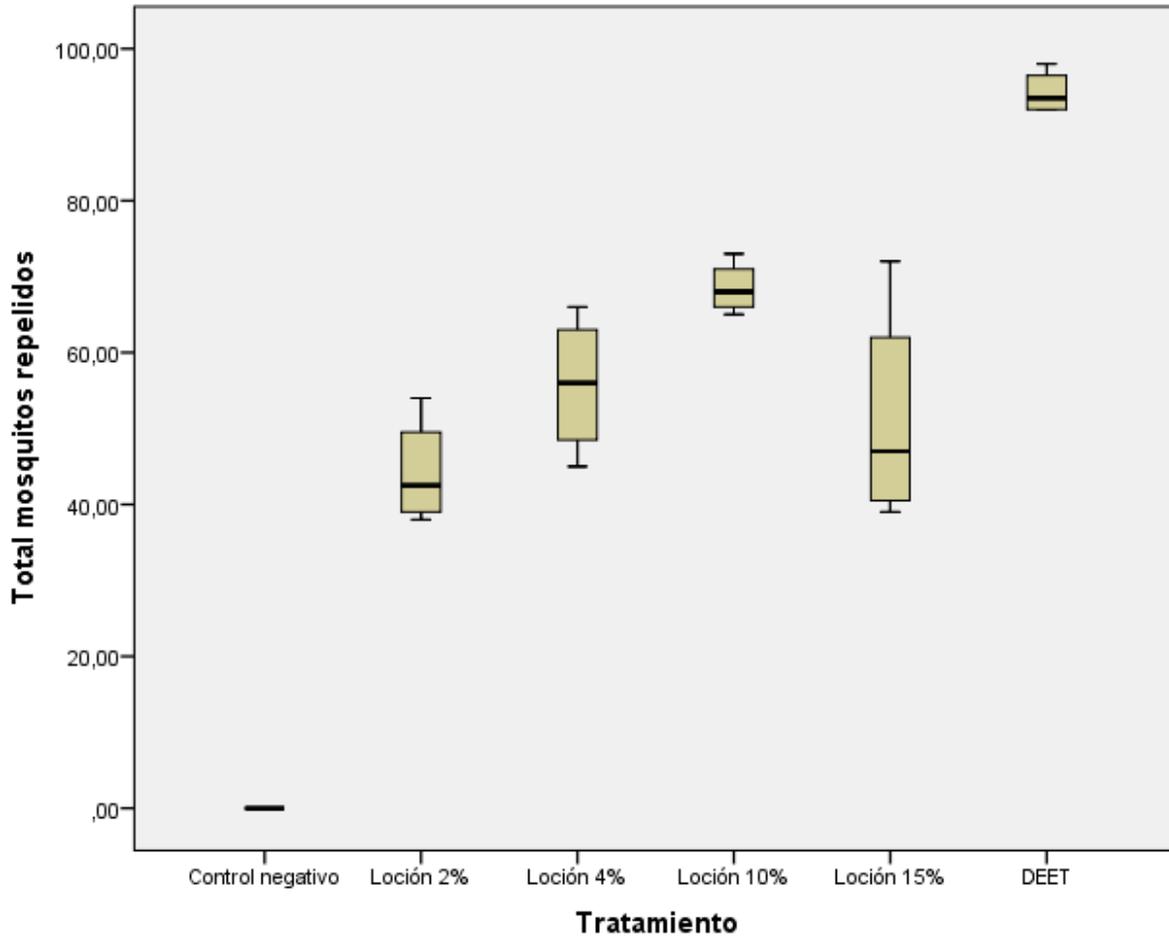


Figura 33. Total de mosquitos repelidos

- La **Figura 33**, muestra un diagrama de cajas donde se evidencia una mayor variabilidad (amplitud de caja) en los casos donde se aplicó la loción al 15 por ciento.

B. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REPELENCIA

Para cuantificar el porcentaje de repelencia se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ de repelencia} = \frac{(C - T)}{C} 100\%$$

Dónde: C= Número de mosquitos que se alimentaron de la piel no tratada (Control negativo) y T= Número de mosquitos que se alimentaron de la piel con tratamiento. Los resultados por intervalo de tiempo se muestran a continuación en la **Figura 34**.

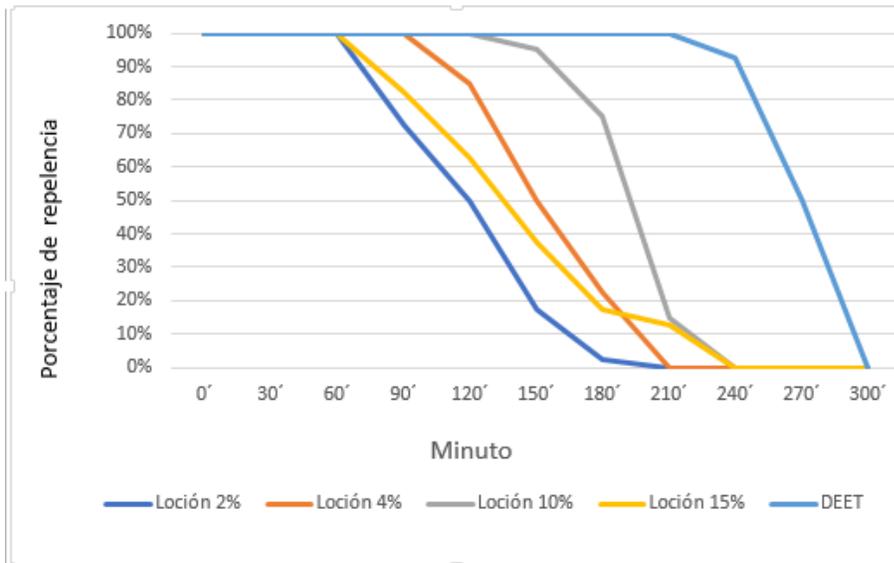


Figura 34. Evolución del porcentaje de repelencia en los intervalos de exposición

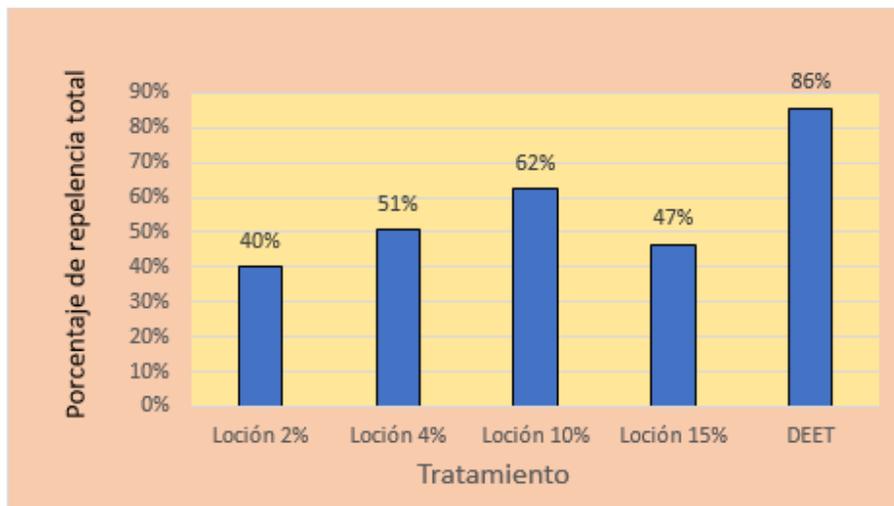


Figura 35. Porcentaje de repelencia total de los tratamientos con respecto al grupo control

- ❖ En la **Figura 35** se observa el mayor porcentaje de repelencia de la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en la concentración de 10 por ciento con una repelencia del 62 por ciento, la cual no es comparable al DEET el cual alcanza el 86 por ciento.

C. TIEMPO DE PROTECCIÓN EFICAZ

Se considera un tiempo de protección eficaz, al tiempo en minutos que transcurre desde el momento que se aplica el tratamiento hasta que ocurra la segunda picadura continua en el mismo periodo de tiempo (64), (65), (66).

Tabla 18. Estadísticas descriptivas del tiempo de protección eficaz (en minutos)

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Control negativo	4	0,00	0,00	0	0
Loción 2%	4	60,00	0,00	60	60
Loción 4%	4	120,00	24,49	90	150
Loción 10%	4	157,50	15,00	150	180
Loción 15%	4	90,00	42,43	60	150
DEET	4	232,50	15,00	210	240

Fuente: Elaboración propia

- ❖ La **Tabla 18** muestra que los tiempos promedio de protección eficaz en minutos; considerado como tiempo de protección eficaz al tiempo que transcurre desde el momento que inicia la exposición hasta antes de una segunda picadura consecutiva en el mismo periodo de tiempo expuesto. En el caso de la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en concentraciones de 10 por ciento, se obtuvo un tiempo promedio de repelencia de 157.5 minutos.

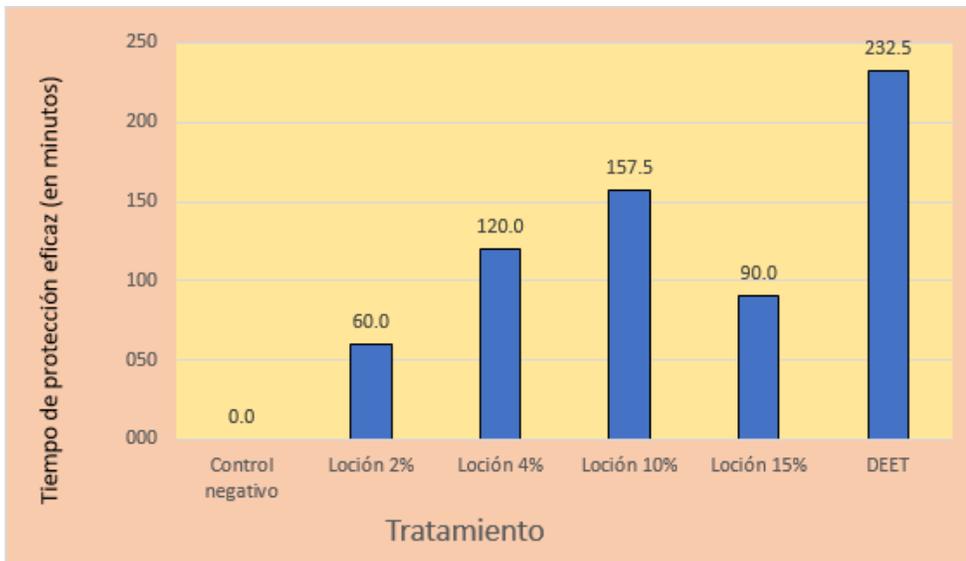


Figura 36. Distribución del tiempo de protección eficaz promedio en minutos

- ❖ La **Figura 36** muestra que el tiempo de protección eficaz de la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, crece directamente proporcional a la concentración de la loción hasta llegar a un máximo de 157.5 min, para una concentración del 10 por ciento y luego decae a 90 min, para la concentración del 15 por ciento.

4.2 Contrastación de hipótesis

4.2.1 Cantidad promedio de mosquitos repelidos

H_0 : Las varianzas son iguales (homogéneas)

H_1 : Las varianzas no son iguales (heterogéneas)

- Para contrastar estas hipótesis primero se realiza el ritual de la significancia estadística (estadístico de Levene) que mediante el cual se decide entre una prueba paramétrica o una no paramétrica.

Tabla 19. Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,616	5	18	0,019

Fuente: Elaboración propia

- ❖ La **Tabla 19** permite concluir que las variabilidades o dispersiones observadas dentro de cada tratamiento son diferentes, e imposibilita utilizar una prueba ANOVA, por lo cual se trabajó con una prueba no paramétrica.

H₀: La cantidad promedio de mosquitos repelidos son iguales (No existe actividad repelente)

H₁: La cantidad promedio de mosquitos repelidos no son iguales (Si existe actividad repelente)

- Para contrastar estas hipótesis primero se verificó el supuesto de homogeneidad de varianzas, para elegir entre una prueba ANOVA (paramétrica) o una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis).

Tabla 20. Prueba de Kruskal Wallis

	Total mosquitos repelidos
Chi-cuadrado	19,468
gl	5
Sig. asintótica	0,002

Fuente: Elaboración propia

❖ La **Tabla 20**, muestra la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis proporcionado por el programa estadístico SPSS, el cual arrojó un p valor menor a 0.05 ($p = 0.002$) por lo cual se rechaza la hipótesis nula y permite concluir que si existe un efecto o actividad repelente en al menos alguno de los tratamientos. Para determinar que tratamiento(s) es el que presentó un efecto, se usaran las comparaciones múltiples de Games-Howell las cuales no requieren varianzas homogéneas.

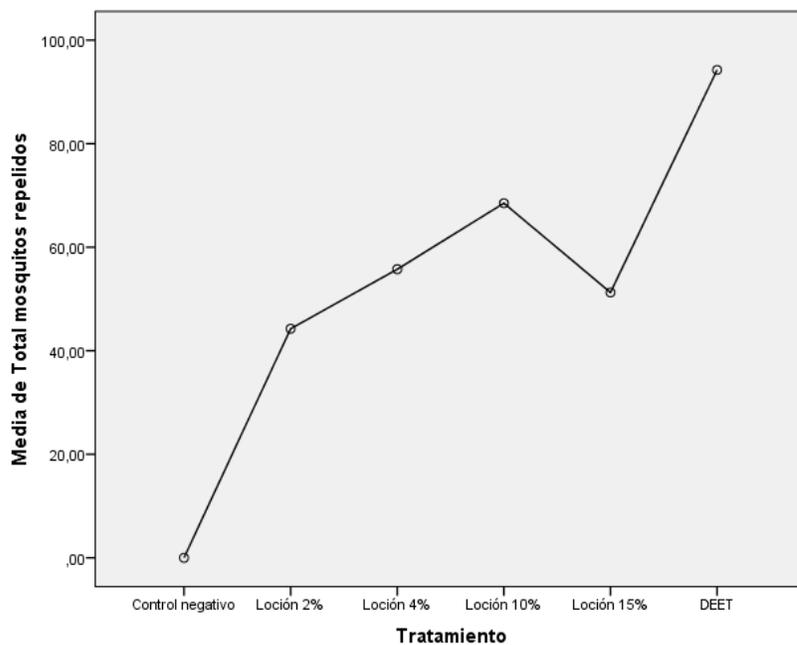


Figura 37. Distribución del valor medio del total de mosquitos repelidos por Tratamiento

❖ La **Figura 37**, muestra una gráfica de línea, donde se evidencia un aumento de la actividad repelente conforme aumenta la concentración de la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, contra mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti*, desde 2% hasta un valor máximo en 10%, para luego disminuir cuando la concentración es del 15%.

Tabla 21. Comparaciones múltiples Games-Howell Total mosquitos repelidos

(I) Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Control negativo	Loción 2%	-44,250*	0,005
	Loción 4%	-55,750*	0,006
	Loción 10%	-68,500*	0,000
	Loción 15%	-51,250*	0,030
DEET	Loción 2%	50,000*	0,001
	Loción 4%	38,500*	0,011
	Loción 10%	25,750*	0,000
	Loción 15%	43,000*	0,044

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

- ❖ La **Tabla 21**, nos indica que La loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en concentraciones de 2, 4, 10 y 15% presentan una diferencia significativa al 5% (p valor < 0.05), es decir que presentan actividad repelente contra mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti*.
- ❖ En la segunda parte de las comparaciones no obstante se observa que sus efectos no son comparables a la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET), pues existe una diferencia positiva y significativa a favor de DEET (p valor < 0.05).

4.2.2 Tiempo de protección eficaz

H₀: Los tiempos de protección eficaz son iguales (No existe actividad repelente)

H₁: Los tiempos de protección eficaz no son iguales iguales (Si existe actividad repelente)

Para contrastar estas hipótesis primero se verifica el supuesto de homogeneidad de varianzas para elegir ente una prueba ANOVA o una prueba no paramétrica.

Tabla 22. Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,933	5	18	0,041

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 22** permite concluir que las variabilidades o dispersiones observadas dentro de cada tratamiento son diferentes e imposibilita usar una prueba ANOVA, por lo cual se trabajará con una prueba no paramétrica.

Tabla 23. Prueba de Kruskal Wallis

	Tiempo de protección eficaz (en minutos)
Chi-cuadrado	21,223
gl	5
Sig. asintótica	0,001

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 23** nos muestra la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis proporcionado por el SPSS la cual arroja un p valor menor a 0.05 ($p = 0.001$) por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existe un efecto o actividad repelente en al menos alguno de los tratamientos. Para determinar que tratamiento(s) es el que presentó un efecto se usaran las comparaciones múltiples de Games-Howell las cuales no requieren varianzas homogéneas.

Tabla 24. Comparaciones múltiples Games-Howell

Variable dependiente: Tiempo de protección eficaz (en minutos)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Control negativo	Loción 2%	-60	0,000
	Loción 4%	-120,000*	0,011
	Loción 10%	-157,500*	0,001
	Loción 15%	-90	0,107
DEET	Loción 2%	172,500*	0,001
	Loción 4%	112,500*	0,004
	Loción 10%	75,000*	0,003

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Elaboración propia

- La **Tabla 24**, nos indica que la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle en concentraciones de 2, 4,10% presentan una diferencia significativa al 5% (p valor < 0.05), es decir que presentan actividad repelente contra mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti*, la loción al 15% no presenta un efecto significativo.
- En la segunda parte de las comparaciones, no obstante, se observa que sus efectos no son comparables a la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET), pues existe una diferencia positiva y significativa a favor de DEET ($p < 0.05$).

4.3 Discusión de los resultados

El aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), evidenció la presencia de compuestos de tipo terpenoides (monoterpenos: hidrocarburos y oxigenados) y (sesquiterpenos: hidrocarburos) (**Tabla 14**), entre los componentes mayoritarios se elucidaron: D-limoneno, β -pineno, γ -terpineno, α -pineno, β -mirceno, α -tujona, cis-citral, citral, entre otros, en menor abundancia se describen en la **Tabla 13**. Resultados similares obtuvieron Contreras et al (68); que mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas sobre el aceite esencial de *Citrus aurantifolia*, extraído por el método de prensado en frío del flavedo, evidenciaron como componentes mayoritarios al limoneno, sabineno, β -pineno, α -tujona, α -pineno, bergamoteno, geranial, neral, terpinoleno, entre otros, así como Díaz A en el 2008 obtuvo resultados similares.(12); mientras tanto, Othman et al (31) caracterizaron los compuestos de diversos aceites esenciales de la especie *Citrus* de la familia *Rutaceae*, entre ellos la de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, determinando cuantitativamente al limoneno (39.3%), β -pineno (28.4%), geraniol (7.5%), neral (5.3%), α -terpineol (2.4%), geranial (2.1%), y terpinen-4-ol (2.0%) (**Figura 1**); así como Nguemezi et al (30) cuantificaron al aceite esencial de *Citrus aurantifolia* extraído del pericarpio del fruto por arrastre de vapor y analizado por CG-MS, determinando al limoneno (48.96%), acetato de bornilo (14.18%), geraniol (10.53%), geranial (3.93%), y mirceno (3.14%) como los principales componentes. Contrastando así que los datos encontrados en la presente investigación coinciden mayoritariamente con las fuentes antes citadas.

La forma farmacéutica elegida para el presente estudio fue la loción, la misma que se formuló a varias concentraciones: 2, 4, 10 y 15% de aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle **Tabla 8**, cumpliendo con los controles de calidad planteados y descritos en la **Tabla 7**, para ello se eligieron los excipientes que mejor se adecuan a formulaciones a partir de aceites esenciales como los descritos por Olmedo et al (51), la forma farmacéutica debe cumplir con ciertos requisitos que permitan la buena aceptación de los usuarios como por ejemplo: estabilidad,

consistencia, pH adecuado, olor agradable, facilidad de manejo, almacenamiento, y costo accesible con la finalidad de tener buena aceptación de los usuario, como así los describe Pabón et al (52). Condiciones que en su mayoría son cumplidas por las formulaciones realizadas para el presente trabajo, las mismas que se detallan en la **Tabla 9**.

Las formulaciones al 2, 4, 10 y 15% se probaron mosquitos hembras adultas de la especie *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio, bajo el método del cebo humano de Effiom et al (2012) (15), (18), (14), (11), (63), con la finalidad de determinar el efecto repelente que estas presentan. En la presente investigación las lociones al 2, 4 y 10 por ciento presentaron actividad repelente, comprobado estadísticamente (p valor < 0.05), como se muestra en la **Tabla 24**, sin embargo, la única loción con mayor tiempo de protección eficaz, fue la loción al 10% protegiendo efectivamente 157.5 minutos, seguida por las lociones al 4 y 2% con tiempos de protección de 120 y 60 minutos respectivamente, (**Figura 36**) mientras que la loción al 15% no presentó un efecto significativo. Estos resultados guardan relación con los descritos por Hazarika et al (14), el cual demostró el efecto repelente del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* Swingle, donde obtuvo un porcentaje de repelencia de 85.26% pasadas las dos horas de exposición a una concentración del 5%. Mientras tanto Misni et al (13) demostró el efecto repelente de las lociones formuladas a partir del aceite esencial *Citrus aurantifolia* obteniendo un 100% de repelencia hasta dos horas después de haber aplicado el tratamiento; como así mismo Effiom et al (15) en su investigación sobre el efecto repelente que producen los diversos extractos de las cáscaras de frutos cítricos en mosquitos, concluye que estos si demuestran ser efectivos como tales, siempre y cuando se encuentren a concentraciones razonables. Todos estos estudios presentan similitud con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Finalmente todas las lociones formuladas a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle se compararon con la loción a base de N, N-dietilmeta-toluamida (DEET) al 15%, concluyendo que existe una diferencia positiva y significativa a favor de DEET ($p < 0.05$) (**Tabla 24**), que para dicho estudio obtuvo un

tiempo de protección eficaz de 232.5 minutos. Cabe recalcar que para efectos comparativos y formulación de nuevos repelentes la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda tomarlo como estándar de referencia a la loción de DEET, citado por Giménez (42); los resultados obtenidos en el presente estudio guardan analogía con los realizados por Misni et al (13), quien postula que los aceites esenciales son ricos en compuestos terpénicos y terpenoides de hidrocarburos, que pueden ser utilizados para el desarrollo de repelentes alternativos a los sintéticos; sin embargo, los estudios aún no han demostrado que los repelentes a base de aceites esenciales tengan un efecto protector eficaz de larga duración como si los tiene el DEET.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Los metabolitos identificados en el aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limón criollo), son de tipo terpenoides (monoterpenos: hidrocarburos y oxigenados) y (sesquiterpenos: hidrocarburos) entre los los más abundantes, D-limoneno, β -pineno, γ -terpineno, α -pineno, β -mirceno.
2. Se elaboraron lociones a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limón criollo), a concentraciones de 2, 4, 10 y 15% y el mayor efecto repelente se obtuvo en la loción al 10% con un tiempo de protección eficaz de 157.5 minutos contra los mosquitos hembras adultas de la especie *Aedes aegypti*. (p valor <0.05).
3. La loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limón criollo), es efectiva como la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET), pero presenta menor tiempo de protección (p valor <0.05).

5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda realizar futuras investigaciones que incluyan otras especies de vectores trasmisores de enfermedades, mayormente las de interés sanitario en la región.
2. Se recomienda realizar un proceso de microencapsulado de los aceites esenciales antes de realizar la formulación farmacéutica, ya que dicho proceso evita la rápida volatilización de los componentes químicos que los aceites esenciales presentan, por lo tanto, estos permanecerán mayor tiempo en la piel de los usuarios incrementando así el tiempo de protección eficaz, como los realizados por Misni et al (2017). (13)

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Lucha contra el dengue [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
2. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Dengue y Dengue Grave Casos y Muertes para subregiones de las Américas [Internet]. 2018. Available from: <http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-regional/506-dengue-reg-ano-es.html>
3. Ministerio de Salud del Perú. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades [Internet]. 2018. Available from: www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE32/dengue.pdf
4. Gómez-Dantés H, San Martín J, Danis-Lozano R, Manrique-Saide P. La estrategia para la prevención y el control integrado del dengue en Mesoamérica. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2011;53(3):349–57. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v53s3/a08v53s3.pdf>
5. Ministerio de Salud de Perú. Norma Técnica de Salud para la Implementación de la Vigilancia y Control del *Aedes aegypti*, Vector del Dengue en el Territorio Nacional [Internet]. Lima; 2011. Available from: http://www.digesa.sld.pe/publicaciones/descargas/norma_aedes_aegypti_dsb.pdf
6. Uc-Puc V, Herrera-Bojorquez J, Carmona-Carballo C, Che-Mendoza A, Medina-Barreiro A, Chablé-Santos J, et al. Efectividad de repelentes comerciales disponibles contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.) en Yucatán, Mexico. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2016;58(4):472–5. Available from: www.scielo.org.mx/pdf/spm/v58n4/0036-3634-spm-58-04-00472.pdf
7. Andrade-Ochoa S, Sánchez-Torres L, Nevárez-Moorillón G, Camacho A, Noguera-Torres B. Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomedica* [Internet]. 2017;37(Supl 2):24–243. Available from: <https://doi.org/10.7705/biom>

8. MedlinePlus enciclopedia médica. Intoxicación con repelentes de insectos en aerosol [Internet]. 2017. Available from: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002763.htm>).
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevent Mosquito Bites [Internet]. 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/features/stopmosquitoes/>
10. Dávila C. Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia Culicidae [Internet]. Repositorio de Tesis - UNMSM. 2016. Available from: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/4878>
11. Otiniano G, Roldán J. Actividad repelente y tiempo de protección experimental del aceite del endospermo de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) en *Aedes aegypti*. Rev REBIOLEST [Internet]. 2015;2(2):48–60. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/eccbb/article/view/753/677>
12. Días A. Caracterización de los componentes volátiles del aceite esencial de lima (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) [Internet]. UNI; 2008. Available from: http://cybertesis.uni.edu.pe/bitstream/uni/1059/3/diaz_ra.pdf
13. Misni N, Mohamed Nor Z, Ahmad R. Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. J Vector Borne Dis [Internet]. 2017;54(1):44–53. Available from: http://www.jvbd.org/temp/jvectorbornedis54144-6915188_191231.pdf
14. Hazarika S, Dhiman S, Rabha B, Bholra R, Singh L. Repellent activity of some essential oils against *Simulium* species in India. J Insect Sci [Internet]. 2012;12:5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3465923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Effiom O, Avoaja D, Ohaeri C. Mosquito Repellent Activity of Phytochemical Extracts from Peels of Citrus Fruit Species. Glob Journals Inc [Internet].

- 2012;12(1). Available from: https://scholar.google.com.pe/scholar?q=mosquito+repellent+activity+of+phytochemical&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar
16. Mensah F, Inkum I, Agbale C, Eric A. Comparative Evaluation of the insecticidal and insect repellent properties of the volatile Oils of *Citrus aurantifolia* (lime), *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus limon* (lemon) on *Camponotus nearcticus* (carpenter ants). *Nov Journals* [Internet]. 2014;1(2):19–25. Available from: <https://www.noveltyjournals.com>
 17. Norashiquin M, Zurainee M, Rohani A. New candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 2016;10. Available from: https://www.researchgate.net/publication/303887327_new
 18. Kiplang'at K, Mwangi R. Repellent Activities of *Ocimum basilicum*, *Azadirachta indica* and *Eucalyptus citriodora* Extracts on Rabbit Skin against *Aedes aegypti*. *J Entomol Zool Stud* [Internet]. 2013;1(5):84–91. Available from: <http://www.entomoljournal.com/archives/2013/vol1issue5/partb/32.pdf>
 19. Morin C. Cultivo de Cítricos. In: Librería STUDIUM, S.A.(Lima P, editor. 2da ed. Lima, Perú; 1980. p. 70–4. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=fxspaqaiaaaj&printsec=frontcover&dq=citricos&hl=es419&sa=x&ved=0ahu kewjr_7xnq5laahuik1kkhcbavqq6aeikjab#v=onepage&q=citricos&f=false
 20. León J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales [Internet]. 1era ed. Lima- Perú: IICA; 1968. 280–281 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=gjivvbkvwmc&pg=pr12&dq=citrus+aurantifolia+origen&hl=es419&sa=x&ved=0ahukewih1_hpx5jaahulrvkkhw7iaasq6aeikzab#v=onepage&q=citrus+aurantifolia+origen&f=false
 21. Vanegas M. Guía técnica del cultivo de limón Pérsico [Internet]. 1era ed. IICA, editor. Nueva San Salvador; 2002. 44 p. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=9mooaqaiaaaj&pg=pa5&dq=limon+citrus+aurantifolia&hl=es419&sa=x&ved=0ahukewij9np84plaahvbvkkhahqat0q6ae iqtaf#v=onepage&q&f=false>

22. Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX). Limón Sutil [Internet]. 2014. p. 2. Available from: http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5es.asp?_page_=160.00000
23. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana [Internet]. 2009. Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=limón&id=7410>
24. González F, Rojo R, Ramírez O, Omaña J, Matus J, Rebollar S. Comercialización de productos derivados del limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Rev Mex Agronegocios* [Internet]. 2009;24:808-822. Available from: <https://www.redalyc.org/html/141/14113212/>
25. AGRODATAPERÚ. La mejor información sobre comercio exterior agropecuario del Perú [Internet]. 2018. Available from: <https://www.agrodataperu.com/category/exportaciones/limon-aceite-exportacion>
26. Tránsito L. Los aceites esenciales. *Offarm* [Internet]. 2004;23(7):88–91. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13064296-s300>
27. Herráez M, López A. Tecnología Farmacéutica. Volumen II: Formas Farmacéuticas. In: *Formas de administración sobre la piel y las mucosas* [Internet]. España; 2001. p. 306–45. Available from: https://www.u-cursos.cl/usuario/c25b93f7ec03b9603ab499e3f1f7c8eb/mi_blog/r/tecnologia.farmacutica2_medilibros.com.pdf
28. Martínez A. Aceites esenciales. *Phytochemistry* [Internet]. 2003;34. Available from: http://www.med-informatica.com/observamed/descripciones/aceitesesencialesudea_esencias2001b.pdf
29. Albaladejo Q. El aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales [Internet]. Universidad de Murcia; 1999. Available from: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/11059/albaladejo.pdf>

30. Nguemezi S, Njamou S, Lambert M, Dongmo P, Tchoumboungang F. Using *Citrus aurantifolia* essential oil for the potential biocontrol of *Colocasia esculenta* (taro) leaf blight caused by *Phytophthora colocasiae*. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2017; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29150804>
31. Othman S, Hassan M, Nahar L, Basar N, Jamil S, Sarker S. Essential Oils from the Malaysian Citrus (Rutaceae) Medicinal Plants. *Medicines* [Internet]. 2016;3(2):13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5456223/>
32. Peredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Sel Ing Aliment* [Internet]. 2009;3(1):8. Available from: [https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/no3-vol-1/tsia-3\(1\)-peredo-luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/wp/tsia/files/no3-vol-1/tsia-3(1)-peredo-luna-et-al-2009.pdf)
33. Armijo J, Vicuña E, Romero P, Otiniano P, Condorhuamán C, Hilario B. Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. *Rev Peru Ing Química* [Internet]. 2012;15(2):19–27. Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4967/4035>
34. Espinosa H, García E, Gastélum E. Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción. *Nanobio* [Internet]. 2016;114. Available from: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b85320f15.pdf#page=115
35. Bandoni A. Análisis y control de calidad de aceites esnciales. In: *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica* [Internet]. 2da ed. Buenos Aires; 2002. p. 180–215. Available from: <https://es.scribd.com/doc/7959699/los-recursos-vegetales-aromaticos-en-america-latina>
36. Fontenla G. Caracterización del aceite esencial de “lanche” (*Myrcianthes rhopaloides* (H.B.K.) Mc Vaugh) proveniente del distrito de Chalaco, provincia de Morropón-Piura, obtenido por dos métodos de destilación [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2006. Available from:

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/unalm/477>

37. Guenther E. The essential oils [Internet]. 1948. 457 p. Available from: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=014069>
38. Montoya G. Control de calidad. In: Aceites esenciales: una alternativa de diversificación para el eje cafetero [Internet]. Colombia; 2010. p. 82–94. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
39. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Sci Agropecu* [Internet]. 2012;3(4):291–302. Available from: http://www.redalyc.org/pdf/3576/resumen/resumen_357633704003_1.pdf
40. Montenegro C. Estudio químico del aceite esencial del Té Inka [Internet]. Universidad Nacional de Ingeniería; 2001. Available from: http://repositorio.uni.edu.pe/bitstream/uni/1701/1/montenegro_lc.pdf
41. Gómez A. Picaduras de insectos. *Farm comunitaria* [Internet]. 2006;20(5):48–52. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3970007>
42. Giménez S. Repelentes de Insectos. Elsevier [Internet]. 2013;19:1–4. Available from: <http://www.elsevier.es/index.php?p=revista&prevista=pdf>
43. Beraza M. Novedades sobre el uso de repelentes en pediatría. *Asoc Argentina dermatología pediátrica* [Internet]. 2018;1:3. Available from: <http://www.asadep.org.ar/a2/index.cfm?fuseaction=muestra&codcontenido=995&plcontempl=21&aplicacion=pak010&cnl=29&opc=25>
44. Menarini España. Menarini salud y viajes [Internet]. 2016. Available from: <https://www.menarini.es/salud/areas-terapeuticas/salud-y-viajes/durante-el-viaje/repelentes-de-insectos.html>

45. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades transmitidas por vectores [Internet]. 2017. p. 4. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
46. Eiman M, Introini M, Ripoll C. Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti. Minist Salud Pres la Nación [Internet]. 2016; Available from: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000235cnt-01-directrices-dengue-2016.pdf>
47. Laboratorio de Geoprocesamiento Epidemiológico en Ambiente y Salud (LaGES). Zancudo - Mosquito Aedes aegypti (Linnaeus, 1762). 2006;14. Available from: http://langif.uaslp.mx/documentos/plataformas/ficha_tecnica_aedes_aegypti.pdf
48. Popa J, Castillo R, Pérez M, Figueredo D, Montada D. Metamorfosis y emergencia de Aedes aegypti fuera del medio acuático y nuevo reporte de importancia entomológica y epidemiológica en Santiago de Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2011;49(2):173–82. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v49n2/hie04211.pdf>
49. Salvatella R. Aedes aegypti , Aedes albopictus (Diptera ,Culicidae) y su papel como vectores en las Américas . La situación de Uruguay. Rev Médica Uruguay [Internet]. 1996;12:28–36. Available from: http://www.ceip.edu.uy/documentos/galerias/prensa/1243/pre_aedes_aegypti.pdf
50. Boada M, Colom A, Castelló N. La experimentación animal. Exp Anim [Internet]. 1987;(1):3–64. Available from: https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/80084/la_experimentacion_animal.pdf
51. Olmedo R, Orellana G, Tenas A. Elaboración de una loción repelente a partir de los extractos y aceites esenciales de Ocimum micranthum (albahaca) y Cymbopogon nardus (citronella) [Internet]. Universidad de El Salvador; 2003. Available from: <http://ri.ues.edu.sv/5755/1/10125093.pdf>

52. Pabón Y, González L. Formas Farmacéuticas [Internet]. Bogotá; 2017. Available from: <https://doi.org/10.16925/greylit.2110>
53. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Farmacopea Argentina [Internet]. 7ma ed. Vol. I, Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires; 2006. 2745 p. Available from: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/farmacopea_vol_i/files/assets/basic-html/page1.html
54. Darren J, Allen G, Sheng Y, McManus D. Esquistosomiasis: diagnóstico y manejo clínico. IntraMed [Internet]. 2011; Available from: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=71317>
55. De de Cruz M. Rash Cutáneo [Internet]. SCRIBD. 2016. p. 2. Available from: <https://es.scribd.com/document/331745073/Rash-Cutaneo>
56. Navarro J, Cuadri J, Mohamed A. Dismenorrea. 1999;1–13. Available from: [http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/manual de urgencias y emergencias /dismeno.pdf](http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/manual%20de%20urgencias%20y%20emergencias/dismeno.pdf)
57. Rojas K. Protocolo de disentería. SCRIBD [Internet]. 2018;1:175–6. Available from: <https://es.scribd.com/doc/94216803/07-disenteria-pdf>
58. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación [Internet]. 5ta ed. MCGRAW-HILL, editor. FreeLibros. México D.F; 2010. 656 p. Available from: <http://www.casadellibro.com/libro-metodologia-de-la-investigacion-5-ed-incluye-cd-rom/9786071502919/1960006>
59. Pérez O, Rodríguez J, Bisset J, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, et al. Manual de indicaciones técnicas para insectarios. Editor Ciencias Médicas [Internet]. 2004;59. Available from: <http://files.sld.cu/ipk/files/2010/02/manual.pdf>
60. Daza L, Florez N. Diseño de un repelente para insectos voladores con base en productos naturales [Internet]. Universidad EAFIT; 2006. Available from: https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/354/leticiapaulina_dazam

_2006.pdf;sequence=1

61. Alvarez H, Ochoa M. Formulación de una “loción repelente” utilizando como principio activo aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y perfume de Citronella [Internet]. Universidad de El Salvador; 2013. Available from: <http://ri.ues.edu.sv/2843/1/16103182.pdf>
62. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. In: 2da ed. Lima- Perú; 1994. p. 269–79.
63. Gomez M, Grisales M, Tellez D. Evaluación de la eficacia de los extractos naturales de Citronella (*Cymbopogon citratus*), Albahaca (*Ocimum basilicum*) y Lavanda (*Lavandula* spp.) como repelente natural contra mosquitos adultos de la especie *Aedes aegypti*. [Internet]. Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2015. Available from: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/4815/1/gómezvanegasmarycelly2015.pdf>
64. Lupi E, Hatz C, Schlagenhauf P. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - A literature review. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. 2013;11(6):374–411. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.10.005>
65. Nieves E, Fernández J, Lias J, Rondón M, Briceño B. Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). 2010;58(December):1549–60. Available from: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-77442010000400038
66. Leyva M, Castex M, Montada D, Quintana F, Lezcano D, Marquetti M del C, et al. Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. *An Biol* [Internet]. 2013;0(34):47–56. Available from: <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/309391/218011>
67. Xu P, Choo Y-M, De La Rosa A, Leal W. Mosquito odorant receptor for DEET

and methyl jasmonate. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2014;111(46):16592–7. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1417244111>

68. Contreras E, Masson L, Fuentes R, Abarca M. Composición del aceite esencial de limón de pica (*Citrus aurantifolia*) por cromatografía gas líquido. [Internet]. 1980. p. 1–6. Available from: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/121135/composicion_contreras_1980.pdf?sequence=1&isallowed=y
69. Carreras A. Elaboración de repelentes a base de aceite de Citronella y N,N-Dietiltoluamida [Internet]. Universidad Católica de Córdoba; 2015. Available from: http://pa.bibdigital.uccor.edu.ar/843/1/tesis_carreras_alejandro.p

ANEXOS

Anexo 1. Plantaciones de limón criollo Sayán - Huaura



Fuente: Propia

Anexo 2. Limón criollo en la etapa de floración Sayán - Huaura



Fuente: Propia

Anexo 3. Árboles de limón criollo seleccionados para la recolección de frutos



Fuente: propia

Anexo 4. Limón criollo en etapa de cuaje Sayán - Huaura



Fuente: propia

Anexo 5. Sr. Pillaca propietario del fundo de dos hectáreas y media del cultivo de limones criollos en Sayán - Huaura



Fuente: propia

Anexo 6. Proceso de pelado de los limones



Fuente: propia

Anexo 7. Montaje del equipo de destilación por arrastre de vapor de agua – Laboratorio de Recursos Naturales (RENATU) UNMSM.



Fuente: propia

Anexo 8. Dr. Américo Castro Luna, Coordinador de RENATU – UNMSM



Fuente: propia

Anexo 9. Separación de las dos fases; aceite esencial e hidrolato



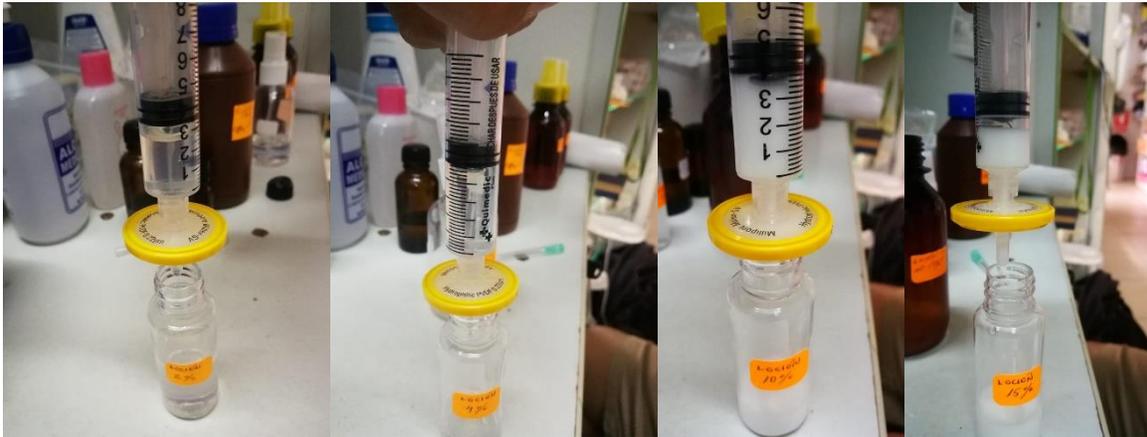
Fuente: propia

Anexo 10. Proceso pesado en la fabricación de la loción a base de los aceites esenciales



Fuente: propia

Anexo 11. Proceso de filtrado de las lociones preparadas.



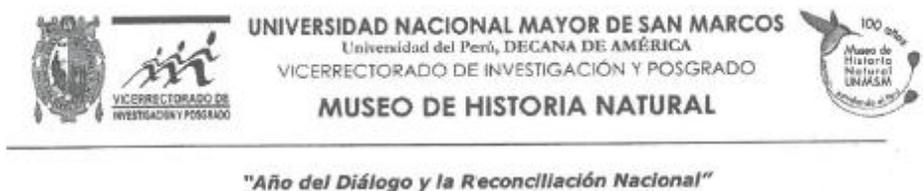
Fuente: propia

Anexo 12. Lociones terminadas al 2, 4, 10 y 15 por ciento; y a la izquierda el aceite esencial de limón



Fuente: Propia

Anexo 13. Constancia del análisis taxonómico del limón criollo



CONSTANCIA N°400-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa con frutos) recibida de **Araceli Aymee Guadalupe Huaman y Nixon Jamer Vela Hoyos**, estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: ***Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: RUTACEAE

GENERO: *Citrus*

ESPECIE: *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle

Nombre vulgar: "limón criollo"

Determinada por: Blgo. Mario Benavente Palacios

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.

Lima, 03 de diciembre de 2018



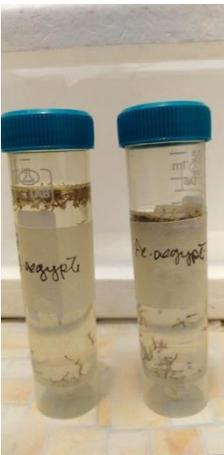
ACE/ddb

Fuente: Museo de Historia Natural de la UNMSM

Anexo 14. Resultados del screening fitoquímico



Anexo 15. Larvas de *Aedes aegypti* donadas por el INS (izquierda); alimento de larvas (derecha)



Anexo 16. Larvario (izquierda); larvas de *Aedes aegypti* de 6 días de edad aproximadamente



Anexo 17. Separación de pupas usando pipeta de Pasteur.



Anexo 18. Pupas próximas a eclosionar y jaula de eclosión, dentro, especímenes.



Anexo 19. Consentimiento informado; voluntario 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Autorización para participar voluntariamente en el trabajo de investigación:

“EFECTO REPELENTE DE LA LOCIÓN A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (LIMÓN CRIOLLO) CONTRA MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*”

Yo, Cobas Vela Lelis Enith....., con DNI 71517508 de 18 años de edad, de sexo... Femenino.....

Con pleno conocimiento acerca del trabajo de investigación y habiendo recibido la charla informativa sobre el tema de investigación, objetivos del estudio, método a utilizar y finalidad del trabajo, así como posteriormente ser informado sobre los resultados y de la posibilidad que puedo retirarme del trabajo científico cuando yo crea conveniente, porque mi participación es libre y voluntaria; doy consentimiento de ser partícipe de dicho estudio, exponiendo mi antebrazo y mano para ser picado por los mosquitos, los cuales han sido criados bajo cautiverio y exclusivamente para este trabajo de investigación, sin que esto repercuta en mi salud.

Lima, 17..... de enero del


.....

Firma del participante

Anexo 20. Consentimiento informado; voluntario 2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Autorización para participar voluntariamente en el trabajo de investigación:

“EFECTO REPELENTE DE LA LOCIÓN A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (LIMÓN CRIOLLO) CONTRA MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*”

Yo, Guadalupe Huaman Araceli, con DNI 76364236 de 24 años de edad, de sexo Femenino.....

Con pleno conocimiento acerca del trabajo de investigación y habiendo recibido la charla informativa sobre el tema de investigación, objetivos del estudio, método a utilizar y finalidad del trabajo, así como posteriormente ser informado sobre los resultados y de la posibilidad que puedo retirarme del trabajo científico cuando yo crea conveniente, porque mi participación es libre y voluntaria; doy consentimiento de ser partícipe de dicho estudio, exponiendo mi antebrazo y mano para ser picado por los mosquitos, los cuales han sido criados bajo cautiverio y exclusivamente para este trabajo de investigación, sin que esto repercuta en mi salud.

Lima, 17 de enero del


.....

Firma del participante

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Autorización para participar voluntariamente en el trabajo de investigación:

“EFECTO REPELENTE DE LA LOCIÓN A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (LIMÓN CRIOLLO) CONTRA MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*”

Yo, Palomino Hoyos Michael Jordan, con DNI 73568897 de 18 años de edad, de sexo Masculino.....

Con pleno conocimiento acerca del trabajo de investigación y habiendo recibido la charla informativa sobre el tema de investigación, objetivos del estudio, método a utilizar y finalidad del trabajo, así como posteriormente ser informado sobre los resultados y de la posibilidad que puedo retirarme del trabajo científico cuando yo crea conveniente, porque mi participación es libre y voluntaria; doy consentimiento de ser partícipe de dicho estudio, exponiendo mi antebrazo y mano para ser picado por los mosquitos, los cuales han sido criados bajo cautiverio y exclusivamente para este trabajo de investigación, sin que esto repercuta en mi salud.

Lima, 17 de enero del


.....

Firma del participante

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Autorización para participar voluntariamente en el trabajo de investigación:

“EFECTO REPELENTE DE LA LOCIÓN A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (LIMÓN CRIOLLO) CONTRA MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*”

Yo, Nixon James Vela Hoyos....., con DNI 47012749..... de 28 años de edad, de sexo Masculino.....

Con pleno conocimiento acerca del trabajo de investigación y habiendo recibido la charla informativa sobre el tema de investigación, objetivos del estudio, método a utilizar y finalidad del trabajo, así como posteriormente ser informado sobre los resultados y de la posibilidad que puedo retirarme del trabajo científico cuando yo crea conveniente, porque mi participación es libre y voluntaria; doy consentimiento de ser partícipe de dicho estudio, exponiendo mi antebrazo y mano para ser picado por los mosquitos, los cuales han sido criados bajo cautiverio y exclusivamente para este trabajo de investigación, sin que esto repercuta en mi salud.

Lima, 17..... de enero del


.....

Firma del participante

Anexo 23. Manguera transportadora + lupa (izquierda); proceso del transporte de los especímenes (derecha).



Anexo 24. Jaula zancudera y dentro una ovitrampa (vista superior).



Anexo 25. Alimento de especímenes machos, glucosa 10% (izquierda); hematofagia en los voluntarios de las hembras (centro) y mano del voluntario post alimentación (derecha).



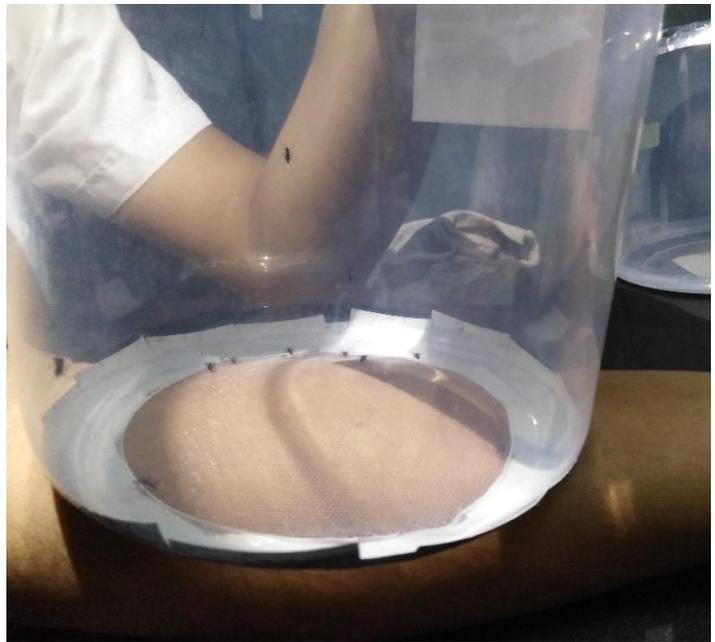
Anexo 26. Trampa de oviposición con huevos de *Aedes aegypti* (izquierda); huevos de *Aedes aegypti* sumergidos en agua para su eclosión (derecha).



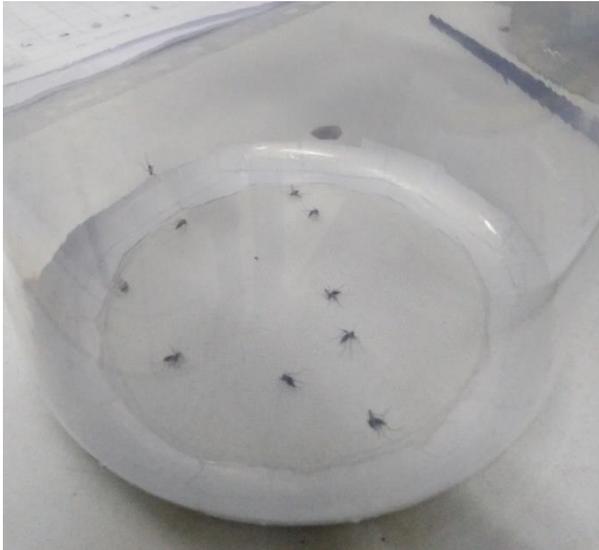
Anexo 27. Frascos de exposición.



Anexo 28. Exposición de voluntarios (Control negativo C-).



Anexo 29. Especímenes sacrificados (izquierda); proceso de llenado de la ficha de recolección de datos mediante el frotis de sangre (derecha).



Anexo 30. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 1.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL NEGATIVO (C-) "Sujeto 1"										Alimentados		M:1; M:2	
												SI	NO		
0	10												7	3	58,67
30	10												10	0	4,9
60	10														
90	10														
120	10														
150	10														
180	10														
210	10														
240	10														
270	10														
300	10														

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 31. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 1.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 2% "SUJETO 1"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											3	7	35,70
120	10											7	3	52,58
150	10											10	0	30,32
180	10													
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 32. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 1.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 4% "SUJETO 1"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											0	10	0,0
150	10											0	10	0,0
180	10											4	6	45,63
210	10											10	0	22,27
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 33. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 1.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 10% "SUJETO 1"										Alimentados		M:1; M:2	
												SI	NO		
0	10											0	10	0,0	
30	10											0	10	0,0	
60	10											0	10	0,0	
90	10											0	10	0,0	
120	10											0	10	0,0	
150	10											0	10	0,0	
180	10											1	9	54,0	
210	10											6	4	5,10	
240	10											10	0	3,8	
270	10														
300	10														

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 34. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 1.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 15% "SUJETO 1"										Alimentados		M:1; M:2	
												SI	NO		
0	10											0	10	0,0	
30	10											0	10	0,0	
60	10											0	10	0,0	
90	10											0	10	0,0	
120	10											0	10	0,0	
150	10											0	10	0,0	
180	10											3	7	22,74	
210	10											5	5	18,39	
240	10											10	0	7,20	
270	10														
300	10														

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 35. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 1

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL POSITIVO (C+) "SUJETO 1"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											0	10	0,0
150	10											0	10	0,0
180	10											0	10	0,0
210	10											0	10	0,0
240	10											0	10	0,0
270	10											2	8	11,41
300	10											10	0	4,12

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 36. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL NEGATIVO "C-" "SUJETO 2"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											08	02	27,32
30	10											10	0	19,26
60	10													
90	10													
120	10													
150	10													
180	10													
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 37. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCION REPELENTE 2% "SUJETO 2"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											2	8	36,45
120	10											3	7	5,12
150	10											10	0	3,8
180	10													
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 38. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCION REPELENTE 4% "SUJETO 2"										Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											5	5	4,10
150	10											10	0	2,6
180	10													
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 39. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 10%										"SUJETO 2"		Alimentados		M:1; M:2
													SI	NO		
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											0	10	0,0		
120	10											0	10	0,0		
150	10											1	9	60,0		
180	10											4	6	20,21		
210	10											10	0	7,12		
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 40. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 15%										"SUJETO 2"		Alimentados		M:1; M:2
													SI	NO		
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											0	10	0,0		
120	10											0	10	0,0		
150	10											2	8	26,132		
180	10											6	4	17,23		
210	10											10	0	4,5		
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 41. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 2.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL POSITIVO "C+"										Alimentados		M:1; M:2
		"SUJETO 2"										SI	NO	
		LOCION DEET 15% (Floresta Extremo®)												
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											0	10	0,0
150	10											0	10	0,0
180	10											0	10	0,0
210	10											0	10	0,0
240	10											2	8	40,100
270	10											6	4	15,38
300	10											10	0	11,27

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 42. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL NEGATIVO "C-"										Alimentados		M:1; M:2
		"SUJETO 3"										SI	NO	
0	10											7	3	7,11
30	10											10	0	4,16
60	10													
90	10													
120	10													
150	10													
180	10													
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 43. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 2%										"SUJETO 3"		Alimentados		M:1; M:2
													SI	NO		
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											4	6	11,22		
120	10											8	2	11,15		
150	10											10	0	5,9		
180	10															
210	10															
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 44. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 4%										"SUJETO 3"		Alimentados		M:1; M:2
													SI	NO		
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											0	10	0,0		
120	10											0	10	0,0		
150	10											3	7	41,56		
180	10											7	3	15,21		
210	10											10	0	8,11		
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 45. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 10%										"SUJETO 3"		Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO			
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											0	10	0,0		
120	10											0	10	0,0		
150	10											0	10	0,0		
180	10											3	7	14,22		
210	10											8	2	10,15		
240	10											10	0	4,6		
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 46. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE 15%										"SUJETO 3"		Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO			
0	10											0	10	0,0		
30	10											0	10	0,0		
60	10											0	10	0,0		
90	10											2	8	6,8		
120	10											6	4	4,7		
150	10											10	0	2,3		
180	10															
210	10															
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 47. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 3.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL POSITIVO "C+"										"SUJETO 3"		Alimentados		M:1; M:2
		DEET 15% (Floresta EXTREMO®)										SI	NO	SI	NO	
0	10												0	10	0,0	
30	10												0	10	0,0	
60	10												0	10	0,0	
90	10												0	10	0,0	
120	10												0	10	0,0	
150	10												0	10	0,0	
180	10												0	10	0,0	
210	10												0	10	0,0	
240	10												1	9	128,0	
270	10												4	6	49,56	
300	10												10	0	19,32	

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 48. Control negativo C-, sin tratamiento; voluntario 4.

Tiempo min	N° mosquitos	CONTROL NEGATIVO "C-"										"SUJETO 4"		Alimentados		M:1; M:2
												SI	NO	SI	NO	
0	10												6	4	13,34	
30	10												10	0	6,11	
60	10															
90	10															
120	10															
150	10															
180	10															
210	10															
240	10															
270	10															
300	10															

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 49. Grupo experimental, loción de AE de limón al 2%; voluntario 4.

Tiempo Min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE AL 2%										Alimentados		M:1; M:2
		"SUJETO 4"										SI	NO	
1	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											2	8	28,33
120	10											2	8	17,29
150	10											3	7	11,17
180	10											9	1	27,22
210	10											10	0	37,3
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M:1 momento de la primera picadura en segundos; M:2 momento de la segunda picadura en segundos.

Anexo 50. Grupo experimental, loción de AE de limón al 4%; voluntario 4.

Tiempo Min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE AL 4%										Alimentados		M:1; M:2
		"SUJETO 4"										SI	NO	
1	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											01	09	123,0
150	10											07	03	49,62
180	10											10	0	19,37
210	10													
240	10													
270	10													
300	10													

Dónde: M:1 momento de la primera picadura en segundos; M:2 momento de la segunda picadura en segundos.

Anexo 51. Grupo experimental, loción de AE de limón al 10%; voluntario 4.

Tiempo Min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE AL 10%										Alimentados		M:1; M:2	
		"SUJETO 4"										SI	NO		
1	10												0	10	0,0
30	10												0	10	0,0
60	10												0	10	0,0
90	10												0	10	0,0
120	10												0	10	0,0
150	10												1	09	8,0
180	10												2	08	38,4
210	10												10	0	11,5
240	10														
270	10														
300	10														

Dónde: M:1 momento de la primera picadura en segundos; M:2 momento de la segunda picadura en segundos.

Anexo 52. Grupo experimental, loción de AE de limón al 15%; voluntario 4.

Tiempo Min	N° mosquitos	LOCIÓN REPELENTE AL 15%										Alimentados		M:1; M:2	
		"SUJETO 4"										SI	NO		
1	10												0	10	0,0
30	10												0	10	0,0
60	10												0	10	0,0
90	10												5	5	13,23
120	10												07	03	21,31
150	10												9	1	3,10
180	10												10	0	3,9
210	10														
240	10														
270	10														
300	10														

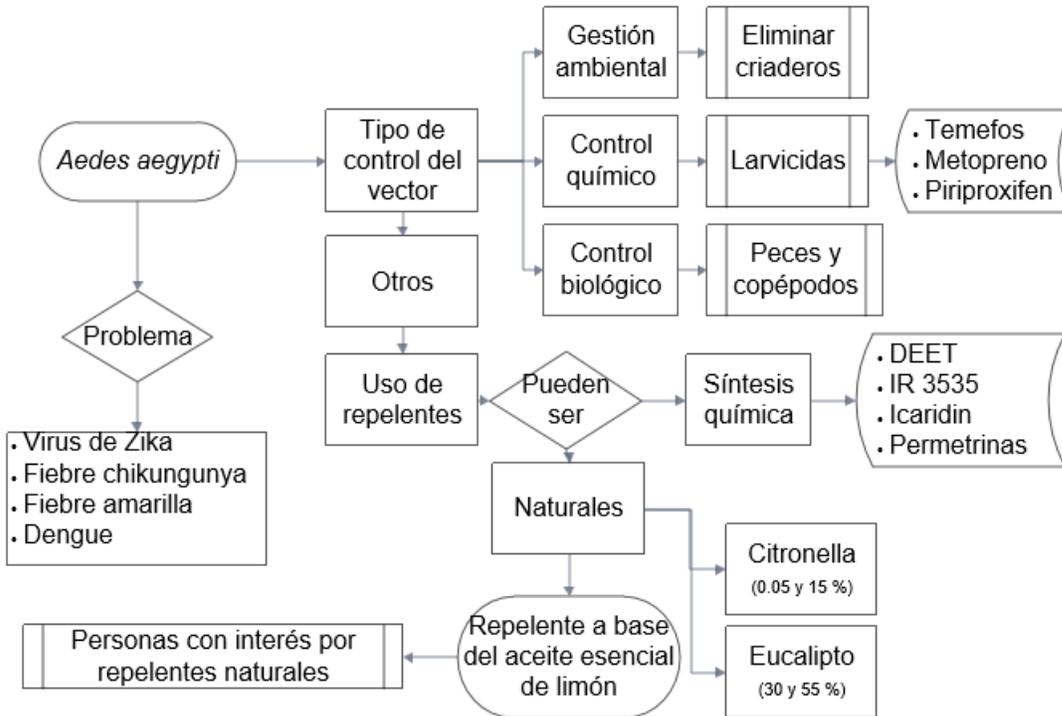
Dónde: M:1 Momento de la primera picadura en segundos; M:2 Momento de la segunda picadura en segundos

Anexo 53. Control positivo C+, loción Floresta Extremo® (DEET 15%); voluntario 4.

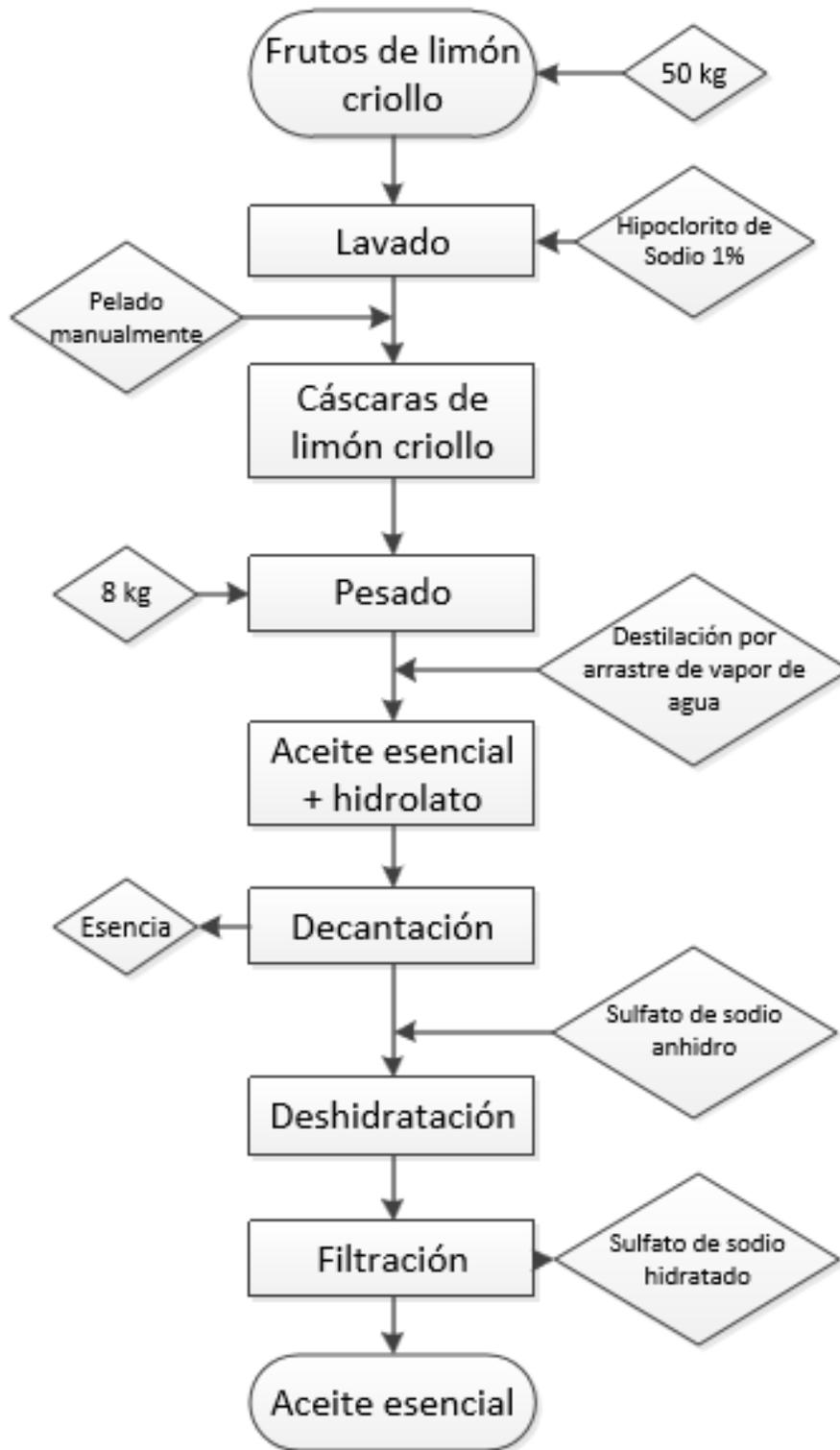
Tiempo min	N° mosquitos	"SUJETO 4"										Alimentados		M:1;
		LOCIÓN REPELENTE DE DEET AL 15% (Floresta Extremo® 15%)										SI	NO	M:2
0	10											0	10	0,0
30	10											0	10	0,0
60	10											0	10	0,0
90	10											0	10	0,0
120	10											0	10	0,0
150	10											0	10	0,0
180	10											0	10	0,0
210	10											0	10	0,0
240	10											0	10	0,0
270	10											8	2	66,68
300	10											10	0	29,33

Dónde: M: 1 momento de la primera picadura en segundos; M: 2 momento de la segunda picadura en segundos

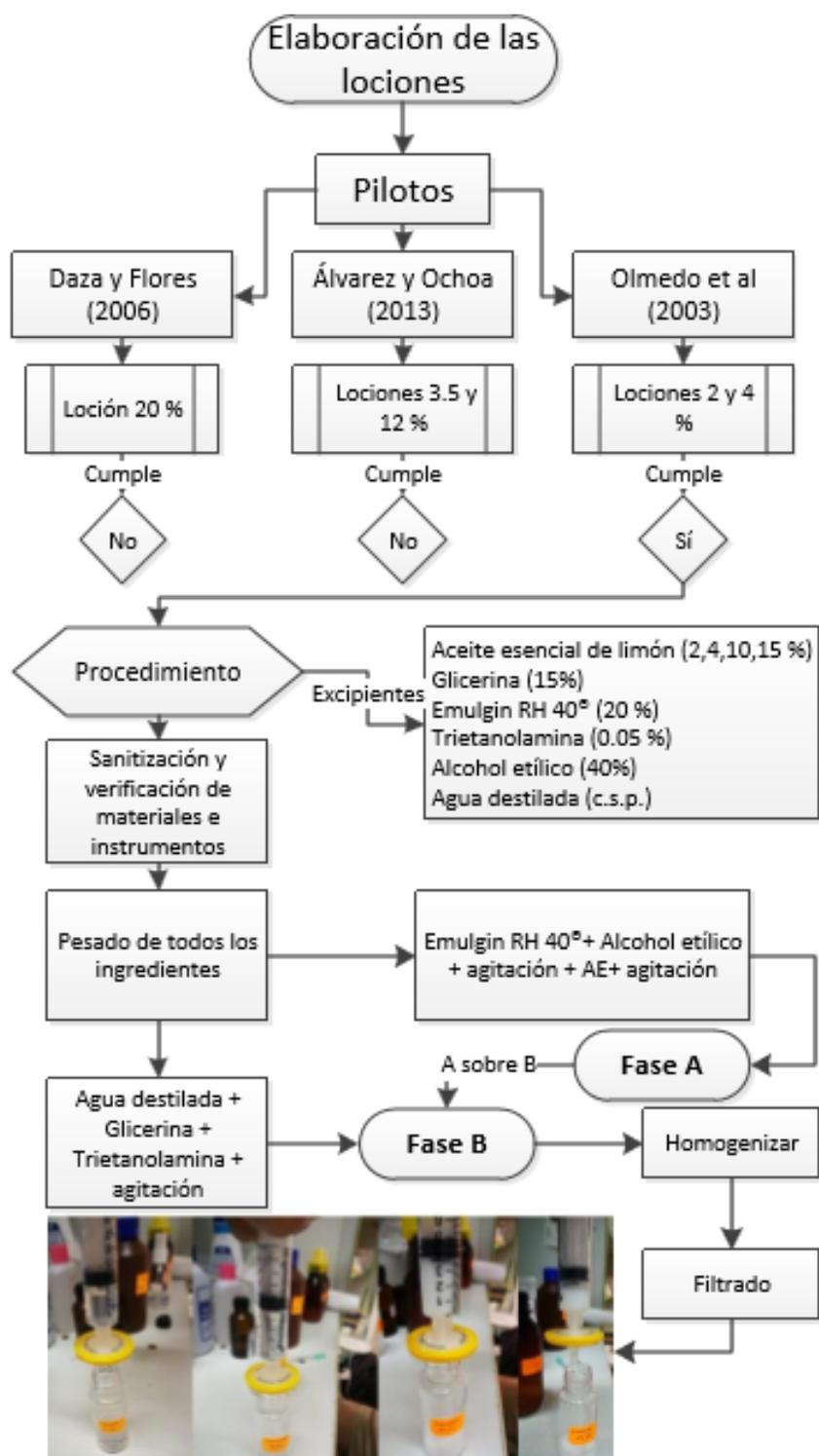
Anexo 54. Diagrama del planteamiento del problema.



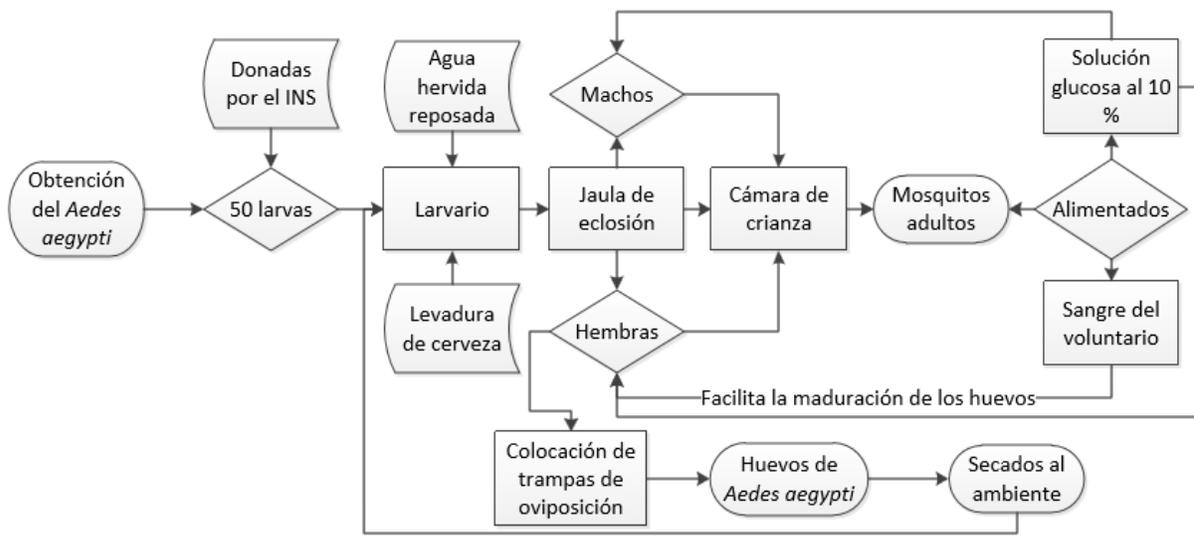
Anexo 55. Diagrama de la extracción del aceite esencial.



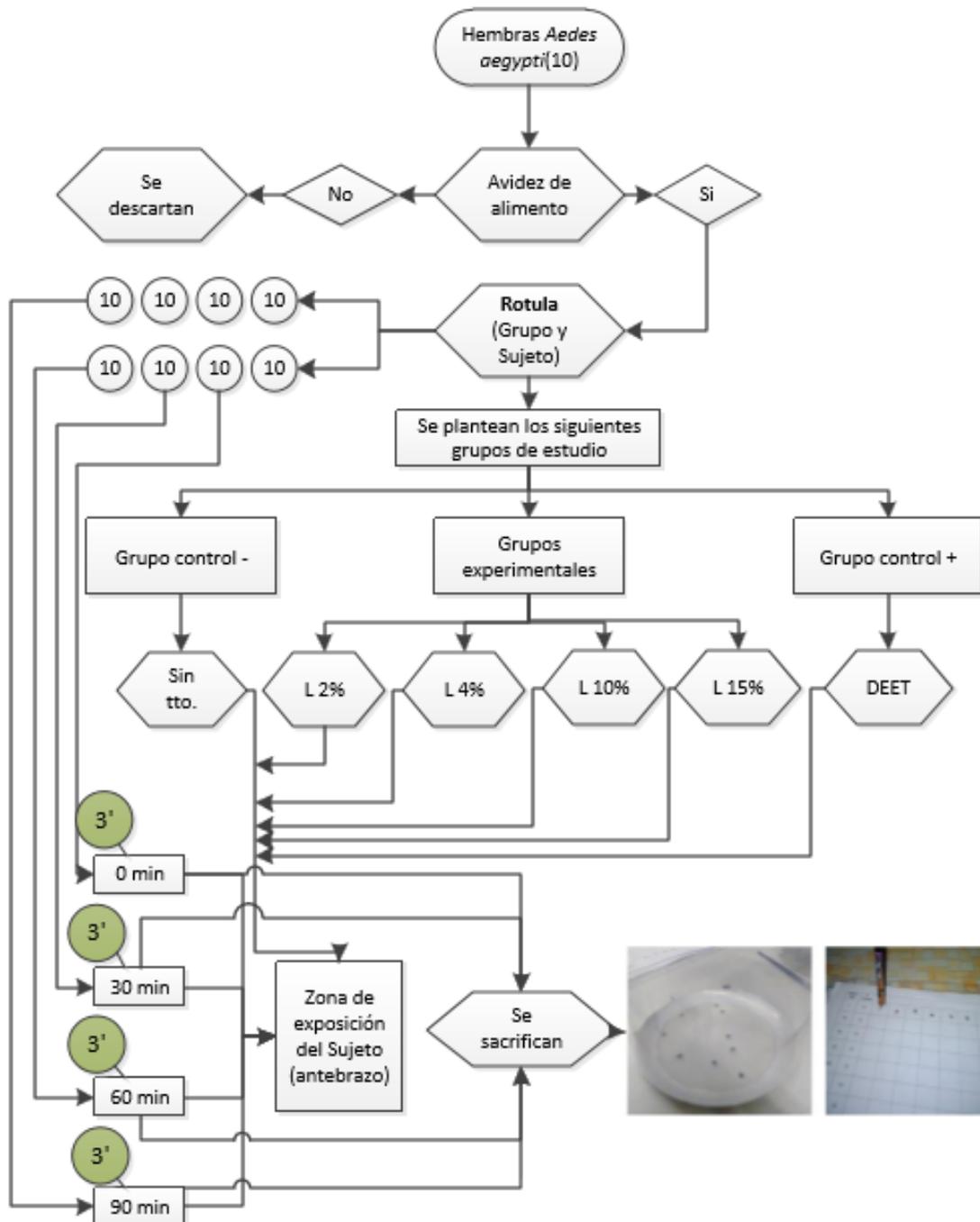
Anexo 56. Diagrama de elaboración de las formas farmacéuticas.



Anexo 57. Diagrama de la obtención del *Aedes aegypti*.



Anexo 58. Diagrama del Test de repelencia



Anexo 59. Matriz de consistencia

“Efecto repelente de la loción a base del aceite esencial de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle(limón criollo); contra mosquitos hembras adultas de la especie *Aedes aegypti*”

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Dimensión	Indicadores	Método
<p>Problema general</p> <ul style="list-style-type: none"> ¿Tendrá actividad repelente la loción elaborada a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle contra mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i>? <p>Problemas específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> ¿Qué tipos de metabolitos secundarios estarán presentes en el aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle? ¿Cuál será el efecto repelente de la loción elaborada a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle contra los mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i>? ¿La loción a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle será tan efectiva como la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET)? 	<p>Objetivo general</p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluar la actividad repelente de la loción a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle contra mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i>. <p>Objetivos específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> Identificar los tipos de metabolitos secundarios en el aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle Preparar una loción a partir del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle y determinar su efecto repelente contra los mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i>. Determinar la actividad repelente de la loción a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle en comparación con la loción repelente a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET). 	<p>Hipótesis general</p> <ul style="list-style-type: none"> La loción a base de aceite esencial de <i>Citrus Aurantifolia</i> (Christm.) Swingle tiene actividad repelente contra mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i>. <p>Hipótesis específicas</p> <ol style="list-style-type: none"> Los terpenoides son los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle. La loción elaborada a base de aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle tiene efecto repelente contra los mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i> La loción a base del aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle tiene efecto repelente comparado con la loción a base de N, N-dietil-meta-toluamida (DEET) 	<p>V.I.</p> <p>Metabolitos secundarios de la loción a base de aceite esencial de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle</p>	<p>Fitoquímica</p>	<ul style="list-style-type: none"> Terpenoides Compuestos fenólicos 	<p>Tipo de investigación : Cuantitativa</p> <p>Diseño: experimental “puro”</p> <p>METODOLOGÍA</p> <p>Material Vegetal</p> <p>Población: 50 kg de frutos semimaduros de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle (limón criollo).</p> <p>Muestra: 8 kg de flavedo (cáscaras) de frutos semimaduros de <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle (limón criollo).</p> <p>Material Biológico 1</p> <p>Población: <i>Aedes aegypti</i> hembras y machos criadas en condiciones de laboratorio.(59)</p> <p>Muestra: 1,710 mosquitos hembras de <i>Aedes aegypti</i>.</p> <p>Material Biológico 2</p> <p>Población: Posibles 12 voluntarios hombres y mujeres de 18 - 28 años.(18)</p> <p>Muestra: 4 voluntarios, dos hombres y dos mujeres.</p> <p>Forma farmacéutica: Se formuló cuatro lociones a concentraciones de 2, 4, 10 y 15%. (69)</p> <p>Test de repelencia: Se utilizó el método de cebo humano de Effiom et al (2012) (15), (18), (14), (11), (63).</p>
			<p>V.D.</p> <p>Efecto repelente contra mosquitos hembras de la especie <i>Aedes aegypti</i></p>	<p>Entomología</p>	<ul style="list-style-type: none"> % mosquitos repelidos Tiempo de exposición Tiempo de protección eficaz Nº de picaduras 	

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 60. Autorización de la donación de larvas de *Aedes aegypti*, INS

**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**

"Año de la Lucha contra la corrupción y la impunidad"

NOTA INFORMATIVA N° 025-2019-LAB.ENTO-DEET-CNSP/INS

PARA : Blgo. Ronnie Gavilán Chávez
Director Ejecutivo
Dirección Ejecutiva de Enfermedades Transmisibles

ASUNTO : Donación de 50 larvas de *Aedes aegypti* para trabajo de investigación

REFERENCIA : Carta N° 434-D-FCsFB-2018

FECHA : Chorrillos, 14 de febrero del 2019.

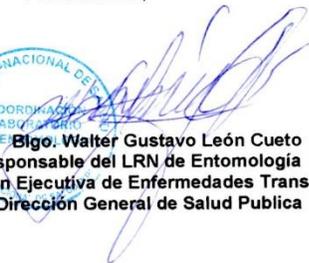
Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente e informarle que el 14 de febrero del presente, se le entregaron **50 larvas de *Aedes aegypti*** procedentes de nuestro Insectario y previamente identificadas taxonómicamente, a la Bachiller **Araceli Ayme Guadalupe Huamán**, de acuerdo a la Carta de la referencia.

Las larvas fueron donadas a la Bachiller en mención como colaboración para realizar su trabajo de investigación de tesis, para optar su Título Profesional.

Se solicita continuar con los trámites a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica para que los interesados reciban la documentación respectiva.

Sin otro particular, es propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración y estima persona

Atentamente,



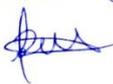
Blgo. Walter Gustavo León Cueto
Responsable del LRN de Entomología
Dirección Ejecutiva de Enfermedades Transmisibles
Dirección General de Salud Pública

Anexo 61. Formulario de salida de *Aedes aegypti*, INS

	FORMULARIO	FOR-CNSP-088
	SALIDA DE MATERIAL BIOLÓGICO	Edición N° 01

Nombre del remitente	Blgo. Walter León Cueto		
Laboratorio remitente	LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA		
Nombre del destinatario o Institución solicitante	Universidad Inca Garcilaso de la Vega		
Nombre del personal autorizado para recepción	Sra. Araceli Aymee Guadalupe Huamán		
Documento de referencia	Carta n° 434-D/FCsFB-2018		
* Nivel de riesgo biológico del material a entregar (NBS) (marcar con un aspa donde corresponda)			
1	X	2	3
Condiciones de transporte del material biológico (describa o marque un aspa donde corresponda)			
Temperatura	Observaciones		
Ambiente	X		
Refrigeración			
Congelación			
Tipo de muestra			
Suero	Cepa/cultivo	Lamina	Otros X
Detallar el contenido y/o características del material biológico			Cantidad
Larvas de <i>Aedes aegypti</i>			Sin Retorno 50
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">14 de Febrero del 2019</p>  <p style="text-align: center;">Blgo. Walter León Cueto Responsable del Laboratorio</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;">N° Oficio DG en respuesta de entrega del material biológico a la institución solicitante</p>   <p style="text-align: center;">V° B° Director Ejecutivo</p> </div> </div>			

Recibe Conforme



Anexo 62. Solicitud para la donación del material biológico presentado al INS



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

“Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional”

Pueblo Libre, 12 de Octubre 2018

Carta N° 434 - D/FCsFB-2018

SEÑORA DIRECTORA
MARIA LUZ MIRAVAL TOLEDO
CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
Presente.-



De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted con la finalidad de saludarlo y, a la vez, presentarle a los Sr. **ARACELI AYMEE GUADALUPE HUAMAN- NIXON JAMER VELA HOYOS**; Bachilleres de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, quienes solicitan la colaboración mediante la donación de 50 larvas de la especie de ***Aedes aegypti***; para realizar su trabajo de investigación de tesis, para optar el Título Profesional con la realización de la Tesis Titulada: “EFECTO REPELENTE DE LA LOCION A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus aurantifolia swingle*, CONTRA MOSQUITOS HEMBRAS ADULTAS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti*”.

Agradeciendo anticipadamente su apreciada colaboración, hago propicia la oportunidad para expresar los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

Cordialmente

JAT/ym.
H.T. 971880.


 **Dr. Jaime Aliaga Tovar**
DECANO (e)
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y
Bioquímica

Anexo 63. Recibo digital Turnitin.



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **Nixon Jamer Vela Hoyos**
Título del ejercicio: **EFECTO REPELENTE**
Título de la entrega: **EFECTO REPELENTE**
Nombre del archivo: **TESIS ARACELI Y JAMER.docx**
Tamaño del archivo: **16.14M**
Total páginas: **144**
Total de palabras: **23,798**
Total de caracteres: **136,132**
Fecha de entrega: **27-sep-2019 10:25a.m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **1181338833**



Anexo 64. Informe del programa Turnitin.

EFFECTO REPELENTE

INFORME DE ORIGINALIDAD

26%

INDICE DE SIMILITUD

22%

FUENTES DE
INTERNET

3%

PUBLICACIONES

17%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	cybertesis.uni.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	www.elsevier.es Fuente de Internet	2%
3	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uandina.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	documents.mx Fuente de Internet	1%
6	documentop.com Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	1%
8	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%
9	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%