

Formulación de un bioproducto insecticida a base de metabolitos secundarios de plantas medicinales para el control de *Aedes aegypti*

Paula Andrea Rodríguez Villalba

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Jonny Edward Duque Luna, Ph.D

Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica

Codirector

Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D

Doctora en Ciencias con énfasis en Bioquímica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

*A mis padres, Martha y Alberto, por formarme en la persona que soy, por su ejemplo, por inculcarme lo valioso e importante de la educación, y por su incansable lucha para brindarme la oportunidad de recibirla. Así como, para todas aquellas personas que creyeron en mí y en este trabajo.*

### **Agradecimientos**

A Dios, arquitecto de todas las cosas, por darme el don de la vida y un propósito.

Mi más profundo agradecimiento, a mis profesores, Jonny Duque y Stelia Carolina Méndez, por ser un ejemplo tanto profesional como personal, por brindarme su mentoría al resolver cada duda con paciencia, por acompañamiento y criterio en cada etapa de este proyecto.

A mi familia, en especial a mis padres, por su constante apoyo, amor incondicional y sus palabras de aliento a lo largo de mi carrera.

A Andrea, por su apoyo inquebrantable, su compañía y su amor en los momentos más desafiantes, así como a su familia por su generosidad y hospitalidad durante el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros del CINTROP y del GIBIM, por compartir sus conocimientos, su experiencia y su constante disposición para colaborar, contribuyendo de manera significativa a mi formación. En especial a Andres Cabezas por valioso acompañamiento y apoyo en el desarrollo de la parte *in vitro* del proyecto.

## Tabla de contenido

<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Marco referencial y antecedentes.....</b>	<b>12</b>
1.1 Aedes aegypti.....	12
1.2 Ciclo de vida de Ae. aegypti.....	13
1.3 Ciclo de transmisión de enfermedades.....	14
1.4 Métodos clásicos de control y sus problemáticas asociadas.....	15
1.5 Componentes naturales como método de control contra Ae. aegypti.....	17
1.6 Metabolitos secundarios.....	20
1.7 Mecanismos de acción de moléculas naturales.....	23
1.8 Marco regulatorio y relevancia de los insecticidas de origen natural.....	25
1.9 Compuestos naturales y su papel en el mercado de plaguicidas.....	26
1.10 Vehículos de administración de moléculas naturales.....	28
1.10.1 Encapsulación.....	29
1.10.2 Gelificación iónica.....	30
1.10.3 Hidrogeles.....	31
1.10.4 Formulaciones sólidas.....	32
1.10.5 Formulaciones semisólidas.....	34
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo general.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>36</b>
3.1 Obtención de metabolitos secundarios.....	36
3.2 Crianza, manutención y reproducción de la colonia de Aedes aegypti.....	36
3.3 Consideraciones éticas.....	37
3.4 Evaluación de la actividad adulticida y determinación de dosis letales.....	37
3.5 Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa.....	39
3.6 Formulación del gel insecticida.....	39
3.7 Preparación del formulado en gel.....	41
3.8 Evaluación de la actividad adulticida del formulado.....	41
3.9 Caracterización fisicoquímica del formulado.....	42
3.10 Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	42
3.11 Análisis estadístico.....	43
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>44</b>
4.1 Resultados relacionados con el objetivo 1: Actividad adulticida de metabolitos secundarios.....	44
4.2 Resultados relacionados con el objetivo 2: Desarrollar un prototipo de formulado con el metabolito secundario de mejores resultados en la fase in vivo.....	52
4.3 Resultados relacionados con el objetivo 3: Caracterización fisicoquímica del formulado.....	60
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>66</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Revisión de la literatura. Avances en la identificación de especies con actividad insecticida sobre <i>Aedes aegypti</i> .....	18
<b>Tabla 2.</b> Actividad insecticida de metabolitos secundarios aislados sobre <i>Aedes aegypti</i> .....	21
<b>Tabla 3.</b> Análisis de mercado acerca de bioproductos comercializados actualmente a base de AE o metabolitos secundarios aislados sobre zancudos.....	27
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la formulación en gel con 1% de metabolito secundario.....	40
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones letales relativas para cada metabolito a las 24h de exposición.....	45
<b>Tabla 6.</b> Actividad adulticida de metabolitos secundarios bajo concentraciones diagnósticas.....	45
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de recuperación a los tiempos de 90 min y 1440 min.....	46
<b>Tabla 8.</b> Efecto knockdown y toxicidad letal de eugenol sobre adultos <i>Ae. aegypti</i> .....	50
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones letales obtenidas mediante análisis probit para el formulado en gel.....	56
<b>Tabla 10.</b> Propiedades fisicoquímicas del formulado.....	60

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Canal endémico de dengue en Colombia para las semanas epidemiológicas 01 a 33 de 2025.....	13
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> y ciclo de transmisión de enfermedades.....	15
<b>Figura 3.</b> Tipos de nanoemulsiones. A: nanoemulsión de aceite en agua, B: Nanoemulsión de agua en aceite.....	29
<b>Figura 4.</b> Evaluación de la mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> frente a concentraciones múltiples de eugenol.....	47
<b>Figura 5.</b> Actividad de la acetilcolinesterasa en homogenato de adultos <i>Ae. aegypti</i> en presencia de eugenol 500 ppm.....	51
<b>Figura 6.</b> Comparación visual de la base del gel (blanco, sin eugenol) y el formulado con eugenol luego de una semana de preparado.....	54
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> frente a concentraciones múltiples del formulado en gel.....	55
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>Aedes aegypti</i> después de la exposición al formulado en gel recién preparado y tras su almacenamiento hasta 4 semanas después.....	57
<b>Figura 9.</b> Evolución del porcentaje de sinéresis en el formulado a lo largo de cuatro semanas de almacenamiento.....	61
<b>Figura 10.</b> Caracterización morfológica del formulado en gel.....	65

**Lista de abreviaturas**

AChE	Acetilcolinesterasa
AE	Aceite esencial
Ae.	Aedes
CHIKV	Chikungunya
CINTROP	Centro de investigaciones en enfermedades tropicales
CL	Concentración letal
DENV	Dengue
EPA	Agencia de protección del medio ambiente
GIBIM	Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología
INS	Instituto nacional de Salud
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
ppm	Partes por millón
SE	Semana epidemiológica
ZIKV	Zika

## Glosario

**Bioproducto:** cualquier producto útil derivado de organismos vivos o sistemas derivados de organismos vivos.

**Insecticida:** que sirve para matar insectos

**Biocida:** que destruye seres vivos, particularmente los perjudiciales para el ser humano

**Dosis diagnóstica:** Dosis de un insecticida que resulta en la mortalidad del 100% de los zancudos en un periodo de tiempo determinado.

## Resumen

**Título:** Formulación de un bioproducto insecticida a base de metabolitos secundarios de plantas medicinales para el control de *Aedes aegypti*<sup>1\*</sup>

**Autor:** Paula Andrea Rodríguez Villalba, Jonny Edward Duque Luna<sup>2\*</sup>, Stelia Carolina Méndez Sánchez<sup>2\*</sup>.

**Palabras Clave:** Actividad adulticida, insecticida, *Aedes aegypti*, bioproducto, metabolitos secundarios.

*Aedes aegypti* es el principal vector de distintos arbovirus como dengue, Zika y chikunguña y su control presenta un desafío para la salud pública debido a la resistencia del vector y al impacto ambiental de los insecticidas sintéticos. Ante esta problemática, se buscó desarrollar una alternativa de origen natural basada en metabolitos secundarios de plantas medicinales. El objetivo de este estudio fue formular un bioproducto con actividad adulticida sobre *Aedes aegypti* y analizar su eficacia biológica junto con su caracterización fisicoquímica.

Para ello, se determinaron experimentalmente las concentraciones letales de los metabolitos 1,8-cineol y eugenol mediante bioensayos adulticidas siguiendo el protocolo CDC. El eugenol presentó la mayor actividad, alcanzando un 100% de mortalidad a 500 ppm tras 15 minutos de exposición, lo que se correlaciona con una inhibición del 47,52% de la acetilcolinesterasa, en ensayos *in vitro*. Con base en estos resultados, se formuló un gel semisólido a base de agar-agar incorporando eugenol como compuesto activo. El formulado mostró una evidente actividad insecticida manteniendo su efecto durante al menos cuatro semanas.

Los resultados confirmaron el potencial del eugenol como molécula adulticida y evidenciaron que la matriz en gel constituye un vehículo adecuado para su protección y liberación controlada. Este estudio presenta una estrategia innovadora para el control del vector en su estadio adulto y destaca el valor de los metabolitos secundarios en el desarrollo de bioproductos insecticidas eficaces y ambientalmente sostenibles.

---

<sup>1\*</sup> Trabajo de Grado

<sup>2\*</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Pregrado en Química. Director: Jonny Edward Duque Luna. Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica. Codirector: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Doctora en Ciencias con énfasis en Bioquímica.

### Abstract

**Title:** Formulation of a bioproduct with insecticidal activity based on secondary metabolites from medicinal plants against *Aedes aegypti*<sup>1\*</sup>

**Author(s):** Paula Andrea Rodríguez Villalba, Jonny Edward Duque Luna<sup>2\*</sup>, Stelia Carolina Méndez Sánchez<sup>2\*</sup>

**Key Words:** Adulticidal activity, insecticide, *Aedes aegypti*, bioproduct, secondary metabolites

*Aedes aegypti* is the main vector of several arboviruses such as dengue, Zika, and chikungunya, and its control remains a major challenge for public health due to the vector's resistance and the environmental impact of synthetic insecticides. In response to this issue, a natural alternative based on secondary metabolites from medicinal plants was explored. The aim of this study was to formulate a bioproduct with adulticidal activity against *Aedes aegypti* and to evaluate its biological efficacy along with its physicochemical characterization.

To this end, the lethal concentrations of the metabolites 1,8-cineole and eugenol were experimentally determined through adulticidal bioassays following the CDC protocol. Eugenol exhibited the highest activity, achieving 100% mortality at 500 ppm after 15 minutes of exposure and showing 47.52% inhibition of acetylcholinesterase. Based on these findings, a semisolid agar-based gel incorporating eugenol as the active compound was formulated. The gel demonstrated evident insecticidal activity, maintaining its effect for at least four weeks.

The results confirmed the potential of eugenol as an adulticidal molecule and revealed that the gel matrix serves as a suitable vehicle for its protection and controlled release. This study proposes an innovative strategy for vector control at the adult stage and highlights the value of secondary metabolites in the development of effective and environmentally sustainable insecticidal bioproducts.

---

<sup>1\*</sup> Degree Work

<sup>2\*</sup> Faculty of Sciences. School of Chemistry. Undergraduate Program in Chemistry. Advisor: Jonny Edward Duque Luna, Ph.D. in Biological Sciences with emphasis in Medical Entomology. Co-Advisor: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. in Sciences with emphasis in Biochemistry.

## Introducción

El mosquito antropofílico *Aedes aegypti* es el principal vector de arbovirus como el Zika (ZIKV), dengue (DENV) y Chikunguña (CHIKV) y representa una amenaza a la salud pública mundial. Hasta la semana 39 de 2025, en Colombia se ha registrado un acumulado de 105,467 casos de dengue, de los cuales el (62,5 %) corresponde a casos sin signos de alarma, el (36,5 %) a casos con signos de alarma y 1,0 % (1,022) a dengue grave (INS, 2025). La distribución de *Ae. aegypti* abarca 24 de los 32 departamentos del territorio Colombiano con una estimación de área ocupada del 70% (Jurado et al., 2023). Tradicionalmente, el control del vector en su fase adulta se ha realizado predominantemente mediante el uso de insecticidas sintéticos, como los organofosforados (ej., malatión), piretroides (ej., permetrina y deltametrina), dinitrofenoles, organotinos y pirazoles. Sin embargo, los insecticidas convencionales usualmente empleados para el control de este vector en su estadio adulto presentan problemáticas graves como la persistencia y acumulación en los ecosistemas, riesgos para la salud humana y aumento de la resistencia en poblaciones del vector (Chen et al., 2020; Fagbohun et al., 2022; Pathak et al., 2022).

Estas limitaciones evidencian la necesidad de alternativas sostenibles y seguras que contribuyan al control del vector sin comprometer la salud humana ni el equilibrio ambiental. En este sentido, los metabolitos secundarios de plantas, han despertado un interés creciente por su actividad insecticida y su carácter biodegradable (Borrero-Landazabal et al., 2020; Duque et al., 2023; Pavela et al., 2019; Ware, 2004). No obstante, a pesar del progreso en la identificación de moléculas vegetales con potencial insecticida aún persiste la necesidad de profundizar en la formulación de productos efectivos que integren estas moléculas vegetales en sistemas prácticos, estables, asequibles y de fácil aplicación orientadas al control del vector en su estadio adulto.

En este contexto, el presente estudio propone un gel semisólido a base de un metabolito secundario con actividad adulticida incorporado como compuesto activo. Los resultados evidenciaron que es posible formular un gel capaz de inducir más del 75% de mortalidad en zancudos adultos en un periodo menor a dos horas de exposición, mantener la biodisponibilidad del metabolito por al menos cuatro semanas e inducir la liberación controlada de sus componentes volátiles. Este bioproducto constituye una alternativa ecológica frente a los insecticidas sintéticos convencionales, al emplear compuestos biodegradables y de baja toxicidad ambiental, además de contribuir al avance del conocimiento sobre sistemas innovadores de administración de moléculas naturales con potencial insecticida.

## **1. Marco referencial y antecedentes**

### ***1.1 Aedes aegypti***

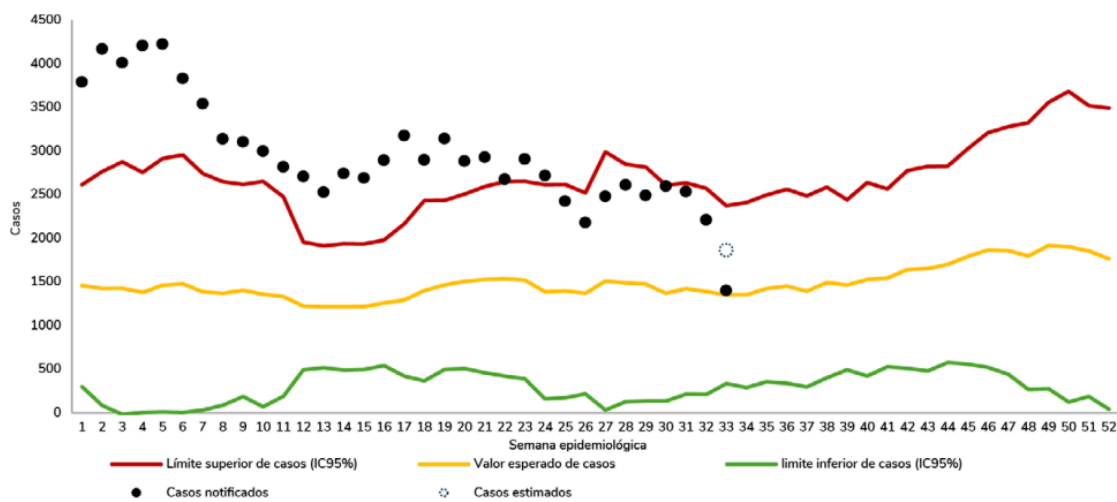
Pertenece al orden Diptera, familia culicidae y subfamilia culicinae, ha sido objeto durante décadas de investigaciones debido a su papel destacado como vector en la propagación de arbovirus, representando una amenaza constante para la salud pública. Según datos reportados por la organización panamericana de la salud (OPS, 2024), hasta la semana epidemiológica (SE) 32 de 2025, se reportaron 3,634,587 casos sospechosos de dengue, de los cuales 1,470,971 fueron confirmados (40.5%), con una letalidad del 0.050%. Esta cifra representa una disminución del 69% en comparación con el mismo periodo del 2024 y 10% con respecto al promedio de los últimos cinco años. Dado que para el año 2024, en la SE 36 se reportó un acumulado de 11.732.921 casos de dengue, lo que representó más del doble de los casos registrados durante todo el 2023 (4.594.823 casos).

En Colombia, hasta la semana 33 del presente año (2025) se han notificado 97,705 casos de dengue, de los cuales 930 corresponden a dengue grave. El departamento de Santander, se

encuentra entre los tres departamentos con mayor número de casos (8% del total del país) con un acumulado de 8,394. Adicionalmente, el número de casos de dengue en el país se ubicó en situación de alerta, lo que indica que los datos reportados fueron mayores a los esperados con base en el comportamiento histórico (INS, 2025) (**Figura 1**). Las crecientes preocupaciones a nivel mundial frente a los arbovirus se evidencian en la rápida expansión geográfica del vector y en el incremento de la carga de morbilidad asociada (Kraemer et al., 2015).

### Figura 1.

*Canal endémico de dengue en Colombia para las semanas epidemiológicas 01 a 33 de 2025.*



*Nota.* El gráfico muestra la comparación entre el número de casos de dengue notificados, el valor de casos esperados y los límites superior e inferior, calculados a partir del promedio de los cinco años anteriores. Tomado del Instituto *Nacional de Salud-INS, Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública; publicación en línea/2025.* (p. 33)

### 1.2 Ciclo de vida de *Ae. aegypti*

Se desarrolla en cuatro etapas metamórficas: huevo, larva, pupa y adulto. Durante las etapas de larva y pupa, el individuo se encuentra en un entorno acuático, pero en su etapa final (adulto) su ambiente es aéreo. Esto sin duda es un aspecto notable de su compleja biología y se ve influenciado por factores ambientales como temperatura, humedad relativa y accesibilidad a

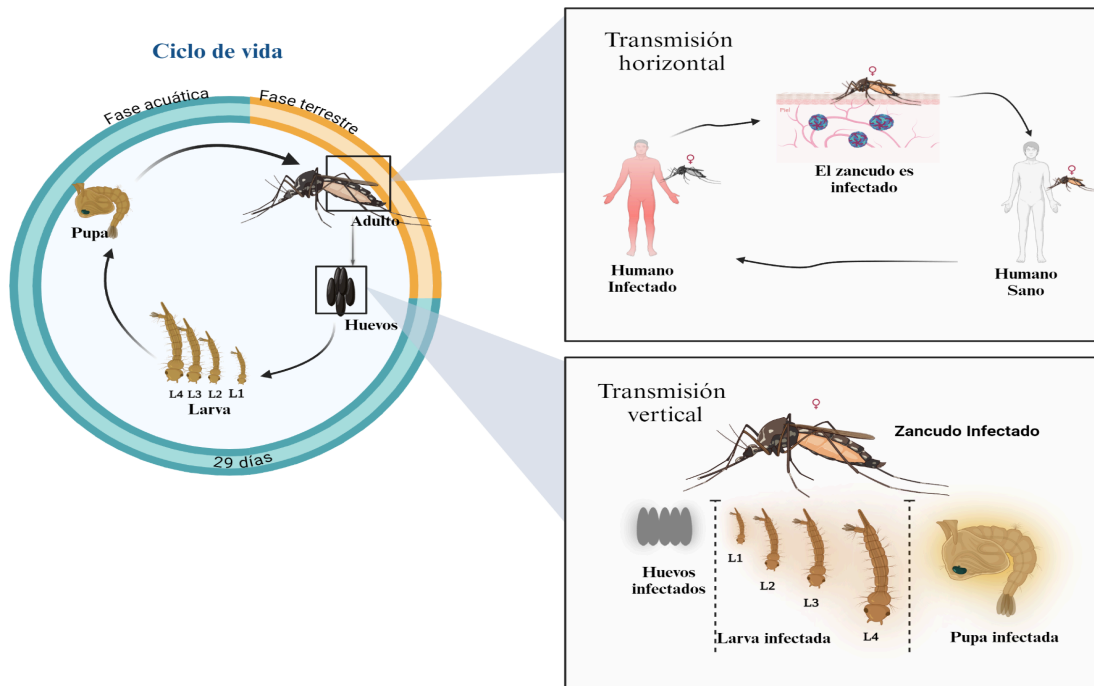
fuentes hídricas. Los huevos presentan una superficie alargada y lisa. Una sola hembra de esta especie puede poner 100 huevos a la vez. Estos eclosionan después de ser fecundados y sumergidos en agua. Además, estos pueden ser viables hasta ocho meses, al adherirse a las paredes de un recipiente (Tokachil & Yusoff, 2018). La etapa larval comprende cuatro estadios que representan fases de desarrollo distintas donde se aprecian notables cambios de elongación y maduración. Estas se alimentan de materia orgánica disuelta en el agua. Luego del cuarto estadio larval, entra en un estado de metamorfosis entre larva y el insecto adulto, llamado pupa. Finalmente, termina el ciclo desarrollándose como un adulto con alas de aproximadamente 4 a 7 mm. Se ha reportado que el ciclo de vida completo de *Ae. aegypti* toma 29 días (Anoopkumar et al., 2017).

### **1.3 Ciclo de transmisión de enfermedades**

Se ha demostrado que *Ae. aegypti* tiene una preferencia marcada a alimentarse de sangre humana por sobre otros mamíferos, tiende a buscar refugio en cercanías urbanas y alimentarse dentro de ellas. Además, se ha observado que prefiere alimentarse de sangre durante el día y puede hacerlo en un periodo de tiempo recurrente durante este (Harrington et al., 2001; McBride et al., 2014; Scott et al., 1993). El ciclo de transmisión de enfermedades por parte de esta especie involucra la interacción entre el vector, los agentes patógenos y los hospederos. Hay dos formas mediante las cuales el mosquito puede propagar los diversos arbovirus que lleva consigo. Estas se conocen como transmisión horizontal y vertical. La transmisión horizontal tiene lugar cuando una hembra infectada con los diferentes arbovirus pica a un humano no infectado. Otra forma de transmisión es la vertical, es cuando uno de los zancudos infectados, ya sea hembra o macho, transmite el virus a su descendencia (Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018).

**Figura 2.**

*Ciclo de vida de Aedes aegypti y ciclo de transmisión de enfermedades.*



*Nota.* Ciclo de vida de *Aedes aegypti* y distintas formas de transmisión de patógenos. Creado con BioRender.

#### 1.4 Métodos clásicos de control y sus problemáticas asociadas

El control vectorial se ejerce principalmente a través de tres enfoques: ambiental, biológico y químico. El control ambiental consiste en la identificación y erradicación de criaderos con el objetivo de detener la reproducción del vector (de Souza Wuilida et al., 2019). El control biológico se basa en la introducción de depredadores naturales como peces, libélulas y aves (Bay, 1967; Priyadarshana & Slade, 2023; Singh & Mohan, 2013). Por su parte, el control químico emplea insecticidas sintéticos para controlar el número de larvas y adultos de la especie en determinado lugar.

Los insecticidas sintéticos, en especial, piretroides y organofosforados se sitúan como los más eficaces para el control de insectos debido a sus propiedades químicas y mecanismos de acción, lo cual, los convierte en la forma de control vectorial predominante en la actualidad.

Los piretroides actúan sobre los canales de sodio del insecto induciendo hiperexcitación y parálisis. Sin embargo, debido a su vasto uso, se ha registrado que poblaciones de zancudos en todo el mundo han desarrollado resistencia a estos compuestos. Hasta ahora, desde el punto de vista molecular se han detectado más de una docena de mutaciones en el gen del canal de sodio en *Ae. aegypti* (Chen et al., 2020; Fagbohun et al., 2022), lo que constituye una forma de resistencia adquirida, derivada de cambios estructurales en esta proteína.

Asimismo, se ha informado que la exposición a piretroides como la permetrina ocasiona daño degenerativo en la morfología ovárica, neuronal, así como alteraciones en la microbiota intestinal de mamíferos. También, se reportó bioacumulación en leche materna humana, siendo bifenthrin la molécula más abundante en muestras recolectadas en Brasil,  $\lambda$ -cihalotrina en Colombia y permetrina en España, esclareciendo un riesgo para la salud humana (Carlioni et al., 2012; Corcellas et al., 2012; Kotil & Yön, 2015; Nasuti et al., 2016).

De la misma forma, Insecticidas como el malatión y el temefos, compuestos ampliamente utilizados para el control del vector por su rápido efecto, categorizados como organofosforados, ejercen su acción insecticida al inhibir la acetilcolinesterasa, una enzima fundamental para la neurotransmisión. No obstante, distintos autores han reportado efectos adversos asociados al uso de estos insecticidas, incluyendo el estrés oxidativo y la hiperglucemia, tanto en humanos como en animales. Asimismo, se ha identificado una relación estrecha entre la exposición temprana a estas moléculas y el desarrollo de enfermedades como la obesidad y diabetes (Slotkin, 2011).

En consecuencia, los productos químicos actuales muestran una eficacia decreciente en el control de vectores como *Ae. aegypti*, lo que evidencia la necesidad de encontrar nuevas

moléculas más efectivas y, preferiblemente, menos tóxicas.

### 1.5 Componentes naturales como método de control contra *Ae. aegypti*.

La identificación de moléculas bioactivas y la comprensión de su mecanismo de acción desempeñan un papel fundamental en el control poblacional de *Ae. aegypti*. El avance en este campo permite el desarrollo de nuevos insecticidas y repelentes, contribuyendo significativamente a las estrategias de gestión y prevención contra este vector. Diferentes estudios han reportado actividad ovicida, larvicida y adulticida mediante el uso de aceites esenciales, extractos y metabolitos secundarios (Alavez-Rosas et al., 2022; Mounghthipmalai et al., 2023)

El estudio e implementación de insecticidas de origen natural evita potencialmente el deterioro ambiental, la afectación a especies no objetivo, como insectos cruciales en el desarrollo del ecosistema, organismos acuáticos y seres humanos. Investigaciones recientes sugieren que a diferencia de los insecticidas sintéticos, las moléculas vegetales se degradan en compuestos no tóxicos o menos perjudiciales para el ambiente, mostrando además baja toxicidad en organismos no objetivo (Assadpour et al., 2024; Regnault-Roger et al., 2012). No obstante, su grado de seguridad depende del tipo de aceite, la concentración empleada, la vía de exposición y las condiciones de aplicación (Ferraz et al., 2022).

En este contexto, la **tabla 1** reúne algunos avances relevantes en la aceites esenciales con actividad insecticida sobre el vector de estudio. Para su elaboración, se seleccionaron únicamente artículos que reportan la actividad con datos cuantitativos ( $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  o mortalidad 100%), lo que permite comparar resultados y consolidar evidencia disponible sobre especies con potencial insecticida.

**Tabla 1.**

*Revisión de la literatura. Avances en la identificación de especies con actividad insecticida sobre Aedes aegypti.*

Autores	Compuestos bioactivos	Investigación
(Castillo et al., 2017)	<i>Lippia origanoides</i> mostró una mortalidad del 100% en adultos de la especie <i>Ae. aegypti</i> a una concentración de 300 y 1000 ppm.	Actividad insecticida y repelente de varios aceites esenciales contra <i>Aedes aegypti</i> .
(Duque et al., 2023)	<i>Steiractinia aspera</i> (CL <sub>50</sub> = 42.4 µg/ mL), <i>Turnera difusa</i> (CL <sub>50</sub> = 70.9 µg/mL), <i>Piper aduncum</i> (CL <sub>50</sub> = 55.8 µg/mL), <i>Lippia origanoides</i> (thymol/carvacrol) (CL <sub>50</sub> = 61.9 µg/mL), <i>L. origanoides</i> (carvacrol/thymol) (CL <sub>50</sub> = 59.8 µg/mL), <i>Hyptis dilatata</i> (CL <sub>50</sub> = 61.1 µg/mL), <i>Elaphandra quinquenervis</i> (CL <sub>50</sub> = 61.1 µg/mL), y <i>Calycolpus moritzianus</i> (CL <sub>50</sub> = 73.29 µg/mL)	Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas de América sobre <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae): una introducción a su posible mecanismo de acción.
(Seixas et al., 2023)	<i>Artemisia camphorata</i> (CL <sub>50</sub> = 64.95 µg/mL)	Composición química y actividad larvicida de los aceites esenciales de tres especies de <i>Artemisia</i>
(Coulibaly et al., 2024)	<i>Lippia alba</i> (quimiotipo citral) demostró actividad adulticida con mortalidad del 100% a la concentración de 5%.	Efectos biológicos del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> contra <i>Anopheles gambiae</i> y <i>Aedes aegypti</i> .

---

(Manh et al., 2020)	<i>Cymbopogon citratus</i> (CL <sub>50</sub> = 120.6 ppm), <i>Cymbopogon winterianus</i> (LC50 = 38.8 ppm), <i>Eucalyptus citriodora</i> (CL <sub>50</sub> = 104.4 ppm), y <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (CL <sub>50</sub> = 33.7 ppm).	Actividad larvica contra mosquitos de los aceites esenciales de especies de <i>Cymbopogon</i> y <i>Eucalyptus</i> en Vietnam.
(Manh & Tuyet, 2020)	<i>Mentha arvensis</i> (CL <sub>50</sub> = 78.1 ppm)	Actividad larvica y repelente del aceite esencial de <i>Mentha arvensis</i> contra <i>Aedes aegypti</i> .
(Hung et al., 2019)	<i>Crassocephalum crepidioides</i> (CL <sub>50</sub> = 4.95 ppm)	Composiciones químicas de los aceites esenciales de <i>Crassocephalum crepidioides</i> y actividades larvicidas contra <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y <i>Culex quinquefasciatus</i>
(Rodrigues et al., 2019)	<i>Syzygium aromaticum</i> (CL <sub>50</sub> = 32.7 ppm) y <i>Croton nepetaefolius</i> (CL <sub>50</sub> = 81.7 ppm)	Diferentes susceptibilidades de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> a productos derivados de plantas.
(Chansang et al., 2018)	<i>Cyperus rotundus</i> (CL <sub>50</sub> =10.05 ppm) <i>Alpinia galanga</i> (CL <sub>50</sub> = 7.97 ppm) <i>Cinnamomum verum</i> (CL <sub>50</sub> =3.30 ppm)	Sinergia en la eficacia adulticida de los aceites esenciales para la mejora de la toxicidad de la permetrina contra <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)

---

---

(Aungtikun & Soonwera, 2021)	La combinación sinérgica entre aceites esenciales de <i>Cinnamomum verum</i> , <i>C. cassia</i> y <i>C. loureiroi</i> fue más tóxica para ambas especies de mosquitos que la cipermetrina al 1% p/v.	Mejora de la actividad adulticida contra <i>Aedes aegypti</i> (L.) y <i>Aedes albopictus</i> (Skuse) gracias a la sinergia entre aceites esenciales de <i>Cinnamomum</i> spp.
------------------------------	--	---

---

(Ravi et al., 2020)	Los extractos de <i>A. pinnata</i> mostraron valores $CL_{50}$ y $CL_{95}$ de 2572,45 y 6100,74 ppm, respectivamente, contra <i>Ae. aegypti</i> .	El uso potencial de <i>Azolla pinnata</i> como bioinsecticida
---------------------	---	---

---

*Nota.* Esta tabla muestra algunas de las especies de plantas identificadas con actividad insecticida sobre *Ae. aegypti*.

### 1.6 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de plantas son moléculas que cumplen diferentes funciones ecológicas como constituir un sistema de defensa química ante herbívoros y/o patógenos, la atracción de polinizadores y la protección contra el estrés abiótico (Khan et al., 2025; Ravichandran et al., 2024). Por lo cual, no participan directamente en los procesos metabólicos primarios necesarios para el crecimiento y la reproducción. Dentro de este grupo se incluyen una amplia variedad de compuestos químicos como alcaloides, terpenoides, flavonoides y compuestos fenólicos. Numerosos estudios han demostrado que estas moléculas son capaces de interrumpir eficazmente los procesos biológicos de insectos como *Ae. aegypti*. Entre las afecciones se resaltan aquellas a enzimas clave en su sistema nervioso, como la acetilcolinesterasa, canales del sodio dependientes del voltaje, receptores GABBA, nicotínicos, entre otros (Cruz-Castillo et al., 2023; Jankowska et al., 2017; Khanikor, 2013). Además, se ha reportado su acción sobre los distintos complejos mitocondriales, cruciales para la respiración

celular y procesos metabólicos así como alteraciones en el ciclo de ecdisis, prolongando el tiempo que el individuo pasa en el estadio de larva (Castillo-Morales et al., 2021; Duque et al., 2023). En este contexto, la tabla 2 presenta una recopilación de metabolitos secundarios con reportes de actividad adulticida sobre *Ae. aegypti*, en concordancia con el enfoque del presente estudio. Para su elaboración, se seleccionaron únicamente investigaciones con reportes de datos cuantitativos expresados como concentración letal ( $CL_{50}$ ). La búsqueda bibliográfica se realizó empleando la frase adulticidal activity AND (secondary metabolites OR plant compounds) AND *Aedes aegypti*.

**Tabla 2.**

*Actividad insecticida de metabolitos secundarios aislados sobre Aedes aegypti.*

<b>Metabolito</b>	<b>Clase química</b>	<b>Fuente del compuesto</b>	<b>Actividad</b>	<b>Fuente</b>
<b>Citral</b>	Monoterpeno	<i>Citrus aurantifolia</i>	Adulticida ( $CL_{50}$ =103.88 ppm) a las 24h	(Sarma et al., 2019b)
<b>Carvacrol</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}$ =30.95 mg/mL) a las 24h	(Eltalawy et al., 2025)
<b>(-)-terpinen-4-ol</b>	Monoterpeno	<i>Zingiber cassumunar</i>	Adulticida ( $CL_{50}$ =2.10%) a las 24h	(Li et al., 2021)
<b>P-cimeno</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}$ =32.8 $\mu$ g/mg) a las 48h	(Silva et al., 2018)

<b>Linalool</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=16.38$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) a las 48h	(Silva et al., 2018)
<b>Eudesmol</b>	Sesquiterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=1.82$ ) a las 24h	
<b>Sulcatyl acetate</b>	Terpenoide	Sintetizado a partir de 6-methyl-5-he pten-2-one	Adulticida ( $CL_{50}=25.23$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) a las 48h	(Silva et al., 2018)
<b>Eudesmol</b>	Sesquiterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=1.82$ ) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)
<b>Disulfuro de dialilo</b>	Compuesto organosulfurado	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=166.02$ ppm) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)
<b>Trisulfuro de dialilo</b>	Compuesto organosulfurado	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=298.07$ ppm) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)
<b>Eucaliptol</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=17.60$ pmm) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)
<b>Limoneno</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=737.01$ ppm) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)
<b>Carvona</b>	Monoterpeno	Comercial	Adulticida ( $CL_{50}=140.79$ ppm) a las 24h	(Sarma et al., 2019a)

<b>Pulegona</b>	Monoterpeno	Comercial	Toxicidad fumigante de 0.02 mg/L	(Flores Guillermo et al., 2020)
<b>Citronellal</b>	Monoterpeno	Comercial	Toxicidad fumigante de 0.04 mg/L	(Flores Guillermo et al., 2020)
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	Monoterpeno	Comercial	Toxicidad fumigante de 1.82 mg/L	(Flores Guillermo et al., 2020)
<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	Sesquiterpeno	Comercial	Toxicidad fumigante de 3 mg/L	(Flores Guillermo et al., 2020)

*Nota.* La tabla reúne metabolitos secundarios con actividad adulticida sobre *Aedes aegypti*, seleccionados en función de la disponibilidad de datos cuantitativos ( $CL_{50}$ ) incluyendo su clase química y fuente.

### 1.7 Mecanismos de acción de moléculas naturales

Diversos estudios han demostrado que los aceites esenciales y sus metabolitos secundarios ejercen su actividad insecticida a través de distintos mecanismos de acción. Particularmente, los aceites esenciales se destacan por su efecto multitarget sobre objetivos farmacológicos de importancia en la formulación de insecticidas ya que actúan sobre diferentes proteínas de importancia biológica produciendo a un resultado letal en el insecto (Loza-Mejía et al., 2018).

Entre los mecanismos de acción más reportados se encuentra la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en tiocolina y acetato. Este proceso es crucial para permitir que la neurona regrese a su estado de reposo después de la activación. Cuando la actividad de esta proteína disminuye a causa de la presencia de un inhibidor, se produce la bioacumulación de acetilcolina, hiperestimulación de los receptores

colinérgicos y alteración de la neurotransmisión, lo que se traduce en hiperexcitación y la muerte (Colović et al., 2013).

Otro objetivo molecular de gran relevancia son los canales de sodio dependientes del voltaje, proteínas que tienen la función de regular el paso de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) dentro y fuera de la célula para controlar la despolarización de la membrana. Se han desarrollado moléculas capaces de estabilizar el estado abierto de estos canales, provocando corrientes prolongadas o su estado desactivado, impidiendo el paso de iones. Debido a que estos canales son componentes esenciales de la excitabilidad celular cualquier alteración es letal para el insecto, lo que explica porqué constituyen el principal objetivo de numerosas neurotoxinas naturales producidas por plantas y animales para defenderse (Silver et al., 2014).

Asimismo, se ha identificado que algunos metabolitos secundarios de plantas pueden interrumpir el transporte de electrones a través de la cadena mitocondrial, al inhibir o sobreactivar los diferentes complejos. La alteración de la correcta actividad de la mitocondria resulta en la imposibilidad de las células de sintetizar energía, un aspecto clave para la funcionalidad correcta del individuo (Duque et al., 2023; Vanegas-Estévez et al., 2024).

Por otra parte, resulta importante considerar los posibles efectos sinérgicos y antagónicos al combinar metabolitos secundarios, puesto que la interacción puede modificar su perfil de acción. En particular, las interacciones sinérgicas resultan relevantes debido a que el efecto conjunto supera la actividad individual de cada compuesto y permiten reducir las dosis requeridas, así como, posibles efectos adversos. Por el contrario, las interacciones antagónicas ocurren cuando la acción combinada reduce la bioactividad en comparación con la observada de forma independiente (Boik et al., 2009)

En conjunto, conocer los distintos mecanismos de acción que explican la bioactividad de las moléculas naturales constituye una base sólida para el diseño de insecticidas más eficaces y

selectivos. En este sentido, aprovechar el efecto multi-target de los AEs y conocer las interacciones entre sus metabolitos secundarios posibilita el desarrollo de formulaciones con perfiles de acción favorables y sostenibles al mismo tiempo.

### **1.8 Marco regulatorio y relevancia de los insecticidas de origen natural**

En Estados Unidos, la ley federal sentencia que antes de comercializar cualquier producto en especial plaguicidas se debe registrar ante la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA). No obstante, algunos productos de bajo riesgo, incluidos ciertos aceites esenciales o metabolitos secundarios, pueden estar exentos del registro si cumplen con los criterios establecidos por la ley federal de insecticidas, fungicidas y rodenticidas (FIFRA). Mayormente, los insecticidas y repelentes registrados ante la EPA, ya sean de base natural o derivados, corresponden a cinco clases tradicionales como los piretroides, neonicotinoides, pirroles, quinolinas y espinosinas (Cantrell et al., 2012) siendo las espinosinas el único grupo de sustancias naturales no modificadas y los demás sustancias sintéticas derivadas de una forma natural. Sin embargo, en la última década se han reportado nuevas clases de moléculas con diferentes modos de acción dirigidos a múltiples proteínas objetivo. Estas incluyen moduladores de canales iónicos (Sodio, cloro, GABA, glutamato y órganos cordotonales), inhibidores enzimáticos (como la quitina sintasa), inhibidores de crecimiento, mitocondriales así como toxinas microbianas que alteran el intestino medio de los insectos (IRAC, 2025). Esta variedad de compuestos y modos de acción refleja el progreso en la búsqueda de nuevas dianas moleculares para reducir la resistencia y mejorar la eficacia de los insecticidas contra *Ae. aegypti*.

Además, tomando a consideración los registros de ingredientes activos de plaguicidas convencionales y biopesticidas en el portal de la EPA desde el año 1997 a 2010, se encontró que el 35.7% corresponde a productos naturales o sus derivados (Cantrell et al., 2012). Este hallazgo reafirma la relevancia de los productos en la industria y su parcialidad en el control de vectores.

De hecho, gran parte de los productos que se utilizan hoy en día a nivel de salud pública tienen origen en la investigación de moléculas vegetales con actividad insecticida.

### **1.9 Compuestos naturales y su papel en el mercado de plaguicidas**

Un pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias cuyo objetivo es prevenir, destruir, repeler o controlar una plaga y transmisores de enfermedades, como mosquitos, garrapatas, ratas y ratones (EPA, 2019). Se espera que el mercado de los pesticidas se encuentre valuado alrededor de los 26.23 billones entre 2021 y 2025 (Sălceanu et al., 2023). El crecimiento del mercado se debe principalmente a la creciente necesidad de controlar el ataque de plagas e insectos en cultivos pero también influyen otros factores como la seguridad alimentaria, y crecimiento de la población mundial.

Por otra parte, los biopesticidas comprenden extractos microbianos y compuestos naturales obtenidos de plantas u otros organismos. A diferencia de los insecticidas sintéticos, cuyo modo de acción suele dirigirse de manera generalizada a proteínas del sistema nervioso de los insectos, numerosos biopesticidas actúan a través de mecanismos alternativos, tales como la disrupción del apareamiento, la inhibición de la alimentación o la inducción de efectos físicos sobre el organismo plaga (Olson, 2015). En concordancia con estas características, se ha proyectado que para la década de 2040 o inicios de 2050 el mercado de biopesticidas podría aproximarse en tamaño al de los pesticidas sintéticos (Olson, 2015; Umetsu & Shirai, 2020).

En la actualidad, ante una creciente preferencia por productos de origen natural sobre los sintéticos, se vuelve crucial avanzar hacia el diseño de formulaciones a base de ingredientes vegetales. Este enfoque no solo responde a la demanda del consumidor, sino que también promueve la sostenibilidad ambiental, donde los aceites esenciales y extractos vegetales se posicionan como una alternativa viable y prometedora en el desarrollo de productos sostenibles. Además, la fragancia de plantas aromáticas y medicinales ofrecen, en muchos casos, un atractivo

único que puede influir significativamente en la comodidad, la percepción y la elección del insecticida natural, dado que los sintéticos suelen presentar olores irritantes y desagradables (Baer et al., 2009; Carvalho et al., 2016; Sharmeen et al., 2021).

Actualmente, la mayoría de los productos disponibles en el mercado a base de aceites esenciales o metabolitos secundarios están formulados como repelentes. Estos productos suelen incluir aceites esenciales como citronela, pimienta, hierba limón, eucalipto, romero, menta y madera de cedro, entre otros. El aceite esencial que más se destaca es el aceite de citronella, el cual ha sido usado por más de 50 años como repelente de insectos encontrado distintos productos de uso familiar como velas, lociones, geles, sprays y toallitas húmedas (EPA, n.d.1999). Esta tendencia responde a las numerosas pruebas científicas que avalan la eficacia de estas moléculas como repelentes contra vectores, incluido *Ae. aegypti*. De la misma forma, se han desarrollado algunas formulaciones con efectos insecticidas, como adulticidas y larvicidas, a base de aceites esenciales.

Con el fin de identificar productos disponibles en el mercado, se realizó una búsqueda exploratoria en motores de búsqueda utilizando palabras clave como “bioproductos insecticidas naturales para control de zancudos comercializados actualmente”, con el objetivo de encontrar ejemplos concretos de formulaciones comerciales a base de aceites esenciales dirigidas al control de vectores como *Aedes aegypti*. Los resultados se presentan en la **tabla 3**.

**Tabla 3.**

*Análisis de mercado acerca de bioproductos comercializados actualmente a base de AE o metabolitos secundarios aislados sobre zancudos.*

Producto (referencia)	Ingrediente activo	Compañía	Uso principal	Presentación y forma de aplicación
--------------------------	--------------------	----------	---------------	---------------------------------------

( <i>Mosquito Amigo</i> , n.d.)	Aceites esenciales de hierba limón y tomillo	BugMd	Repelente	Spray líquido de uso de exteriores sobre plantas o césped.
( <i>Essentria IC Pro Insecticide</i> , n.d.)	Geraniol, aceite de menta y aceite de clavo	Zoecon	Insecticida de amplio espectro	Concentrado líquido emulsionable para uso de interiores y exteriores
( <i>EcoSMART Mosquito Fogger</i> , n.d.)	Geraniol, aceite de romero y aceite de menta	EcoSmart	Adulticida	Aerosol para uso de exteriores
( <i>EcoVia MT Mosquito and Tick Control</i> , n.d.)	Aceite de soya, aceite de clavo, aceite de citronela, aceite de hierba limón	Eco Via MT	Repelente	Concentrado líquido de uso en interiores y exteriores
( <i>Mosquito X Ultra</i> , n.d.)	Aceite esencial de ajo y aceite de tomillo	EcoSafe	Repelente y adulticida	Concentrado líquido para uso en exteriores

No obstante, aunque en el mercado existen diversas formulaciones de amplio espectro efectivas contra mosquitos y otras plagas, no se han reportado productos basados en moléculas de origen natural, ni sus formulaciones, específicamente para el control del vector *Ae. aegypti* como insecticidas de uso en salud pública por ningún gobierno u entidad.

### 1.10 Vehículos de administración de moléculas naturales

Los metabolitos secundarios son compuestos volátiles y sensibles a la degradación por factores como la luz, lo que reduce su bioactividad. No obstante, un vehículo de administración

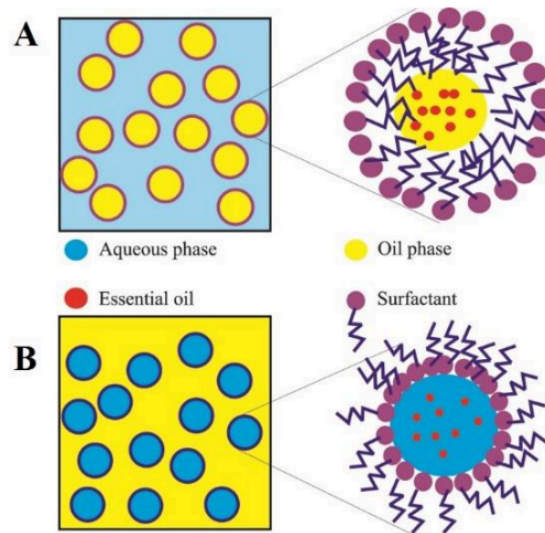
adecuado puede estabilizarlos y permitir una liberación controlada. En este sentido, un insecticida eficaz debe garantizar una acción prolongada y de liberación lenta, reduciendo así la necesidad de reaplicaciones. Los vehículos de formulación de aceites esenciales y metabolitos secundarios ampliamente estudiados son las nano emulsiones, microemulsiones, hidrogeles, formulaciones sólidas y uso de materiales poliméricos. Al momento de seleccionar el sistema de liberación se debe tomar a consideración parámetros como la fuerza de interacción entre la matriz y el metabolito secundario, la tasa de liberación deseada, las necesidades y la legislación (Ayllón-Gutiérrez et al., 2024).

### ***1.10.1 Encapsulación***

Los nano- (1–100 nm) o micro-formulados (1–1000  $\mu\text{m}$ ) reducen el tamaño de partícula y aumentan la relación superficie-volumen, lo que facilita la penetración a través de la cutícula del insecto o incrementa la solubilidad en agua, ya que los aceites esenciales tienen un gran carácter hidrofóbico y no se solubilizan con facilidad (Esmaili et al., 2021; Maes et al., 2019). Esta encapsulación permite retardar la degradación y evitar la volatilización. Debido a la naturaleza de los aceites esenciales se emplean comúnmente tres tipos de nanoformulaciones para su encapsulación: nanoemulsiones (**Figura 3**), nanotransportadores lipídicos y nanopartículas poliméricas (Esmaili et al., 2021).

**Figura 3.**

*Tipos de nanoemulsiones. A: nanoemulsión de aceite en agua, B: Nanoemulsión de agua en aceite.*



Nota. De “Revisión del uso de nanoformulaciones a base de aceites esenciales para el control de mosquitos” por F. Esmaili, 2021, Investigación de biointerfaces en química aplicada, volumen 11, p. 12518.

Las nano o microemulsiones son sistemas formados por la mezcla de dos compuestos inmiscibles, típicamente agua y aceite, estabilizados mediante tensoactivos. Mientras que las nanoemulsiones requieren procesos de alta energía, como sonicación o homogeneización, para obtener una emulsión estable, las microemulsiones pueden formarse de manera espontánea bajo métodos de preparación de baja energía (Anton & Vandamme, 2011). Las emulsiones más comunes son aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O).

### **1.10.2 Gelificación iónica**

La gelificación iónica permite establecer una red tridimensional que encapsula un aceite esencial o metabolito secundario. Esta técnica se basa en la interacción iónica de dos sustancias con diferencia de cargas (Cación y anión). Para ello se requiere un polímero catiónico como

quitosano o el alginato de sodio y un entrecruzador (crosslinker) como el tripolifosfato (TPP). La obtención de estructuras mediante esta técnica es relativamente fácil, rápida y no requiere solventes, lo cual, es muy favorable. Además, el anión TPP no es una molécula tóxica y es bastante económico (Kumar & Madihally, 2022). La preparación generalmente inicia con la protonación de los grupos funcionales protonables del polímero mediante su disolución en una solución ácida. Posteriormente, se adicionan tensioactivos, como Tween 20 o lauril sulfato de sodio, con el fin de estabilizar la emulsión. Una vez incorporado el aceite esencial o metabolito secundario, se agrega gota a gota el agente entrecruzador (TPP), lo que favorece la formación de interacciones iónicas responsables de la estructura del gel. A continuación, las partículas que no reaccionaron como el polisacárido libre o el aceite esencial no emulsionado son eliminadas por centrifugación. Finalmente, las nanopartículas encapsuladas pueden ser sometidas a liofilización o secado térmico para su conservación (Ahmadi et al., 2018; Ayllón-Gutiérrez et al., 2024; Hsieh et al., 2006). En este sentido, (P Ferreira et al., 2019) demostraron que la encapsulación del aceite esencial de *Siparuna guianensis* en nanopartículas de quitosano potenció la actividad larvicida en comparación con el aceite sin formular, además de prolongar el efecto, con una actividad larvicida mayor 50 % durante un periodo de hasta 19 días.

### **1.10.3 Hidrogeles**

El uso de hidrogeles se presenta como una alternativa novedosa para la liberación controlada de insecticidas de contacto. Estos sistemas permiten retener y suministrar concentraciones específicas del compuesto activo que a su vez puede combinarse con atrayentes para dirigir el insecto hasta el hidrogel donde entra en contacto con él y queda adherido a su superficie, potenciando el efecto biocida. Asimismo, el simple contacto del insecto con la superficie tratada posibilita que las partículas del insecticida se adhieran a su cuerpo, aumentando la eficacia del compuesto (Han et al., 2024; Tay et al., 2020).

Gracias a su capacidad de red tridimensional, los hidrogeles pueden absorber y retener grandes cantidades de agua sin disolverse, lo que les permite mantener disponible el líquido atrayente durante largos periodos de tiempo. Pueden elaborarse a partir de copolímeros sintéticos como acrilatos y poliacrilamida o naturales como alginatos, carboximetilcelulosa y quitosano, los cuales también pueden combinarse para obtener matrices con distintas propiedades. El grado de hidratación y la capacidad de liberación dependen de características fisicoquímicas como pH, temperatura y presión, lo que posibilita diseñar hidrogeles con respuestas específicas en el medio ambiente (Ahmed, 2015; Wu et al., 2022). En cuanto a su clasificación, los hidrogeles se dividen según la naturaleza de su reticulación: (i) iónicos, formados por gelificación iónica; (ii) covalentes, en los que las cadenas poliméricas se enlazan mediante reacciones químicas, generalmente inducidas por calor o agentes reticulantes; y (iii) físicos, estabilizados por interacciones débiles como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals (Ahmed, 2015).

Si bien diversos estudios avalan el uso de nano que ofrecen una variedad de ventajas y en el caso de los aceites esenciales o metabolitos secundarios la estructura de la matriz de encapsulación y las interacciones que esta pueda formar con el compuesto activo son responsables de la estabilidad del formulado y la tasa de liberación del compuesto volátil. Estos factores, a su vez, dependen del tamaño de partícula, morfología y la técnica de encapsulación utilizada (Lucia & Guzmán, 2021).

#### ***1.10.4 Formulaciones sólidas***

Existen diversas formulaciones sólidas que buscan encapsular el compuesto activo para mejorar su estabilidad, su dispersión en ambientes líquidos y su efecto prolongado. Las formulaciones sólidas más reportadas incluyen el uso de complejos de ciclodextrinas, secado por pulverización y granulados. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos de seis a ocho unidades de  $\alpha$ - D-glucopiranosas. La implementación de estas moléculas para la

encapsulación sólida de moléculas hidrofóbicas es altamente beneficiosa ya que su parte externa tiene un carácter hidrofílico y su parte interna un carácter hidrofóbico, permitiendo su solubilización (Galvão et al., 2019; Venturini C De et al., 2008). Asimismo, (Galvão et al., 2019) demostraron que un complejo del aceite esencial *Lippia origanoides* y  $\beta$ -ciclodextrina mejoró la actividad larvicida (39 a 33 ppm) y redujo la toxicidad hacia organismos no objetivo (30.5 to 150.1 ppm) en *Ae. aegypti*.

Por otro lado, el secado por pulverización es un método popular para la implementación de formulaciones sólidas de aceites esenciales, consiste en la atomización de un líquido, una fase de secado por parte de un gas caliente y finalmente la encapsulación con ayuda de un emulsionante. Los materiales más utilizados en este método son la goma arábiga, la maltodextrina y polímeros de almidón modificados (El Asbahani et al., 2015). También, se ha estudiado su uso en combinaciones con partículas poliméricas como el quitosano y metil celulosa.

De la misma forma, los granulados son partículas sólidas de fácil acceso como arena, carbón activado y zeolita que han sido ampliamente utilizado para la dispersión de aceites esenciales con actividad insecticida en agua. Los granulados permiten la liberación prolongada del compuesto activo y mejoran su disponibilidad por largos periodos de tiempo, en comparación con la molécula natural pura. Este método involucra el recubrimiento de las partículas sólidas con una mezcla de un polímero, usualmente, Eudragit RL 100 y un aceite esencial. Se emplean disolventes orgánicos para ayudar al recubrimiento y cuando estos se evaporan obteniendo un granulado seco recubierto con el aceite esencial. Este método es eficaz debido a su facilidad, liberación controlada y mayor persistencia del compuesto larvicida en el medio. (Champakaew et al., 2007) demostraron que el uso de gránulos de arena impregnados con aceite de zeodario

proporciona una actividad larvicida prolongada, alcanzando un 100 % de mortalidad durante 9 días, en contraste con el aceite puro, que solo mantuvo dicho efecto por 3 días.

### ***1.10.5 Formulaciones semisólidas***

Actualmente, se ha explorado el uso de agentes gelificantes de origen natural, como carragenina, goma xantana y carbopol, en la formulación de ambientadores en gel con una matriz semisólida. Este sistema permite la liberación lenta de las moléculas volátiles, como los aceites esenciales y metabolitos secundarios de plantas, contribuyendo a su encapsulación y así, a su estabilidad. Además, constituyen una alternativa considerada ecoamigable, dado que los gelificantes son biodegradables y no requieren del uso de solventes orgánicos para su miscibilización con otros compuestos. Las formulaciones en gel semisólidas, en las que la fragancia desempeña un papel central, han encontrado amplia aplicación en espacios interiores y exteriores. En su forma más básica, la matriz de un gel de este tipo puede obtenerse mediante la combinación de un agente gelificante, un tensoactivo y una fragancia, lo que facilita su preparación, envasado y almacenamiento (Phuong et al., 2022; Semoff et al., 2001).

En este sentido, (Eden et al., 2020) evaluaron el uso de una matriz en gel a base de carragenina para la liberación lenta de los metabolitos secundarios citronelal, citronelol y geraniol con actividad repelente contra *Aedes aegypti*. Los resultados evidenciaron que estos compuestos presentan actividad repelente significativa con porcentajes superiores al 70% durante la primera hora de exposición. Así, el desarrollo de formulaciones en gel se propone como una estrategia efectiva para controlar la liberación de los compuestos volátiles y alcanzando vidas útiles de hasta 10 semanas bajo condiciones de almacenamiento controladas, de acuerdo con predicciones estadísticas derivadas del análisis de concentración del compuesto por medio de GC-MS.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Formular un bioproducto con actividad adulticida contra *Aedes aegypti* a partir de metabolitos secundarios de plantas medicinales cultivadas en el departamento de Santander.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la actividad adulticida contra *Aedes aegypti* por medio de los metabolitos secundarios seleccionados.
2. Desarrollar un prototipo de formulado con el metabolito secundario de mejores resultados en la fase *in vivo*.
3. Evaluar las propiedades fisicoquímicas de los formulados generados.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Obtención de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios empleados en este estudio 1.8-cineol y Eugenol, fueron adquiridos comercialmente con una pureza analítica certificada de 99 y 98%, respectivamente.

#### 3.2 Crianza, manutención y reproducción de la colonia de *Aedes aegypti*

En este proyecto se emplearon zancudos de la especie *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, mantenidos bajo condiciones controladas y libres de virus u otros patógenos, en el insectario del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) situado en el Laboratorio de Entomología Médica, Parque Tecnológico de Guatiguará, UIS. Estos fueron mantenidos bajo condiciones de humedad del ( $70 \pm 5\%$ ), fotoperiodo (12:12) y temperatura ( $27 \pm 5^\circ\text{C}$ ), propias de un ambiente entomológico controlado.

Una vez que los individuos alcanzaron la etapa adulta, fueron alojados en jaulas de ( $40 \times 40 \times 40$  cm) para permitir su libre vuelo y apareamiento, garantizando condiciones apropiadas de luminosidad, aireación, aseo e higiene, de acuerdo con lo definido en el artículo 5 de la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia. A todos los ejemplares adultos de *Ae. aegypti* se les suministró de forma continua una solución azucarada compuesta con agua de clorada y miel al 10% (v/v), como fuente energética.

Adicionalmente, se proporcionó alimentación sanguínea ocasional a las hembras de esta especie con el fin de inducir la vitelogénesis, para el desarrollo y deposición de huevos. Para este propósito, se utilizaron dos ejemplares de rata albina tipo Wistar (WI IOPS AF/Han strain), suministrados por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander. La alimentación sanguínea se realizó de manera alternada, garantizando así su adecuado manejo y bienestar, siguiendo las disposiciones de la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

### 3.3 Consideraciones éticas

Este proyecto cuenta con aval ético por parte del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) en reunión celebrada bajo la modalidad presencial el día 20 de junio de 2025, según consta en el Acta N° 12 y se conceptúa AVAL con relación a los aspectos éticos del presente proyecto de investigación, en concordancia con la normatividad vigente (Ley 23 de 1981, Ley 1581 de 2012, Ley 1751 de 2015 y Resolución 1995 de 1999).

### 3.4 Evaluación de la actividad adulticida y determinación de dosis letales

La actividad adulticida de los metabolitos mayoritarios (eugenol y 1,8-cineol) se estimó mediante el protocolo CDC (Brogdon, 2014; Castillo et al., 2017)) tomando como referencia el valor de las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ ) previamente determinadas para el aceite esencial *Ocimum campechianum*, cuya actividad adulticida fue evaluada en un estudio previo por el grupo de investigación. La evaluación se realizó mediante la prueba de botella, considerado el más efectivo, ya que la aplicación del metabolito secundario sobre vidrio elimina errores sistemáticos, como la absorción parcial del producto en superficies porosas como el papel. Además, el bioensayo en botella ofrece mayor practicidad y permite el uso de aditivos o surfactantes que pueden prevenir la cristalización de los compuestos insecticidas y lograr un recubrimiento uniforme en cada una de las botellas (Corbel et al., 2023).

En este sentido, se realizó el cálculo de las concentraciones letales relativas ( $CL_{50r}$  y  $CL_{95r}$ ) para estos metabolitos empleando la ecuación 1 con el propósito de establecer el rango a partir del cual identificar la dosis diagnóstica.

$$CL_{95} \text{ relativa} = \frac{CL_{95}^{AE} \cdot \% \text{ metabolito secundario}}{100} \quad (1)$$

*Nota. Fórmula tomada de (Vanegas-Estévez et al., 2024)*

Con este propósito, se prepararon soluciones madre para cada uno de los metabolitos empleando acetona como disolvente. El cálculo de la concentración letal relativa permitió establecer la dosis diagnóstica, definida como la concentración de un insecticida capaz de provocar el 100% de mortalidad en poblaciones susceptibles dentro de un periodo de exposición determinado (CDC, 2023). A partir de estos valores, la dosis diagnóstica del formulado se determinó mediante evaluaciones en un rango de concentraciones establecido con base en los resultados de toxicidad obtenidos previamente para los metabolitos puros.

Para cada bioensayo se seleccionaron diez zancudos adultos de 2 a 5 días post-eclosión y se colocaron en botellas Wheaton de 250 mL. Las botellas fueron previamente impregnadas con 1 mL de cada metabolito secundario diluido en acetona hasta la concentración final deseada y se dejaron secar en la oscuridad por 14 horas. Para el control, se utilizó acetona de grado técnico (GT). La mortalidad se evaluó a intervalos de tiempo específicos de 15 minutos hasta completar los 90 minutos así como una lectura final a las 24 horas. Cada bioensayo incluyó 4 réplicas por concentración, un control negativo y dos controles positivos, Deltametrina y malathion, de acuerdo a la dosis diagnóstica enunciada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2023), estas fueron de 10 µg/botella y 50 µg/botella respectivamente. Adicionalmente, se realizaron tres ensayos en días independientes para confirmar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. De acuerdo con este protocolo, la mortalidad en el control negativo debe ser de cero. En algunos casos puede alcanzar 3% y ser ignorada, pero si está entre 3% y 20% deberá aplicarse la fórmula de Abbot (2) para corregir los hallazgos encontrados en las botellas con el tratamiento. Si llegase a sobrepasar el 20% el ensayo deberá ser anulado (CDC, 2023).

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{\text{Mortalidad en las botellas de prueba [\%]} - \text{mortalidad en control [\%]} \cdot 100}{(100\% - \text{mortalidad en el control [\%]})} \quad (1)$$

*Nota. Fórmula tomada de (CDC, 2023)*

### 3.5 Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa

El efecto del metabolito secundario en la acetilcolinesterasa fue evaluado de acuerdo al método colorimétrico reportado por George Ellman en 1961 (Ellman et al., 1961). Este método se basa en la velocidad de formación de la tiocolina por la hidrólisis de la acetilcolina. Donde la tiocolina reacciona con el reactivo de Ellman DTNB (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico) generando el anión ácido tionitrobenzoico de coloración amarilla, este cromóforo formado es medido utilizando un espectrofotómetro a la longitud de onda de 405 nm. La dosis diagnóstica obtenida a partir de las pruebas en botella del metabolito (500 ppm) se probó en el homogenato de 45 hembras adultas de la especie *Ae. aegypti* con más de 48 horas de edad y sin alimentación sanguínea previa. El medio de homogenización consistió en sacarosa [250 mM], HEPES [10 mM] y EGTA [1 mM]. Este se incubó por diez minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de sustrato (DTNB 0.2 mM, yoduro de acetilcolina 0.24 mM y  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$  54.4 mM). El medio de reacción estaba compuesto de una solución buffer PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [8 mM],  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$  [2.3 mM], NaCl [0.15 M], pH=7.5). Esta reacción fue monitoreada por una hora. Se empleó el insecticida propoxur como control positivo a una concentración de 100 $\mu$ M.

### 3.6 Formulación del gel insecticida

Se formuló un gel insecticida empleando como principio activo el metabolito secundario con actividad adulticida mayor al 75% en un tiempo menor a 2 horas, en la fase *in vivo*. La matriz del gel se elaboró tomando como base la formulación tipo III reportada por (Phuong et al., 2022),

adaptada para incorporar un compuesto volátil en una fase semisólida con liberación prolongada a una concentración máxima de 1%.

Como agente gelificante se empleó agar-agar, sustituyendo la carragenina original de la fórmula por su mayor disponibilidad y bajo costo. La goma xantana se mantuvo como espesante, mientras que el Tween 80 y el Span 80 se usaron como tensoactivos para ajustar el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y estabilizar la emulsión. Además, se añadió aceite mineral como fase oleosa y glicerina como humectante. Los componentes y proporciones empleados se detallan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.**

*Componentes de la formulación en gel con 1% de metabolito secundario.*

<b>Ingrediente</b>	<b>% fórmula (Phuong et al., 2022)</b>	<b>Función en la formulación</b>	<b>Modificación en este estudio</b>	<b>% en formula (este estudio)</b>
Agua destilada	84	Fase acuosa	Se mantuvo	83.5
Carragenina	2.5	Gelificante	Agar-agar	1.5
Goma Xantana	1.0	Espesante	Se mantuvo	0.5
Benzoato de sodio	1.0	Conservante	Eliminado	-
Etilenglicol	6.0	Humectante	Sustituido por glicerina	8
Polysorbate 20	0.5	Tensoactivo	Sustituido por Tween 80 y Span 80	2 / 0.5
NaCl	1.0	Control osmótico	Eliminado	-
Aceite mineral industrial	-	Solubilización del metabolito	Incorporado	3
Fragancia	4.0	Compuesto activo volátil	Reducción de cantidad	1.0

Nota. La tabla muestra el porcentaje en peso y las cantidades en gramos de los ingredientes empleados en la matriz del gel.

Se utilizó agar-agar como agente gelificante por su capacidad para formar redes tridimensionales entre cadenas de agarosa (Barrangou et al., 2006). La goma xantana, un polisacárido aniónico obtenido de *Xanthomonas campestris*, se empleó como espesante por su alta viscosidad a bajas concentraciones y su comportamiento pseudoplástico (Sworn, 2010). Como tensoactivos, se usaron Span 80 (HLB 4.3, lipofílico) y Tween 20 (HLB 16, hidrofílico), cuya combinación permite ajustar el HLB de la formulación y obtener una emulsión estable entre las fases (Ong et al., 2015). El aceite mineral se incluyó como vehículo oleoso para dispersar el metabolito en la matriz del gel y reducir su volatilidad. La glicerina se agregó para retener humedad, prevenir la desecación del gel y prolongar la estabilidad del formulado.

### **3.7 Preparación del formulado en gel**

Para la preparación de la fase acuosa, se disolvió la cantidad pesada de agar-agar en agua destilada mediante calentamiento a 75 °C con agitación constante hasta obtener una disolución homogénea. Posteriormente, se incorporó la goma xantana, se mantuvo la agitación y se retiró el calentamiento hasta lograr su completa dispersión. Por otra parte, para la preparación de la fase oleosa, en un recipiente secundario se mezclaron los tensoactivos (Tween 20 y Span 80), el aceite mineral y el metabolito secundario. Cuando la fase acuosa alcanzó una temperatura en el rango de 40 - 45 °C, se adicionó la fase oleosa bajo agitación hasta obtener una emulsión estable. Finalmente, se incorporó la glicerina y se envasó el gel formulado.

### **3.8 Evaluación de la actividad adulticida del formulado**

Para evaluar la actividad adulticida del formulado en gel, se utilizó una modificación del método en botella propuesto por la CDC (Brogdon, 2014), descrito previamente. El gel se dispuso en la tapa de frascos Wheaton de 250 mL, con el propósito de permitir la exposición de los mosquitos a los compuestos volátiles liberados. Se emplearon adultos de *Ae. aegypti* de 2 a 5 días de edad, con 10 individuos por botella. La lectura se realizó cada 15 minutos hasta alcanzar

los 90 minutos. Cada bioensayo constó de cuatro réplicas y se realizó por triplicado en días diferentes.

Con el fin de evaluar la eficacia del formulado en pruebas de larga duración, además del bioensayo con el gel recién preparado, se llevaron a cabo evaluaciones adicionales semanalmente hasta completar cuatro semanas posteriores a su preparación. Para ello, las tapas que contenían el gel se mantuvieron selladas en las botellas al finalizar cada prueba y, en la semana correspondiente, se reutilizaron en botellas limpias con zancudos, a fin de registrar la mortalidad.

### 3.9 Caracterización fisicoquímica del formulado

Las propiedades fisicoquímicas del formulado en gel fueron determinadas por la gravedad específica y el pH de la muestra. La gravedad específica del gel fue evaluada por la razón entre la densidad del gel y la densidad del agua. La densidad del gel se calculó mediante el método de desplazamiento de volumen al adicionar el gel a una probeta con agua. Esto se realizó para cada una de las réplicas y se presenta como un promedio. Adicionalmente, se registró el pH de la formulación obtenida. Finalmente, se evaluó el porcentaje de sinéresis que corresponde a la evaporación de líquido en formulado y relaciona su peso, como sigue:

$$\% \text{ sinéresis} = \frac{M_{n-1} - M_n}{M_0} \quad (3)$$

*Nota.*  $M_{n-1}$  : El peso del gel la semana anterior ;  $M_n$ : El peso del gel al momento del pesaje,  $M_0$ : peso inicial del gel. *Tomado de (Phuong et al., 2022)*

### 3.10 Análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La caracterización morfológica del formulado en gel se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio FEG (Field Emission Gun) QUANTA FEG 650. Las imágenes se obtuvieron bajo condiciones de alto vacío y con un voltaje de aceleración de 15 kV.

Para la adquisición de micrografías se emplearon los siguientes detectores: Everhart-Thornley Detector (ETD) para electrones secundarios (SE) y Back Scattered Electron Detector (BSED) tipo SSD para electrones retrodispersados (BSE). Esta técnica permitió observar la morfología superficial del gel, identificando características estructurales como la formación de poros y la textura de la matriz.

### 3.11 Análisis estadístico

Los datos de mortalidad obtenidos para las distintas concentraciones según el tratamiento se presentaron como porcentaje de mortalidad  $\pm$  Desviación estándar (DS) para tres bioensayos independientes con cuatro réplicas cada uno. Además, por medio del software Statistica 10.0 se realizaron análisis de dispersión de los datos relacionando el porcentaje de mortalidad en cada réplica y la media del conjunto de datos. Esto posibilitó la identificación de valores atípicos o extremos con una precisión del 95% (Laguna et al., 2006). Para cada grupo de datos se evaluó su normalidad por medio de la prueba Shapiro-Wilk ( $p < 0.01$ ). Adicionalmente, se aplicaron pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples para evidenciar diferencias estadísticas entre los porcentajes de mortalidad obtenidos con el metabolito Eugenol y las moléculas de control empleadas. Los resultados que presentaron un valor de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Adicionalmente, se empleó el test de prueba pareada de Wilcoxon para determinar diferencias significativas entre el porcentaje de mortalidad obtenido para el formulado recién preparado y su evaluación durante las cuatro semanas posteriores. Por otro lado, el porcentaje de sinéresis del gel mostró distribución normal, Shapiro Wilk ( $p > 0.01$ ), por lo que se aplicó el test de Tukey HSD. También, se empleó el software Polo Plus para calcular las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ ) para cada uno de los tratamientos mediante el ajuste con el modelo probit (Finney, 1971).

#### 4. Resultados y discusión

En el laboratorio de entomología médica del CINTROP se ha identificado la actividad adulticida de diversos aceites esenciales extraídos de plantas medicinales sobre *Aedes aegypti*. A la concentración de 1000 ppm, los aceites esenciales de *Cananga odorata*, *Cymbopogon flexuosus*, *Lippia alba* y *Lippia origanoides*, alcanzó un porcentaje de mortalidad de  $92.5 \pm 0.95$ ,  $93.8 \pm 0.92$ ,  $80 \pm 3$  y  $100$  a los 60 minutos de exposición, respectivamente (Castillo et al., 2017).

De la misma forma, el aceite esencial de *Ocimum campechianum* previamente evaluado en el mismo laboratorio, demostró eficacia significativa al alcanzar el  $95.8 \pm 3$  % de mortalidad a los 15 minutos y el 100 % a los 30 minutos de exposición. Estos resultados corresponden a ensayos realizados en el marco del Programa Bio-Reto XXI y aún no han sido publicados. La composición química de este aceite está constituida principalmente por eugenol (35.3 %), 1,8-cineol (15.6 %),  $\beta$ -selineno (11.0 %), trans- $\beta$ -cariofileno (7.4 %), germacreno D (5.6 %),  $\alpha$ -selineno (4.8 %),  $\beta$ -pineno (2.4 %),  $\beta$ -elemeno (1.9 %) y  $\alpha$ -humuleno (1.5 %). La caracterización química del AE por parte del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales (CENIVAM), permitió seleccionar los metabolitos secundarios mayoritarios ( $\geq 10$  %), eugenol y 1,8-cineol para su evaluación individual.

##### 4.1 Resultados relacionados con el objetivo 1: Actividad adulticida de metabolitos secundarios

Con el fin de dar cumplimiento al objetivo específico uno se evaluó la actividad insecticida de los metabolitos secundarios eugenol y 1,8-cineol, de acuerdo con el valor de las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ ) del aceite esencial *Ocimum campechianum*. El cálculo de las concentraciones letales relativas ( $Cl_{50r}$  y  $Cl_{95r}$ ) se realizó empleando la ecuación 1 con el

propósito de establecer el rango a partir del cual identificar la dosis diagnóstica. Los resultados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.**

*Concentraciones letales relativas para cada metabolito a las 24h de exposición*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>CL<sub>50</sub> relativa (ppm)</b>	<b>CL<sub>95</sub> relativa (ppm)</b>
Eugenol (35.3%)	207	<b>309</b>
1,8-cineol (15.6%)	91	<b>137</b>

Nota. La tabla muestra las concentraciones letales estimadas mediante la ecuación 1 para los metabolitos mayoritarios de un aceite esencial con actividad insecticida comprobada anteriormente.

La evaluación de la actividad se realizó a la concentración letal relativa (CL<sub>95r</sub>) y una concentración superior. El eugenol se evaluó a 309 ppm (CL<sub>95r</sub>) y 500 ppm, mientras que el 1,8-cineol se probó a 137 ppm (CL<sub>95r</sub>) y 300 ppm. Respecto a la actividad adulticida de estas moléculas, únicamente Eugenol a la concentración de 500 ppm, alcanzó una mortalidad del 100% en adultos de la especie *Ae. aegypti* tras 15 minutos de exposición. No se evidenció mortalidad a 309 ppm de eugenol ni en ninguna de las concentraciones evaluadas de 1,8-cineol durante las lecturas realizadas. El metabolito 1,8-cineol fue descartado para su evaluación mediante concentraciones múltiples dado a que no presentó actividad adulticida a las concentraciones exploratorias. Los resultados se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.**

*Actividad adulticida de metabolitos secundarios bajo concentraciones diagnósticas.*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>%Mortalidad ± DS</b>	<b>Control negativo (%Mortalidad ± DS)</b>
------------------------------	----------------------------	-------------------------	--

Eugenol	309	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>
	500	<b>100 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>
1,8-cineol	137	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>
	300	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>

*Nota.* La tabla muestra el porcentaje de mortalidad promedio obtenido sobre *Ae. aegypti* tras 15 min de exposición.

Una vez se determinó que la dosis diagnóstica de eugenol corresponde a 500 ppm, se procedió a evaluar el efecto insecticida a cinco (5) concentraciones múltiples.

El efecto del eugenol en adultos de la especie *Ae. aegypti*, a concentraciones menores a la dosis diagnóstica, indujo un efecto de knock down (KD) o parálisis transitoria, ya que se observó recuperación de los individuos a las 24 horas. Los resultados se muestran en la **tabla 7**.

#### **Tabla 7.**

*Porcentaje de recuperación a los tiempos de 90 min y 1440 min.*

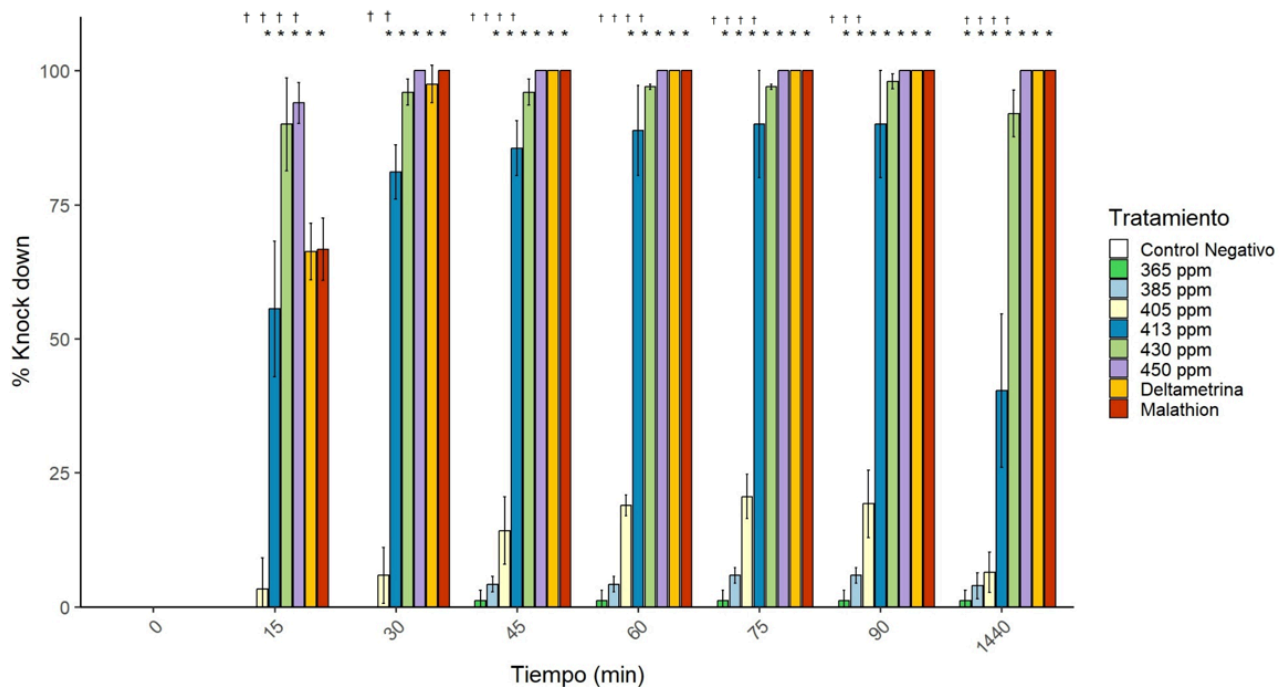
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Knockdown (% ± DS, 90 min)</b>	<b>Mortalidad (% ± DS, 1440 min)</b>	<b>Recuperación (% , 1440 min)</b>
385	5 ± 2.5 <sup>a</sup>	4 ± 2.4 <sup>a</sup>	<b>20%</b>
405	19 ± 6.3 <sup>a</sup>	7±4 <sup>b</sup>	<b>61%</b>
413	90 ± 10 <sup>a</sup>	40 ± 14 <sup>b</sup>	<b>56%</b>
430	98 ± 1 <sup>a</sup>	93 ± 4 <sup>a</sup>	<b>5%</b>

*Nota.* La tabla presenta el porcentaje de mortalidad promedio registrado en *Ae. aegypti* bajo exposición a eugenol, con el fin de identificar un posible efecto knock down. La reducción (%) se calculó por medio de la razón entre la diferencia de los porcentajes de mortalidad y el valor inicial multiplicado por 100. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ( $p < 0.01$ ) y prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras pareadas. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre columnas.

Este efecto varió en función de la concentración y el tiempo de exposición (**Figura 4**). Así, tras 15 minutos de exposición, las concentraciones de 430 y 450 ppm alcanzaron porcentajes de KD superiores al 50%, con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) frente al control negativo. A los 30 minutos, cuando el KD con la exposición a los controles positivos alcanza el 100%, no se encontraron diferencias significativas entre 430 y 450 ppm y los controles positivos. Finalmente, a las 24 horas de exposición, se observó que un porcentaje de los zancudos se recuperaron al estar expuestos a las concentraciones de 385, 405, 413 y 430 pm. La exposición de los individuos a 450 ppm resultó en un 100% de KD en un tiempo de 30 min y no se evidenció recuperación a las 24 horas.

**Figura 4.**

*Evaluación de la mortalidad de Aedes aegypti frente a concentraciones múltiples de eugenol.*



*Nota.* El gráfico presenta el porcentaje de knock down (KD) obtenido a diferentes concentraciones del metabolito secundario Eugenol y los controles. Los datos se presentan como

%mortalidad promedio  $\pm$  DS. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-wilk ( $p < 0.01$ ) y en consecuencia la prueba Kluskal Wallis para datos no paramétricos, solo ( $p < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo. Un asterisco (\*) indica diferencias entre las concentraciones evaluadas y el control negativo. La cruz (+) indica diferencias significativas y los controles positivos.

Los resultados sugieren que Eugenol ejerce un efecto knock down sobre adultos de la especie *Aedes aegypti* y que este es mayor en las concentraciones intermedias (405 y 413 ppm). Pues, a los 90 min los tratamientos con 405 y 413 ppm alcanzaron porcentajes de KD promedio de  $19 \pm 6.3$  y  $90 \pm 10$  respectivamente, sin embargo, tras alcanzar las 24 horas estos porcentajes se redujeron de manera considerable a (7 y 38 %), lo que indica que cierto número de individuos recuperó su movilidad tras la exposición inicial. Esta reducción de 61 y 56% es característica de un efecto knock down donde los zancudos sufren parálisis temporal pero esto no necesariamente conduce a la muerte. A concentraciones bajas (385 ppm), la recuperación fue mínima (4%) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos, lo que sugiere que esta concentración fue insuficiente para generar un efecto KD considerable. Por otra parte, a concentraciones elevadas (430 ppm), cercanas a la dosis diagnóstica, se observó un porcentaje de recuperación del 5% que se enmascara por mortalidad real, pues no se encontraron diferencias significativas con el porcentaje de mortalidad obtenido a los 1440 min. El efecto knock down en *Ae. aegypti* luego de su exposición a metabolitos secundarios se asocia con la acción de proteínas detoxificantes pues estas permiten mitigar el efecto tóxico al metabolizar estos compuestos y facilitar su recuperación. Entre las principales proteínas involucradas se encuentran citocromo P450, glutatión S-transferasas (GST) y carboxilesterasas. Estudios previos demuestran que el eugenol incrementa de forma significativa la actividad de la proteína GST en larvas de *Ae. aegypti* (Subahar et al., 2024), lo cual respalda la recuperación observada en adultos de esta

especie, atribuida a la metabolización del compuesto empleado. Así, cuando la capacidad detoxificante del organismo no es superada, el efecto se manifiesta como parálisis transitoria y no mortalidad.

Por otro lado, el estudio de (Almadiy, 2020) evaluó la actividad insecticida de eugenol en adultos de la especie *Ae. aegypti*, mediante el uso de túnel de viento, donde se midió la respuesta del insecto bajo la exposición directa a la molécula en aerosol. Este estudio reportó una mortalidad del 100% a una concentración de 100  $\mu\text{L/L}$  ( $\approx 100$  ppm v/v) con  $CL_{50}=46.1$   $\mu\text{L/L}$  a las 24 horas. En contraste, los hallazgos encontrados en el presente estudio y la  $CL_{50}$  obtenida mediante la actividad adulticida empleando el método en botellas CDC (419.936 ppm) refleja la actividad residual de eugenol, ya que los zancudos fueron expuestos a la molécula luego de un periodo de secado de 14 horas.

Adicionalmente, los resultados de este estudio constituyen el primer reporte de efecto knock down por parte de esta especie al ser expuestos a eugenol. No obstante, (Ma et al., 2014) reportaron este efecto producto del tratamiento con esta molécula en la especie *Culex pipiens pallens* (Zancudo doméstico común), mediante ensayos de fumigación a una concentración de 0.5 $\mu\text{L/L}$  aire ( $\approx 0.5$  ppm v/v), alcanzando un 100% de knock tras 5 horas de exposición aunque con una mortalidad sostenida de 76% a las 24 horas.

De manera conjunta, los estudios mencionados respaldan los hallazgos encontrados referentes al efecto knock down por parte del metabolito secundario en adultos de la familia culicidae (*Culex pipiens pallens* y *Ae. aegypti*) aunque la intensidad y la persistencia puede variar entre condiciones ambientales, especie evaluada y métodos experimentales.

Finalmente, los resultados de forma global sugieren que eugenol genera un efecto knock down en adultos *Ae. aegypti* durante los 90 minutos de exposición pues transcurridas las 24 horas un porcentaje de estos puede recuperarse. A partir del análisis de regresión probit se calculó el

tiempo medio de knock down ( $KT_{50}$ ) y las concentraciones letales a las 24 horas de exposición.

Los resultados se muestran en la **tabla 8**.

**Tabla 8.**

*Efecto knockdown y toxicidad letal de eugenol sobre adultos Ae. aegypti.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Estimación (95% IC)</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
<b>KT<sub>50</sub> (95 % IC, min)</b>	10.5	3.50 - 16.9	2.4
<b>KT<sub>95</sub> (95 % IC, min)</b>	902.3	353.4 - 8952	
<b>CL<sub>50</sub> (95 % IC, 24h)</b>	419.926	414.369 - 424.607	0.4
<b>CL<sub>95</sub> (95 % IC, 24h)</b>	465.051	456.667 - 477.933	

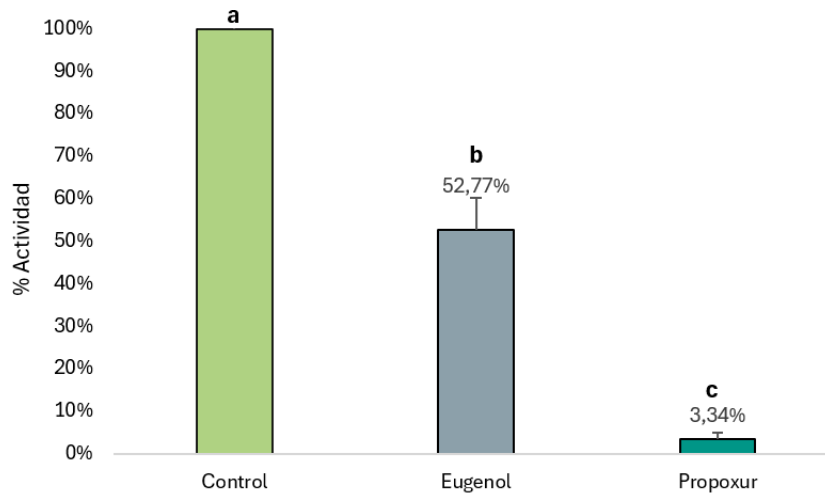
*Nota.* Concentraciones letales y tiempo medio de knockdown ( $KT_{50}$ ) luego del tratamiento con eugenol sobre adultos *Ae. aegypti*, obtenidas por medio de ensayos de mortalidad sujetos a análisis probit (Finney, 1971). El valor  $KT_{50}$  fue calculado a la concentración de 413 ppm. IC: Intervalo de confianza ; X<sup>2</sup>: Medida que compara el ajuste de los datos con el modelo probit según la evaluación de la respuesta obtenida y la esperada.

#### **4.1.2 Validación de la actividad insecticida mediante prueba *in vitro* de actividad de AchE.**

Los resultados obtenidos muestran una reducción significativa del 47.52% en la actividad de la acetilcolinesterasa por medio de la evaluación *in vitro* del extracto proteico de adultos de esta especie cuando se expone al metabolito secundario Eugenol. Los resultados se muestran en la **figura 5**.

**Figura 5.**

Actividad de la acetilcolinesterasa en homogenato de adultos *Ae. aegypti* en presencia de eugenol 500 ppm.



*Nota.* La actividad del control negativo fue tomado como 100% , este tiene un valor promedio de  $100 \pm 6,82$ . Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-wilk ( $p < 0.01$ ) y en consecuente la prueba Kluskal Wallis para datos no paramétricos, se indican diferencias significativas cuando ( $p < 0.05$ ). Un asterisco (\*) indica diferencias entre las moléculas evaluadas y el control negativo.

Diversos estudios afirman que eugenol inhibe la actividad de la proteína neuronal acetilcolinesterasa en larvas de la especie *Ae. aegypti* alcanzando valores de  $CL_{50} = 19.65$  mM ( $\approx 3227$  ppm). En el presente estudio, se observó un 47.52% de inhibición de la proteína a la concentración de 500 ppm ( $\approx 3.05$  mM) en adultos *Ae. aegypti*. Asimismo, un estudio efectuado por (Almadiy, 2020) concluyó que los adultos de esta especie resultan más susceptibles al metabolito secundario eugenol que las larvas. En consecuencia, el hallazgo de la inhibición de AchE a la concentración de 500 ppm puede considerarse un respaldo a lo previamente reportado.

#### **4.2 Resultados relacionados con el objetivo 2: Desarrollar un prototipo de formulado con el metabolito secundario de mejores resultados en la fase in vivo**

Con el fin de dar cumplimiento al objetivo específico 2, se desarrolló y evaluó la actividad adulticida del formulado en gel empleando eugenol como compuesto activo. Este se formuló en una matriz de gel semisólida con el objetivo de incorporarlo como principio activo y asegurar la liberación lenta de este compuesto, lograr su estabilidad bajo factores como la luz y la oxidación, así como la prolongación de su efecto en un periodo mayor a las 2h. Para ello se tomó como referencia el trabajo de (Phuong et al., 2022) en la formulación de geles ambientadores a base de aceites esenciales y como apoyo secundario la formulación de repelentes en gel (Eden et al., 2020). La formulación del gel insecticida se diseñó tomando como referencia la fórmula III reportada por (Phuong et al., 2022) seleccionada por su liberación prolongada del aroma y su estabilidad a 35°C con vida útil de hasta 10 semanas.

La elección de los gelificantes, tensoactivos y aditivos en la formulación se realizó considerando la disponibilidad de los insumos en el laboratorio. En este sentido, la carragenina fue reemplazada por agar-agar, un gelificante más económico y disponible en el laboratorio. El tensoactivo original (Polysorbate 20) fue reemplazado por Tween 80, Span 80 y aceite mineral, como fase oleosa para favorecer la solubilización e integración del eugenol en la matriz. Adicionalmente, se incorporó glicerina para conservar la humedad del sistema. Finalmente, se redujo el contenido de esencia en la formulación del 4% al 1% con el propósito de reducir costos de producción. Así, estas modificaciones respondieron tanto a la disponibilidad experimental como a las propiedades fisicoquímicas del metabolito secundario, tales como su solubilidad, afinidad lipofílica y capacidad tensoactiva.

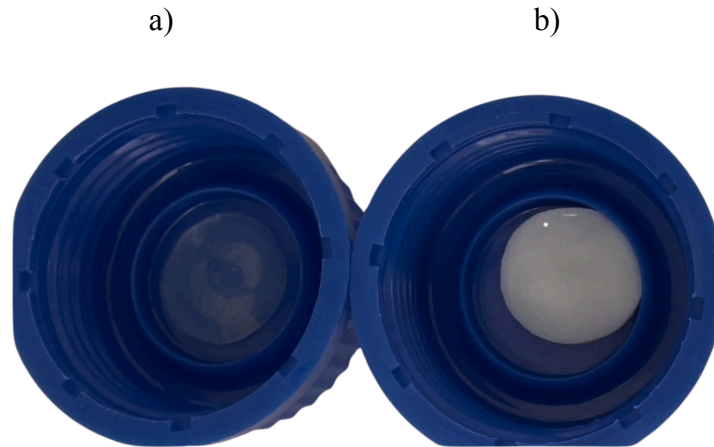
La elección de agar-agar como agente gelificante se debe a su capacidad para formar redes tridimensionales entre cadenas de agarosa (Barrangou et al., 2006). La goma xantana, un

polisacárido aniónico obtenido de *Xanthomonas campestris*, se empleó como espesante por su alta viscosidad a bajas concentraciones y su comportamiento pseudoplástico (Sworn, 2010). Como tensoactivos, se usaron Span 80 (HLB 4.3, lipofílico) y Tween 20 (HLB 16, hidrofílico), cuya combinación permite ajustar el HLB de la formulación y obtener una emulsión estable entre las fases (Ong et al., 2015). El aceite mineral se incluyó como vehículo oleoso para dispersar el metabolito en la matriz del gel y reducir su volatilidad. La glicerina se agregó para retener humedad, prevenir la desecación del gel y prolongar la estabilidad del formulado.

Adicionalmente, al observar la apariencia física de los geles recién preparados, tanto el blanco (sin eugenol) como el formulado (con eugenol) presentaron un color blanco lechoso. No obstante, luego de una semana de su preparación, la matriz del gel sin eugenol (blanco) se tornó translúcida mientras que la que contenía eugenol conservó la tonalidad blanca. El tono inicial puede atribuirse a la dispersión del aire atrapado, microburbujas, así como a la mezcla caliente y no completamente homogénea. Lo anterior, puede atribuirse a la aparición de microdominios y heterogeneidad en la matriz del gel con eugenol que resulta en mayor dispersión de la luz (apariencia blanca). Se ha reportado que en emulsiones, la disminución en el tamaño de partícula incrementa la transparencia y estabilidad de sistemas inicialmente blancos (Yang et al., 2015; H. Zhang et al., 2011). En consecuencia, la opacidad observada en el gel con eugenol podría asociarse a un tamaño de gota o una dispersión heterogénea del aceite en la matriz polimérica. Este comportamiento también puede considerarse un indicio de la emulsificación del compuesto en la red polimérica y su adecuada incorporación del eugenol en la matriz. La **figura 6** muestra la comparación visual en la apariencia física del formulado en gel y el blanco.

**Figura 6.**

*Comparación visual de la base del gel (blanco, sin eugenol) y el formulado con eugenol luego de una semana de preparado.*



*Nota.* La imagen muestra la evidencia fotográfica del formulado en gel (10b) junto con el blanco (10a).

Por otro lado, la evaluación de la actividad adulticida se llevó a cabo por medio del registro de la mortalidad a cuatro concentraciones del metabolito secundario en el gel. Estas fueron 1% (10.000 ppm), 0.61% (6.100 ppm), 0.5% (5.000 ppm) y 0.36% (3.600 ppm).

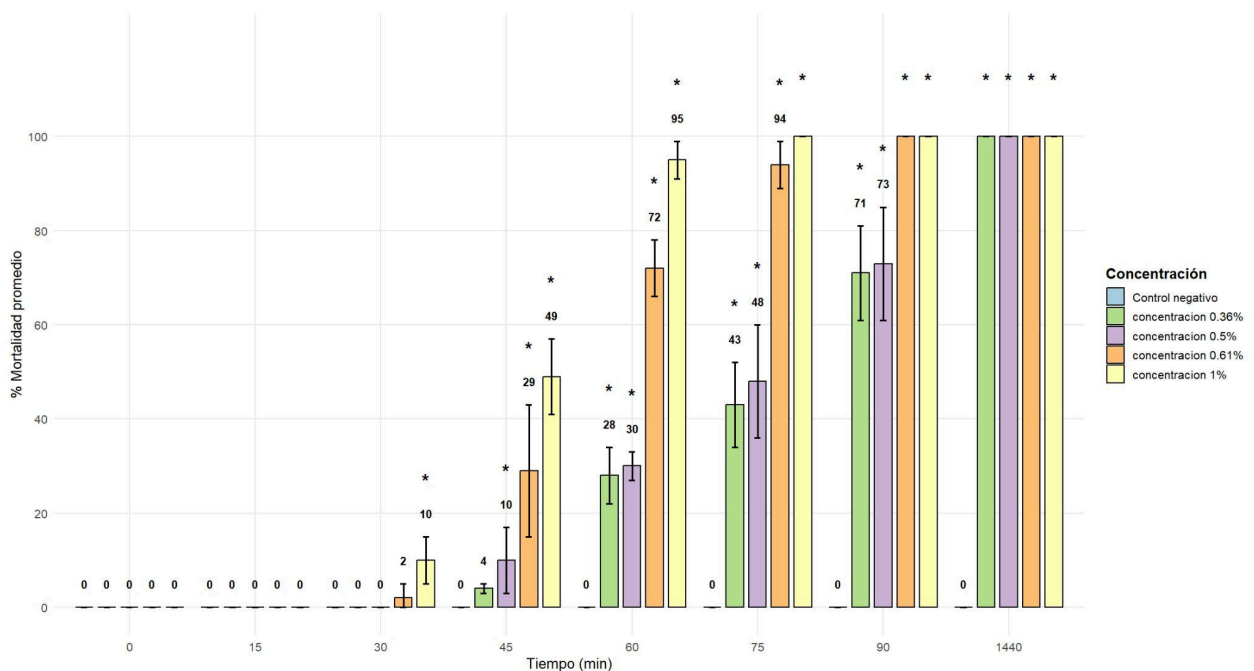
La elección del rango de concentraciones se basó en dos criterios: i) El efecto knock down del metabolito secundario y su dosis diagnóstica. ii) La necesidad de evaluar la interacción entre el metabolito y la matriz del gel. Pues, la adición del compuesto a la matriz del gel puede cambiar su disponibilidad y su velocidad de liberación.

Además, se definió como criterio operativo que una concentración en la formulación se consideraba prometedora si alcanzaba al menos un 75 % de mortalidad en máximo 90 minutos. Este criterio se estableció porque el registro de mortalidad se realizó cada 15 minutos hasta los 90 minutos con el metabolito puro. Lo anterior, permite comparar el rendimiento del formulado y el compuesto puro. Los resultados de bioactividad del formulado se muestran en la **figura 7**.

La tendencia de los datos muestra que el porcentaje de mortalidad aumenta conforme aumenta la concentración del compuesto activo en el formulado y el tiempo de exposición. No se registró mortalidad a ninguna de las concentraciones en un tiempo menor de 30 minutos. Pasados los 60 min, el tratamiento con las concentraciones de 6.100 y 10.000 ppm generan porcentajes de mortalidad por encima del 60% ( $72 \pm 6$  y  $95 \pm 4.11$ , respectivamente). Para este mismo tiempo, todas las concentraciones del compuesto activo en el formulado presentan diferencias significativas con el control negativo ( $p < 0.05$ ). Concentraciones más bajas como 5.000 y 3.600 ppm alcanzaron porcentajes de mortalidad de  $73 \pm 12$  y  $71 \pm 10$  respectivamente. Adicionalmente, se evidenció un porcentaje de mortalidad del 100% a las 24h en todas las concentraciones, no se observó recuperación en ninguno de los tiempos de lectura efectuados.

**Figura 7.**

*Evaluación de la mortalidad de Aedes aegypti frente a concentraciones múltiples del formulado en gel.*



*Nota.* El gráfico presenta el porcentaje de mortalidad obtenido a diferentes concentraciones del metabolito secundario Eugenol en el formulado en gel y el control negativo. Los datos se

presentan como mortalidad promedio (%)  $\pm$  DS. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-wilk ( $p < 0.01$ ) y en consecuencia la prueba Kluskal Wallis para datos no paramétricos, solo ( $p < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo. Un asterisco (\*) indica diferencias entre las concentraciones evaluadas y el control negativo.

Los datos obtenidos mediante los bioensayos de actividad con el formulado permitieron determinar las concentraciones letales para cada uno de los tiempos de evaluación donde la mortalidad estuvo en un rango de 5 - 95% en mínimo tres tratamientos. Los resultados se muestran en la **tabla 9**.

**Tabla 9.**

*Concentraciones letales obtenidas mediante análisis probit para el formulado en gel.*

<b>Concentración letal (45 min)</b>		
<b>CL<sub>50</sub> (90% IC)</b>	<b>CL<sub>95</sub> (90% IC)</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
10,661 (9,144 - 13,698)	44,053 (28,184 - 97,789)	<b>1.50</b>
<b>Concentración letal (60 min)</b>		
4,826 (4,606 - 5,053)	7,140 (6,661 - 7,824)	<b>0.11</b>
<b>Concentración letal (75 min)</b>		
3,648 (3,346 - 3,900)	6,501 (5,902 - 7,507)	<b>0.24</b>

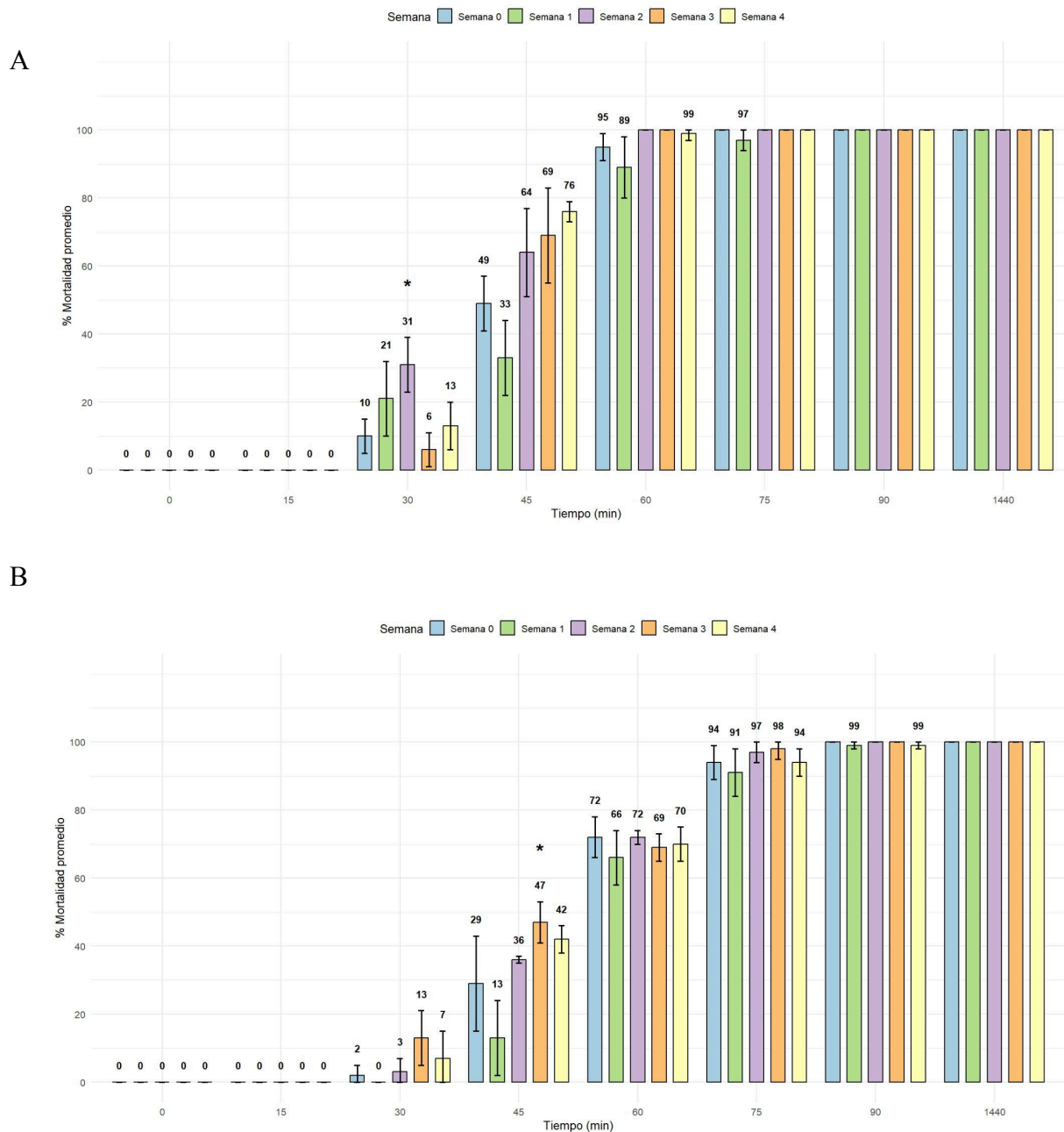
*Nota.* Concentraciones letales de eugenol obtenidas por medio de ensayos de mortalidad sujetos a análisis probit (Finney, 1971). IC: Intervalo de confianza ; X<sup>2</sup>: Medida que compara el ajuste de los datos con el modelo probit según la evaluación de la respuesta obtenida y la esperada.

Con el objetivo de evaluar la actividad insecticida del formulado en el tiempo, esta se probó luego de recién preparado y cuatro semanas siguientes a las cuatro concentraciones de preparación. Los resultados se muestran en la **figura 8**.

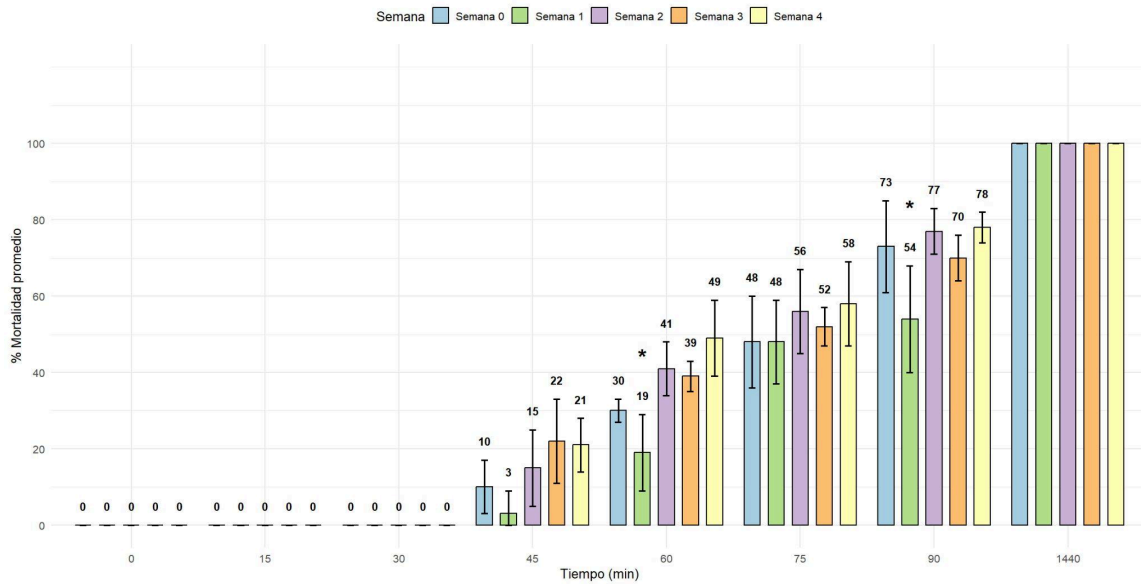
Los resultados obtenidos en la prueba de larga duración (**figura 8**) muestran que la actividad adulticida del formulado en gel incrementa conforme incrementa la concentración del compuesto activo y el tiempo de exposición. Adicionalmente, la mortalidad alcanzó el 100% luego de 24 horas para todas las concentraciones evaluadas sin importar la semana.

**Figura 8.**

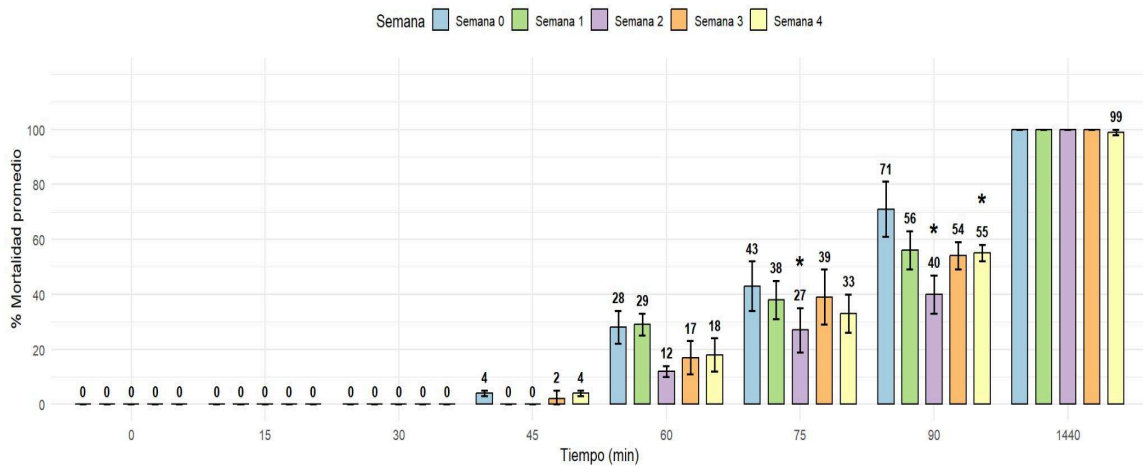
*Porcentaje de mortalidad de adultos de Aedes aegypti después de la exposición al formulado en gel recién preparado y tras su almacenamiento hasta 4 semanas después.*



C



D



**Nota. A–D:** Porcentaje de actividad adulticida del formulado a concentraciones de 1% (10.000 ppm), 0.61% (6.100 ppm), 0.5% (5.000 ppm) y 0.36% (3.600 ppm), respectivamente. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-wilk ( $p < 0.01$ ) y en consecuente la prueba Kluskal Wallis para datos no paramétricos, solo ( $p < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo. Un asterisco (\*) muestra diferencias significativas en la actividad insecticida respecto al formulado recién preparado.

Los resultados en conjunto indican que el formulado en gel posibilita la disponibilidad del metabolito secundario hasta por cuatro semanas sin comprometer la eficacia final pues no se encontraron diferencias significativas entre el formulado recién preparado y la cuarta semana para las concentraciones de 1%, 0.5% y 0.61%. En contraste, sí se detectaron diferencias significativas con la concentración más baja (0.36%), lo cual puede estar relacionado con la variabilidad natural de un ensayo biológico o con la modificación de la liberación del compuesto en la matriz. Los hallazgos sugieren que la formulación del metabolito secundario mantiene su estabilidad y su eficacia insecticida hasta por cuatro semanas aunque la velocidad de su acción inicial puede variar dependiendo de la concentración y la semana de evaluación.

La disponibilidad de Eugenol en el formulado por al menos cuatro semanas se debe a que esta molécula exhibe una presión de vapor de 0.01 mmHg a 20°C y densidad de vapor mayor 1 (>1) relativa al aire (PubChem, n.d.). Lo cual, indica que es una molécula poco volátil a temperatura ambiente y que sus vapores tienden a quedarse en zonas bajas debido a su densidad. Por lo que tiende a permanecer en la matriz donde está incorporado favoreciendo su liberación lenta y efecto residual.

Por otra parte, la implementación de eugenol en una matriz de gel semisólido haciendo uso de moléculas gelificantes como goma xantana, agar-agar generó una liberación más lenta hacia el ambiente. Esto se reflejó en porcentajes de mortalidad nulos a los 30 minutos y superiores a 60% hasta los 60 minutos, mientras que con la molécula pura este se alcanzó a los 15 minutos de exposición. No obstante, los resultados de bioactividad bajo la prueba de larga duración (4 semanas) compilados en la **figura 8** evidencian que la interacción con la matriz del gel no solo permitió una liberación controlada del metabolito si no que también mantuvo su disponibilidad y eficacia insecticida durante todo el estudio.

Las formulaciones con liberación controlada del compuesto activo en insecticidas han sido implementadas durante años con el objetivo de reducir los niveles de moléculas perjudiciales en el ambiente (Jain et al., 2024). Adicionalmente, la implementación de la molécula en el formulado en gel no solo demostró actividad insecticida promisorio en los tiempos de lectura establecidos si no que también impidió el crecimiento fúngico en el formulado, pues en el control negativo se observó el crecimiento del hongo *Aspergillus* contrario a lo ocurrido en las formulaciones que contenían el metabolito. Estudios anteriores destacan el poder antifúngico de eugenol contra este hongo donde especies de hongos como *Aspergillus niger* y *Emericella nidulans* fueron inhibidos completamente al usar esta molécula a una concentración de 100 mg/L ( $\approx 100$  ppm) (Campaniello et al., 2010).

#### 4.3 Resultados relacionados con el objetivo 3: Caracterización fisicoquímica del formulado

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas del formulado como la densidad, gravedad específica y pH, en las cuatro concentraciones de evaluación, cada una preparada por triplicado. El valor promedio se muestra en la **tabla 10**.

**Tabla 10.**

*Propiedades fisicoquímicas del formulado*

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>
Densidad (g / mL)	<b>1.13 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>12</b>
Gravedad específica	<b>1.14 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>12</b>
pH	<b>6</b>	<b>12</b>

Nota. Los valores corresponden al promedio de la densidad, gravedad específica y pH del formulado calculados a partir de 12 preparaciones.

Los resultados en conjunto muestran que sin importar la concentración, el formulado mantiene propiedades físicas uniformes. Lo anterior, es esencial en productos cosméticos. Las

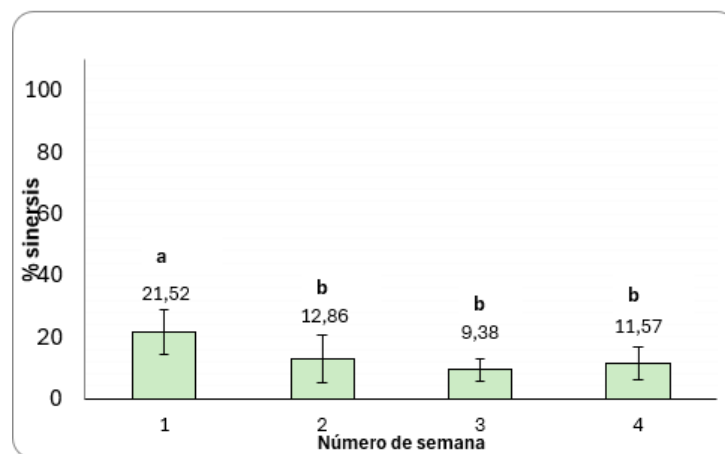
mediciones demuestran homogeneidad sin importar la concentración del compuesto activo (Acosta et al., 2015).

El poder gelificante del agar-agar se basa en las interacciones tipo puentes de hidrógeno entre sus cadenas lineales de galactano (Armisen & Gaiatas, 2009). El acoplamiento de la matriz del gel y las propiedades fisicoquímicas que este exhorta, está influenciado fundamentalmente por su capacidad de retención de agua, pues pueden mantener hasta un 99% w/w manteniendo propiedades similares a las de un sólido. Asimismo, juega un rol importante la naturaleza del polímero o diversos solutos que contiene (Hilal et al., 2023; Khalesi et al., 2020). Es plausible que la densidad del gel semisólido sea muy cercana a la del agua ( $\approx 1$  g/mL) ya que esta constituye la fase continua dominante.

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de sinéresis para medir indirectamente la evaporación del formulado después de su almacenamiento a lo largo de cuatro semanas. Los resultados se muestran en la **figura 10**.

### Figura 9.

*Evolución del porcentaje de sinéresis en el formulado a lo largo de cuatro semanas de almacenamiento.*



*Nota.* El porcentaje de sinéresis se calculó de acuerdo con lo descrito en la metodología (Sección 3.9). Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-wilk ( $p > 0.01$ ) y en consecuencia el test de Tukey

HDS, solo ( $p < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo. Letras diferentes representan diferencias significativas.

La incorporación del eugenol en la matriz semisólida de un gel contribuye a protegerlo de la degradación ambiental y regular su liberación conforme pasa el tiempo. La sinéresis se define como “Contracción espontánea de un gel, acompañada de la expulsión de líquido por los poros” (Morales-Burgos et al., 2017) y se considera un parámetro indirecto de estabilidad. Los resultados presentados en la **figura 9** muestran que el formulado presenta una mayor pérdida de agua en la primera semana (21.52%), luego de su preparación, mientras que en las semanas siguientes, este valor se reduce progresivamente, hasta registrar un ligero incremento en la cuarta semana. La sinéresis depende en gran medida de las condiciones ambientales durante la preparación y su almacenamiento. Diversos estudios atribuyen la pérdida de líquido entre las fuerzas internas del gel y el medio circundante. Los resultados de este estudio concuerdan con los encontrados por (Phuong et al., 2022) mana y luego decreciente conforme transcurren las semanas, lo cual sugiere, que el sistema alcanza una fase de estabilización.

#### 4.3.1 Caracterización morfológica

El formulado y la matriz del gel se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con el fin de estudiar su morfología luego de un mes de preparadas. Las micrografías obtenidas para la matriz del gel sin el metabolito secundario (blanco) y para el formulado con eugenol evidencian diferencias visuales significativas en su estructura (Figura 10).

Las figuras 10a y 10b, correspondientes al gel sin eugenol, muestran una morfología homogénea, con una superficie lisa y presencia de poros o cavidades bien definidas, cuyos tamaños oscilan entre 20 y 45  $\mu\text{m}$ . Estas cavidades sugieren una red polimérica uniforme y

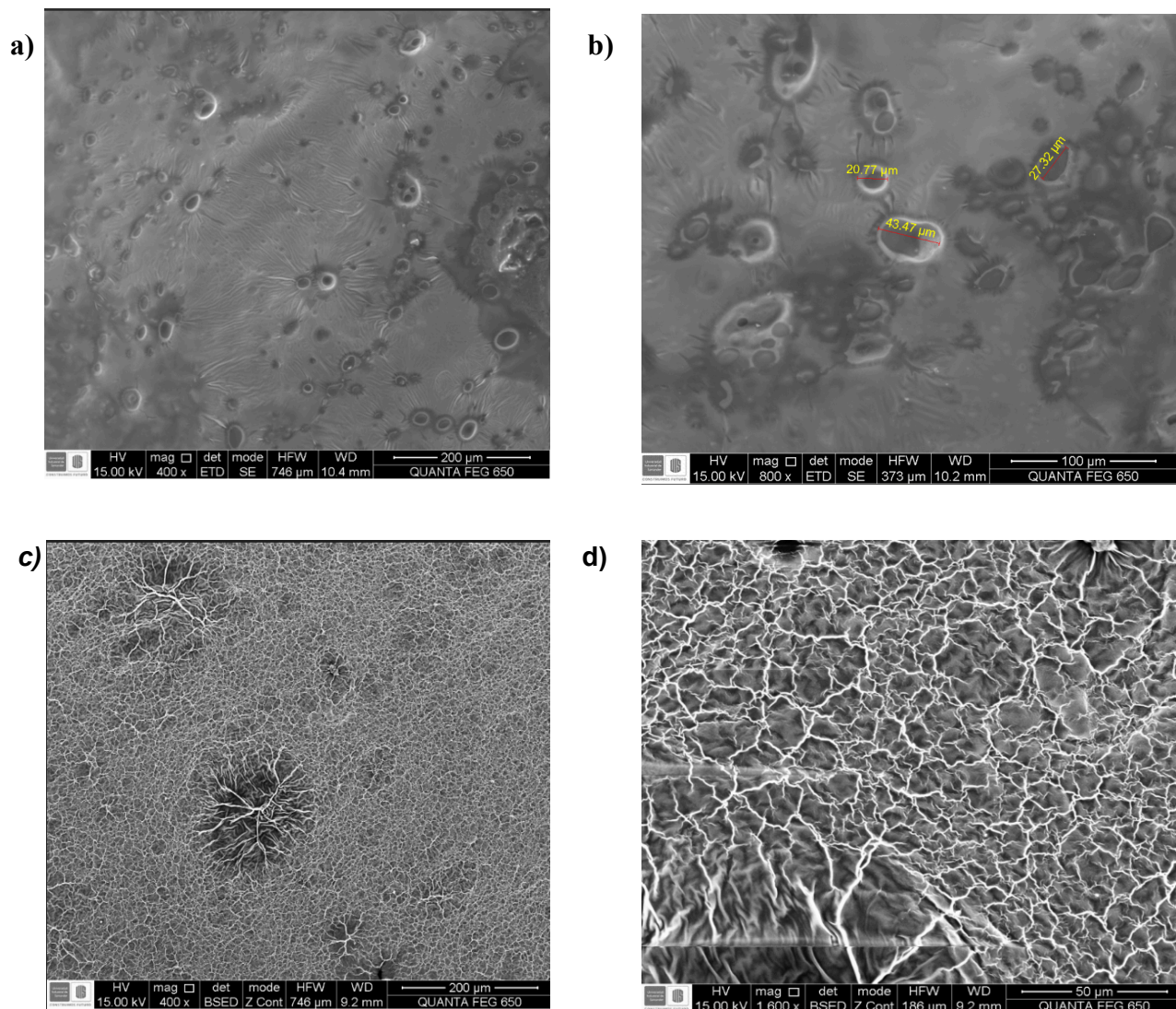
distribución ordenada de los poros. El tamaño de poro estimado es significativamente superior al reportado para hidrogeles de agarosa al 1.5 %, en los cuales se han descrito diámetros promedio de  $190 \pm 25$  nm utilizando técnicas como cryo-SEM que preservan la estructura hidratada (Jayawardena et al., 2023). Esta diferencia puede atribuirse principalmente al método de secado empleado antes de la observación. En el presente estudio, la muestra fue secada al aire, lo cual favorece la contracción de la matriz polimérica y la formación de cavidades superficiales de mayor tamaño debido a la evaporación progresiva del agua. En contraste, en el estudio citado se empleó secado por medio de congelación a alta presión (HPF) y microscopía cryo-SEM, lo que minimiza la deformación estructural. Este comportamiento ha sido ampliamente reportado en la literatura, (Guastaferró et al., 2021) demostraron que el tipo de técnica de secado, freeze-drying o CO<sub>2</sub> supercrítico, y la tasa de enfriamiento influyen directamente en la morfología del hidrogel, evidenciando que procesos más controlados permiten mantener poros más pequeños y uniformes, mientras que la deshidratación convencional tiende a generar estructuras más abiertas y heterogéneas.

Por otro lado, las figuras 10c y 10d, correspondientes al gel formulado con eugenol a una escala de 400 y 200  $\mu\text{m}$ , respectivamente, permiten observar una superficie heterogénea con canales interconectados que conforman una red tridimensional compleja. Esta estructura contrasta con la del gel sin eugenol, evidenciando que la incorporación del metabolito secundario modificó significativamente la estructura del material, generando una superficie más irregular y una distribución interna menos uniforme. Sin embargo, es importante resaltar que en ninguna de las escalas se observaron agregados cristalinos, lo que sugiere una distribución relativamente homogénea del metabolito dentro de la matriz del gel.

El efecto heterogéneo de la matriz puede atribuirse a interacciones fisicoquímicas entre el eugenol y los componentes poliméricos del gel, particularmente las cadenas de agar y goma xantana. El eugenol es un fenilpropanoide anfifílico con grupo hidroxilo (-OH) capaz de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo y éteres (C-O-C) presentes en la estructura de estos gelificantes, permitiendo su estabilización transitoria dentro de la matriz polimérica. A su vez, su anillo aromático y los sustituyentes apolares le confieren la capacidad de establecer interacciones hidrofóbicas con zonas ricas en enlaces C-H como las del aceite mineral, lo que puede inducir una microseparación de fases con dominios enriquecidos en eugenol dentro de la matriz del gel (Chelu, 2024).

De acuerdo con (Rojas et al., 2021) la naturaleza apolar del eugenol interfiere con el ordenamiento regular de ceras lipídicas, altamente apolares, impidiendo un empaquetamiento eficiente y generando cristalización incompleta. Sin embargo, en matrices con compuestos cíclicos y menos polares, las regiones polares del eugenol tienden a interactuar con las cadenas hidrocarbonadas de las ceras, promoviendo un reordenamiento parcial durante el enfriamiento formando grandes redes cristalinas. Así, la capacidad anfifílica le permite interactuar con fases polares y apolares, favoreciendo la heterogeneidad estructural. En la figura 11c se aprecia la presencia de microdominios en la estructura del material.

La aparición de superficies más heterogéneas ha sido reportada previamente en geles que incorporan compuestos hidrofóbicos, donde la afinidad parcial con la fase acuosa induce reorganizaciones locales de la estructura tridimensional del gel (L. Zhang et al., 2023).

**Figura 10.***Caracterización morfológica del formulado en gel.*

Nota. Micrografías SEM de la matriz del gel luego de un mes de preparado. (a) Detalle a 400  $\mu\text{M}$  (BSED 15 kV) que evidencia la red tridimensional. (b) Detalle a 2 00  $\mu\text{M}$  (BSED 15 kV) que evidencia heterogeneidad y canales interconectados. (b) Vista a 100  $\mu\text{M}$  de la matriz del gel sin eugenol (ETD, 15 kV) mostrando poros redondeados con diámetros en el rango  $\sim 20\text{--}45$   $\mu\text{m}$ . (c) Detalle a 50  $\mu\text{M}$  (BSED, 15 kV) donde se muestran redes tridimensionales. Todas las barras de escala aparecen en las micrografías. Imágenes representativas de al menos  $n = 3$  áreas diferentes.

## 5. Conclusiones

1. La evaluación de la actividad adulticida de los metabolitos secundarios 1,8-cineol y eugenol, permitió identificar al eugenol como adulticida promisorio sobre *Ae. aegypti*, con una mortalidad del 100% a 500 ppm luego de 15 minutos de exposición, con concentraciones letales  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de 419.936 y 465.051 ppm después de 24 horas de exposición, respectivamente. En contraste, el metabolito 1,8-cineol no mostró actividad adulticida promisorio en ninguna de las concentraciones evaluadas. A concentraciones intermedias se observó un efecto knock down, es decir, parálisis transitoria pues involucró la recuperación de un porcentaje de adultos a las 24 horas. Este efecto se asocia a la acción de proteínas detoxificantes. Además, mediante ensayos enzimáticos se determinó que el eugenol logra inhibir el 47.52% la proteína neuronal acetilcolinesterasa a 500 ppm, lo que respalda el mecanismo neurotóxico asociado al efecto knock down.
2. La incorporación del eugenol en una matriz de gel a base de agar-agar resultó una estrategia eficaz para proteger el compuesto de la luz y oxidación, además de garantizar la liberación lenta y sostenida del principio activo. La selección de los gelificantes, tensoactivos y aditivos empleados resultó adecuada para obtener un sistema homogéneo, estable y con características fisicoquímicas uniformes. No obstante, el análisis morfológico mediante SEM evidenció cambios estructurales notables en la matriz del gel tras la incorporación del eugenol, lo que sugiere la formación de una red tridimensional más compleja y heterogénea. Los bioensayos mostraron mortalidades entre el 28% y el 100%, dependiendo de la concentración evaluada tras 60 minutos de exposición, manteniendo este efecto incluso después de cuatro semanas de almacenamiento.

3. En conjunto, los resultados respaldan el potencial de formulados semisólidos a base de moléculas vegetales de plantas para ejercer actividad adulticida sobre *Ae. aegypti*. Esta es una alternativa prometedora frente al uso de moléculas sintéticas tóxicas, al ofrecer ventajas en términos de estabilidad, bajo costo y menor impacto ambiental. Futuras investigaciones deberán profundizar en pruebas a gran escala y en condiciones de campo para confirmar su aplicabilidad real.

## Referencias bibliográficas

- Acosta, N., Sánchez, E., Calderón, L., Cordoba-Diaz, M., Cordoba-Diaz, D., Dom, S., & Heras, Á. (2015). Physical Stability Studies of Semi-Solid Formulations from Natural Compounds Loaded with Chitosan Microspheres. *Marine Drugs*, 13(9), 5901–5919.
- Ahmadi, Z., Saber, M., Akbari, A., & Mahdavinia, G. R. (2018). Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 111–119.
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121.
- Alavez-Rosas, D., Socorro-Benitez, C., & Cruz-Esteban, S. (2022). Repellent and adulticidal effect of essential oils mixtures on *Aedes aegypti* females. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(2), 1885–1892.
- Almadiy, A. A. (2020). Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of two plant oils and their major fractions against *Aedes aegypti*, the common vector of dengue fever. *Heliyon*, 6(9), e04915.
- Anoopkumar, A., Puthur, S., Varghese, P., Rebello, S., & Aneesh, E. M. (2017). Life cycle, bio-ecology and DNA barcoding of mosquitoes *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse). *The Journal of Communicable Diseases*, 49(3), 32–41.
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985.
- Armisen, R., & Gaiatas, F. (2009). Agar. In *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 82–107). Elsevier.
- Assadpour, E., Can Karaça, A., Fasamanesh, M., Mahdavi, S. A., Shariat-Alavi, M., Feng, J.,

- Kharazmi, M. S., Rehman, A., & Jafari, S. M. (2024). Application of essential oils as natural biopesticides; recent advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *64*(19), 6477–6497.
- Aungtikun, J., & Soonwera, M. (2021). Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils. *Scientific Reports*, *11*(1), 4685.
- Ayllón-Gutiérrez, R., Díaz-Rubio, L., Montaña-Soto, M., Haro-Vázquez, M. del P., & Córdova-Guerrero, I. (2024). Applications of plant essential oils in pest control and their encapsulation for controlled release: A review. *Agriculture*, *14*(10), 1766.
- Baer, K., Buchbauer, G., Franz, C., & Novak, J. (2009). *Handbook of Essential Oils : Science, technology, and applications*. <https://doi.org/10.1201/9781420063165>
- Barrangou, L. M., Drake, M. A., Daubert, C. R., & Allen Foegeding, E. (2006). Sensory texture related to large-strain rheological properties of agar/glycerol gels as a model food. *Journal of Texture Studies*, *37*(3), 241–262.
- Bay, E. C. (1967). Mosquito control by fish: a present-day appraisal. *WHO Chronicle*, *21*(10), 415–423.
- Boik, J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Mitchell Seymour, E., & Spelman, K. (2009). Interactions of Bioactive Plant Metabolites: Synergism, Antagonism, and Additivity. *Recent Advances in Plant Biotechnology*, 213–230.
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *229*, 108664.
- Brogdon, W. G. (2014). *CDC bottle bioassays*. In: Benedict M (ed) *Methods in anopheles*

*research* (Vol. 4).

- Campaniello, D., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Antifungal activity of eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1124–1128.
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2012). Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1231–1242.
- Carloni, M., Nasuti, C., Fedeli, D., Montani, M., Amici, A., Vadhana, M. S. D., & Gabbianelli, R. (2012). The impact of early life permethrin exposure on development of neurodegeneration in adulthood. *Experimental Gerontology*, 47(1), 60–66.
- Carvalho, I. T., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(2), 109–119.
- Castillo-Morales, R. M., Serrano, S. O., Villamizar, A. L. R., Méndez-Sánchez, S. C., & Duque, J. E. (2021). Impact of *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) essential oil and primary components on the eclosion and larval development of *Aedes aegypti*. In *Research Square*. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-388057/v1>
- Castillo, R. M., Stashenko, E., & Duque, J. E. (2017). Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(1), 25–35.
- CDC. (2023). *International Manual for Evaluating Insecticide Resistance Using the CDC Bottle Bioassay* (Lenhart, A., Vizcaino, L., Chan, A., & Brogdon, W. G. (ed.)).
- Champakaew, D., Choochote, W., Pongpaibul, Y., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Tuetun, B., & Pitasawat, B. (2007). Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).

- Parasitology Research*, 100(4), 729–737.
- Chelu, M. (2024). Hydrogels with Essential Oils: Recent Advances in Designs and Applications. *Gels (Basel, Switzerland)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/gels10100636>
- Chen, M., Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2020). Chronology of sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(2), e21686.
- Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335.
- Corbel, V., Kont, M. D., Ahumada, M. L., Andréo, L., Bayili, B., Bayili, K., Brooke, B., Pinto Caballero, J. A., Lambert, B., Churcher, T. S., Duchon, S., Etang, J., Flores, A. E., Gunasekaran, K., Juntarajumnong, W., Kirby, M., Davies, R., Lees, R. S., Lenhart, A., ... Yadav, R. S. (2023). A new WHO bottle bioassay method to assess the susceptibility of mosquito vectors to public health insecticides: results from a WHO-coordinated multi-centre study. *Parasites & Vectors*, 16(1), 21.
- Corcellas, C., Feo, M. L., Torres, J. P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International*, 47, 17–22.
- Coulibaly, F. H., Rossignol, M., Haddad, M., Carrasco, D., Azokou, A., Valente, A., Ginibre, C., Koné, M. W., & Chandre, F. (2024). Biological effects of *Lippia alba* essential oil against *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 14(1), 3508.
- Cruz-Castillo, A. U., Rodríguez-Valdez, L. M., Correa-Basurto, J., Noguera-Torres, B., Andrade-Ochoa, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2023). Terpenic Constituents of Essential Oils with Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti*: A QSAR and Docking Molecular

- Study. *Molecules* , 28(6). <https://doi.org/10.3390/molecules28062454>
- de Souza Wuillda, A. C. J., Campos Martins, R. C., & Costa, F. das N. (2019). Larvicidal activity of secondary plant metabolites in *Aedes aegypti* control: An overview of the previous 6 years. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X1986289.
- Duque, J. E., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Ortiz-Rodríguez, L. A., Vanegas, T. S., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2023). Insecticidal activity of essential oils from American native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): an introduction to their possible mechanism of action. *Scientific Reports*, 13(1), 2989.
- EcoSMART Mosquito Fogger*. (n.d.). DoMyOwn.com. Retrieved August 24, 2025, from <https://www.domyown.com/ecosmart-organic-mosquito-fogger-p-8922.html>
- EcoVia MT Mosquito and Tick Control*. (n.d.). DoMyOwn.com. Retrieved August 24, 2025, from [https://www.domyown.com/ecovia-mt-mosquito-and-tick-control-p-18881.html?sub\\_id=18905](https://www.domyown.com/ecovia-mt-mosquito-and-tick-control-p-18881.html?sub_id=18905)
- Eden, W. T., Alighiri, D., Supardi, K. I., & Cahyono, E. (2020). The mosquito repellent activity of the active component of air freshener gel from Java citronella oil (*Cymbopogon winterianus*). *Journal of Parasitology Research*, 2020, 9053741.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Ait Addi, E. H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220–243.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr, & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Eltalawy, H. M., El-Fayoumi, H., Aboelhadid, S. M., Al-Quraishy, S., El-Mallah, A. M., Abo El-Ela, F. I., Awad, E. M., & Abdel-Baki, A.-A. S. (2025). Insecticidal activity and

- systematic insights of carvacrol against *Tribolium castaneum*: Acetylcholinesterase inhibition, oxidative stress, and molecular docking". *Journal of Stored Products Research*, *112*(102638), 102638.
- EPA. (n.d.). *Citronella oil*. Fact Sheet. Retrieved May 15, 2025, from [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-021901\\_01-Nov-99.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-021901_01-Nov-99.pdf)
- Esmaili, F., Sanei-Dehkordi, A., Amoozegar, F., & Osanloo, M. (2021). A review on the use of essential oil-based nanoformulations in control of mosquitoes. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*(5), 12516–12529.
- Essentria IC Pro Insecticide*. (n.d.). DoMyOwn.com. Retrieved August 24, 2025, from <https://www.domyown.com/essentria-ic-pro-insecticide-p-25133.html>
- Fagbohun, I. K., Oyeniyi, T. A., Idowu, E. T., Nwanya, O., Okonkwo, F., Adesalu, K. O., Jimoh, R. T., Oladosu, Y., Otubanjo, O. A., & Adeogun, A. O. (2022). Detection and Co-occurrence of kdr (F1534C and S989P) Mutations in Multiple Insecticides Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Nigeria. *Journal of Medical Entomology*, *59*(5), 1741–1748.
- Ferraz, C. A., Pastorinho, M. R., Palmeira-de-Oliveira, A., & Sousa, A. C. A. (2022). Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *292*(Pt B), 118319.
- Ferreira-de-Lima, V. H., & Lima-Camara, T. N. (2018). Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 77.
- Finney. (1971). Probit analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *60*(9), 1432.
- Flores Guillermo, A. M., Nahuel, F., María, T. D., Andrés, M. V., & Sara, M. P. (2020). Adulticidal effect of seven terpenes and a binary combination against *Aedes aegypti*.

*Journal of Vector Borne Diseases*, 57(4), 356–358.

Galvão, J. G., Cerpe, P., Santos, D. A., Gonsalves, J. K., Santos, A. J., Nunes, R. K., Lira, A. A.,

Alves, P. B., La Corte, R., Blank, A. F., Silva, G. F., Cavalcanti, S. C., & Nunes, R. S.

(2019). Lippia gracilis essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: an

environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. *Pest Management*

*Science*, 75(2), 452–459.

Guastaferrero, M., Baldino, L., Reverchon, E., & Cardea, S. (2021). Production of Porous

Agarose-Based Structures: Freeze-Drying vs. Supercritical CO Drying. *Gels (Basel,*

*Switzerland)*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/gels7040198>

Han, D., Meng, F., Li, J., Liu, H., Cao, J., Song, X., Chen, H., & Wenlong, X. (2024). Synthesis,

properties and application of pesticides encapsulated hydrogels. *European Polymer Journal*,

215, 113196.

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera:

Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical*

*Entomology*, 38(3), 411–422.

Hilal, A., Florowska, A., & Wroniak, M. (2023). Binary hydrogels: Induction methods and recent

application progress as food matrices for bioactive compounds delivery-A bibliometric

review. *Gels (Basel, Switzerland)*, 9(1), 68.

Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Gao, Y.-L. (2006). Controlled release properties of Chitosan

encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and*

*Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), 209–214.

INS. (2025). *Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública*. Publicación en

línea.

IRAC. (2025). Insecticide Resistance Action Committee. In *Insecticide Resistance Action*

*Committee* (pp. 6–13). <https://www.illac-online.org>

- Jain, H. V., Dhiman, S., & Ansari, N. G. (2024). Recent trends in techniques, process and sustainability of slow-release formulation for pesticides. *Industrial Crops and Products*, 216(118764), 118764.
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., & Stankiewicz, M. (2017). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system-A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(1), 34.
- Jurado, E. M., Cárdenas, E. E., & Obando, O. A. A. (2023). Potential current and future distribution for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Colombia: important disease vectors. In *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2886420/v1>
- Khalesi, H., Lu, W., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). New insights into food hydrogels with reinforced mechanical properties: A review on innovative strategies. *Advances in Colloid and Interface Science*, 285(102278), 102278.
- Khan, A., Kanwal, F., Ullah, S., Fahad, M., Tariq, L., Altaf, M. T., Riaz, A., & Zhang, G. (2025). Plant secondary metabolites-central regulators against abiotic and biotic stresses. *Metabolites*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/metabo15040276>
- Khanikor, B. (2013). Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/japs.2013.30202>
- Kotil, T., & Yön, N. D. (2015). The effects of permethrin on rat ovarian tissue morphology. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 67(3), 279–285.
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M.,

- Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R. F., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, *4*, e08347.
- Kumar, S., & Madihally, S. V. (2022). *Role of Chitosan and Chitosan-Based Nanomaterials in Plant Sciences*. Academic Press.
- Laguna, C., Lehninger, A. L., Nelson, D. L. L., Cox, M. M., Cuchillo, C. M., & Suau León, P. (2006). *Correlación y regresión lineal*. *4*, 1–18.
- Li, M.-X., Ma, Y.-P., Zhang, H.-X., Sun, H.-Z., Su, H.-H., Pei, S.-J., & Du, Z.-Z. (2021). Repellent, larvicidal and adulticidal activities of essential oil from Dai medicinal plant *Zingiber cassumunar* against *Aedes albopictus*. *Plant Diversity*, *43*(4), 317–323.
- Loza-Mejía, M. A., Salazar, J. R., & Sánchez-Tejeda, J. F. (2018). In silico studies on compounds derived from *Calceolaria*: Phenylethanoid glycosides as potential multitarget inhibitors for the development of pesticides. *Biomolecules*, *8*(4), 121.
- Lucía, A., & Guzmán, E. (2021). Emulsions containing essential oils, their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management. *Advances in Colloid and Interface Science*, *287*(102330), 102330.
- Maes, C., Bouquillon, S., & Fauconnier, M.-L. (2019). Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: A review. *Molecules*, *24*(14), 2539.
- Ma, W.-B., Feng, J.-T., Jiang, Z.-L., & Zhang, X. (2014). Fumigant activity of 6 selected essential oil compounds and combined effect of methyl salicylate and trans-cinnamaldehyde against *Culex pipiens pallens*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *30*(3), 199–203.

McBride, C. S., Baier, F., Omondi, A. B., Spitzer, S. A., Lutomiah, J., Sang, R., Ignell, R., &

Vosshall, L. B. (2014). Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, *515*(7526), 222–227.

Morales-Burgos, A. M., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y. L., Rascón-Chu, A.,

Lizardi-Mendoza, J., Sotelo-Cruz, N., Brown-Bojórquez, F., Burgara-Estrella, A., &

Pedroza-Montero, M. (2017). Syneresis in gels of highly ferulated arabinoxylans:

Characterization of covalent cross-linking, rheology, and microstructure. *Polymers*, *9*(5), 164.

*Mosquito Amigo*. (n.d.). BugMD. Retrieved August 24, 2025, from

<https://bugmd.com/products/mosquito-amigo>

*Mosquito X ultra*. (n.d.). DoMyOwn.com. Retrieved August 25, 2025, from

<https://www.domyown.com/mosquito-ultra-p-15940.html>

Moungthipmalai, T., Puwanard, C., Aungtikun, J., Sittichok, S., & Soonwera, M. (2023).

Ovicidal toxicity of plant essential oils and their major constituents against two mosquito vectors and their non-target aquatic predators. *Scientific Reports*, *13*(1), 2119.

Nasuti, C., Coman, M. M., Olek, R. A., Fiorini, D., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S.,

Fedeli, D., & Gabbianelli, R. (2016). Changes on fecal microbiota in rats exposed to

permethrin during postnatal development. *Environmental Science and Pollution Research International*, *23*(11), 10930–10937.

Ong, W.-D., Tey, B.-T., Quek, S. Y., Tang, S.-Y., & Chan, E.-S. (2015). Alginate-based emulsion

template containing high oil loading stabilized by nonionic surfactants: Alginate-based O/W emulsion systems .... *Journal of Food Science*, *80*(1), E93–E100.

OPS. (2024). *Actualización Epidemiológica: Dengue en la Región de las Américas* (No. Semana epidemiológica 23 de 2024). Organización Panamericana de la Salud.

<https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue.html>

- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 962619.
- Pavela, R., Maggi, F., Iannarelli, R., & Benelli, G. (2019). Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Tropica*, *193*, 236–271.
- P Ferreira, T., Haddi, K., F T Corrêa, R., Zapata, V. L. B., Piau, T. B., Souza, L. F. N., Santos, S.-M. G., Oliveira, E. E., Jumbo, L. O. V., Ribeiro, B. M., Grisolia, C. K., Fidelis, R. R., Maia, A. M. S., & S Aguiar, R. W. (2019). Prolonged mosquitocidal activity of Siparuna guianensis essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(8), e0007624.
- Phuong, L. L. C., Diep The Tai, Hoang, N. M., & Tran, N. T. T. (2022). Formulation of essential oil-based air freshener gel. *Tu Nhien va Cong Nghe : Khoa Hoc*.  
<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5432>
- Priyadarshana, T. S., & Slade, E. M. (2023). A meta-analysis reveals that dragonflies and damselflies can provide effective biological control of mosquitoes. *The Journal of Animal Ecology*, *92*(8), 1589–1600.
- PubChem. (n.d.). *Eugenol*. Retrieved September 17, 2025, from  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol>
- Ravichandran, I. S., Rajasekaran, M. R., Balasingam, P., Thangavelu, R. S., Nellaiappan, K., & Sivagnanam, C. (2024). Variations in floral secondary metabolites of three flower color morphs of *Lantana camara* L.: possible roles in pollinators attraction. *Discover Plants*, *1*(1).

<https://doi.org/10.1007/s44372-024-00072-5>

- Ravi, R., Rajendran, D., Oh, W.-D., Mat Rasat, M. S., Hamzah, Z., Ishak, I. H., & Mohd Amin, M. F. (2020). The potential use of *Azolla pinnata* as an alternative bio-insecticide. *Scientific Reports*, *10*(1), 19245.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, *57*(1), 405–424.
- Rojas, J., Cabrera, S., Benavides, J., Lopera, Y., & Yarce, C. J. (2021). Lipidic matrixes containing clove essential oil: Biological activity, microstructural and textural studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(9), 2425.
- Sălceanu, C., Paraschivu, M., Cotuna, O., Sărățeanu, V., Prioteasa, M. A., & Flondor, I. S. (2023). Global pesticide market: Size, trends, forecasts. “*Annals of the University of Craiova - Agriculture Montanology Cadastre Series*,” *52*(2), 146–157.
- Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., & Khanikor, B. (2019a). Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal and adulticidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*, *9*(1), 9471.
- Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., & Khanikor, B. (2019b). Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxicology Reports*, *6*, 1091–1096.
- Scott, T. W., Clark, G. G., Lorenz, L. H., Amerasinghe, P. H., Reiter, P., & Edman, J. D. (1993). Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal of Medical Entomology*, *30*(1), 94–99.
- Semoff, S., Nyack, N. Y., & Saffaf, R. (2001). Gel Air Freshener and Method of Making the Same, Assign: Bath and Body Work Inc. *Patent: US, 5679334*.

- Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., & Maggi, F. (2021). Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules* , 26(3).  
<https://doi.org/10.3390/molecules26030666>
- Silva, I. M., Martins, G. F., Melo, C. R., Santana, A. S., Faro, R. R., Blank, A. F., Alves, P. B., Picanço, M. C., Cristaldo, P. F., Araújo, A. P. A., & Bacci, L. (2018). Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpene bioinsecticides. *Pest Management Science*, 74(4), 1001–1012.
- Silver, K. S., Du, Y., Nomura, Y., Oliveira, E. E., Salgado, V. L., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2014). Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. *Advances in Insect Physiology*, 46, 389–433.
- Singh, S., & Mohan, L. (2013). Biological control of mosquitoes by insectivorous flycatcher birds. *Journal of Entomological Research*, 37(4), 359–364.
- Slotkin, T. A. (2011). Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reproductive Toxicology* , 31(3), 297–301.
- Subahar, R., Huang, A., Wijaya, R. S., Nur, L. S. E., Susanto, L., Firmansyah, N. E., Yulhasri, Y., El Bayani, G. F., & Dwira, S. (2024). First report on evaluation of commercial eugenol and piperine against *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae) larvae: Mortality, detoxifying enzyme, and histopathological changes in the midgut. *Parasitology International*, 98(102813), 102813.
- Sworn, G. (2010). Xanthan Gum - Functionality and Application. In *Practical Food Rheology* (pp. 85–112). Wiley-Blackwell.
- Tay, J.-W., Choe, D.-H., Mulchandani, A., & Rust, M. K. (2020). Hydrogels: From controlled release to a new bait delivery for insect pest management. *Journal of Economic Entomology*, 113(5), 2061–2068.

- Tokachil, N., & Yusoff, N. (2018). The Simulation of Egg Hatching Trend of *Aedes Aegypti* Associated with Rainfall Distribution. *Animal Review*, 5(1), 1–7.
- Us Epa, O. A. (2019). *Información básica sobre pesticidas*.  
<https://espanol.epa.gov/espanol/informacion-basica-sobre-pesticidas>
- Vanegas-Estévez, T., Duque, F. M., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Mendez-Sanchez, S. C., & Duque, J. E. (2024). Design and elucidation of an insecticide from natural compounds targeting mitochondrial proteins of *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 198, 105721.
- Venturini C De, G., Nicolini, J., Machado, C., & Machado, V. G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim Nova*, 31, 360–368.
- Ware, G. (2004). AN INTRODUCTION TO INSECTICIDES. *The Pesticide Book*.  
<https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/sozman/109686/An%20Introduction%20to%20INSECTICIDES.4th%20EDITION.pdf>
- Wu, T., Zhao, K., Zhang, C., Zhong, T., Li, Z., Bao, Z., Gao, Y., & Du, F. (2022). Promising delivery platform for smart pest control with high water-retaining capacity. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(49), 55062–55074.
- Yang, X., Ren, B., Ren, Z., Jiang, L., Liu, W., & Zhu, C. (2015). Synthesis and properties of novel non-ionic polyurethane dispersion based on hydroxylated Tung oil and alicyclic isocyanates. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 03(01), 88–94.
- Zhang, H., Liu, Y., Li, X., & Yu, F. (2011). Dual latex particle size distribution of concentrated inverse polymer emulsion and its correlation with stability. *Acta Polymerica Sinica*, 011(8), 832–837.
- Zhang, L., Xiao, Q., Xiao, Z., Zhang, Y., Weng, H., Chen, F., & Xiao, A. (2023). Hydrophobic modified agar: Structural characterization and application in encapsulation and release of

curcumin. *Carbohydrate Polymers*, 308(120644), 120644.