

Desarrollo de un bioproducto usando carvacrol como principio activo para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino

Karen Yineth Prada Campos

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph. D.

Doctora en Ciencias, Bioquímica

Codirectora

Gloria Stefany Avendaño Mora, Qca., Ms.C

Candidata a Doctora en Química

Asesor

Jonny Edward Duque Luna, Ph. D.

Doctor en Ciencias Básicas, Entomología médica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2025

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Agradecimientos

*A mis padres, William y Alba, por creer en mí, apoyarme incondicionalmente y cuidarme siempre con amor, paciencia y esfuerzo.*

*A Jhair, quien ha crecido a mi lado y con quien he compartido risas, tristezas y travesuras.*

*A mis nonitas Ana y Rosa, por su amor y sus cuidados, por ser mujeres fuertes y admirables, y porque su presencia me ha enseñado a honrar y disfrutar de mis raíces.*

*A Ella, porque su amistad ha sido una luz en mi vida y me ha acompañado en los buenos y malos momentos.*

*A mis amigos Ely, Diego, Silvia, Cath, Camilo, Juanma y Dayana, por su compañía y por todos los momentos vividos.*

*A Martín, porque verlo crecer ha llenado mi corazón de alegría y ternura.*

*A Gloria por su guía, dedicación, acompañamiento, confianza y motivación, siempre presente en el desarrollo de este proyecto.*

*A la profesora Stelia y al profesor Jonny, por su paciencia, sabiduría, orientación y enseñanzas, que me inspiraron a valorar cada esfuerzo y a superar cada obstáculo. Porque contribuyeron en mi formación académica y en mi crecimiento personal.*

*A mis compañeros de los laboratorios 110 (CINTROP) y 402 (GIBIM), por su amabilidad, por compartir sus conocimientos y por todo su apoyo. En especial al equipo de garrapatas: Gloria, Bethsy, Andrés y Cath, por su acompañamiento y ayuda constante.*

*A todas las personas del proyecto ExpeTIC, quienes me acogieron con cariño.*

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

*A la Escuela de Química, por el préstamo de sus equipos, y a los profesionales encargados, por su disposición y asesoría durante las mediciones realizadas en el Laboratorio Instrumental de Análisis Químico.*

*Al Dr. Carlos Alberto Villarreal, del Laboratorio de Microscopía por su valiosa colaboración en el análisis de las muestras mediante SEM.*

*A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión y al proyecto 3739 “Formulación de un ixodicida y/o ixorepelente diseñado en laboratorio con validación en campo proyectado para la prevención de la infestación de garrapatas en bovinos”.*

*Finalmente, a todas las personas que, de una u otra manera, estuvieron presentes y me brindaron su apoyo durante este proceso.*

**Tabla de contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	15
1. Marco referencial y antecedentes.....	17
1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae).....	17
1.1.1 Ciclo de vida .....	17
1.1.1.1 Fase parasitaria.....	18
1.1.1.2 Fase no parasitaria.....	19
1.1.2 Distribución geográfica.....	21
1.2 Afectaciones económicas en la ganadería causadas por <i>R. microplus</i> .....	22
1.2.1 Enfermedades transmitidas por <i>R. microplus</i> .....	22
1.3 Métodos para el control de la infestación de <i>R. microplus</i> .....	23
1.4 Acaricidas químicos.....	24
1.4.1 Acaricidas químicos convencionales y su mecanismo de acción .....	26
1.5 Compuestos de origen natural como método alternativo para el control de garrapatas .....	28
1.6 El carvacrol y su actividad acaricida .....	30
1.6.1 Mecanismo de acción en larvas <i>R. microplus</i> .....	31
1.7 Formulaciones de insecticidas .....	32
1.7.1 Formulaciones clásicas .....	32
1.7.2 Nuevas formulaciones.....	33
1.8 Nanoemulsiones.....	36
1.8.1 Tensoactivos .....	36
1.8.2 Equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB).....	37
1.8.3 Tipos de nanoemulsiones.....	37
1.8.4 Métodos para preparar nanoemulsiones.....	38

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

1.8.4.1 Métodos de baja energía .....	38
1.8.4.2 Métodos de alta energía .....	39
1.8.5 Caracterización de las nanoemulsiones .....	39
1.8.5.1 Tamaño e índice de polidispersidad.....	39
1.8.5.2 Potencial zeta .....	40
1.9 Nanoemulsiones de carvacrol .....	41
2. Objetivos.....	42
2.1 Objetivo General.....	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
3. Metodología .....	43
3.1 Síntesis de nanoemulsiones de carvacrol.....	44
3.2.1 Diseño experimental .....	44
3.2.2 Nanoemulsiones de tipo aceite en agua (O/W) con HLB alto ( $\geq 7$ ) .....	46
3.2.3 Nanoemulsiones de tipo aceite en agua (O/W) con HLB bajo ( $\leq 5$ ) .....	47
3.3 Descripción física.....	48
3.4 Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones.....	48
3.4.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	48
3.4.1.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad.....	49
3.4.1.2 Potencial zeta .....	49
3.5 Caracterización de la nanoemulsión más prometedora.....	49
3.5.1 Estabilidad de la nanoemulsión .....	49
3.5.2 Prueba de centrifugación.....	50
3.5.3 Evaluación del pH.....	50
3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	51
3.6 Metodología para el manejo de las garrapatas .....	52

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

3.6.1	Colecta y limpieza de garrapatas ingurgitadas.....	52
3.6.2	Colecta e incubación de huevos de garrapatas en el laboratorio .....	53
3.6.3	Incubación de las larvas de garrapatas en el laboratorio.....	53
3.6.4	Protocolo para desechar garrapatas adultas y larvas.....	53
3.7	Metodología fase <i>in vivo</i> : Ensayos de actividad acaricida en el laboratorio .....	54
3.7.1	Prueba del paquete larval (LPT) .....	55
3.7.2	Prueba de inmersión larval (LIT).....	56
3.8	Análisis estadístico.....	57
3.8.1	Análisis estadístico de la actividad acaricida de las nanoemulsiones.....	57
3.8.2	Análisis estadístico de las propiedades fisicoquímicas de la mejor nanoemulsión en las pruebas de estabilidad .....	59
4.	Resultados y discusión.....	59
4.1	Formulaciones de carvacrol .....	60
4.2	Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones de carvacrol .....	66
4.2.1	Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta.....	66
4.3	Fase <i>in vivo</i> : Actividad acaricida .....	72
4.3.1	Actividad acaricida del carvacrol por el método del paquete larval .....	72
4.3.2	Actividad acaricida de las nanoemulsiones .....	75
4.3.2.1	Resultados de la prueba del paquete larval (LPT) .....	75
4.3.2.2	Resultados de la prueba de inmersión larval (LIT).....	80
4.4	Caracterización de la nanoemulsión más prometedora.....	84
4.4.1	Actividad acaricida de la mejor nanoemulsión.....	84
4.4.2	Estabilidad de la mejor nanoemulsión .....	89
4.4.2.1	Estabilidad en el tiempo.....	89
4.4.2.2	Prueba de centrifugación.....	92

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

4.4.3 Evaluación del pH.....	93
4.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	94
5. Conclusiones .....	97
6. Recomendaciones .....	99
Referencias Bibliográficas .....	100
Anexos .....	125

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Ventajas y desventajas de los principales tipos de formulación de insecticidas.....	34
<b>Tabla 2.</b> Condiciones iniciales para la preparación de las nanoemulsiones de carvacrol.....	45
<b>Tabla 3.</b> Relaciones de HLB para la preparación de las nanoemulsiones de carvacrol.....	46
<b>Tabla 4.</b> Descripción y estabilidad de las formulaciones preparadas de carvacrol con valores de HLB entre 4.3 y 15.....	61
<b>Tabla 5.</b> Diámetro promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta de las formulaciones preparadas de carvacrol con valores de HLB entre 4.3 y 15.....	67
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por el método del paquete larval .....	73
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por el método del paquete larval .....	79
<b>Tabla 8.</b> Datos de mortalidad obtenidos para cada nanoemulsión por el método de paquete larval .....	81
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para la nanoemulsión NE2b de carvacrol por el método del paquete larval .....	86
<b>Tabla 10.</b> Evolución del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta de la nanoemulsión NE2b a diferentes temperaturas en un periodo de 14 días .....	90

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Garrapata <i>R. microplus</i> en diferentes estadios: a) huevo, b) larva, c) adulta sin alimentar y d) adulta ingurgitada o completamente alimentada .....	18
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida y estadios de las garrapatas <i>R. microplus</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Clases de compuestos presentes en los acaricidas químicos.....	26
<b>Figura 4.</b> Estructura del carvacrol.....	31
<b>Figura 5.</b> Nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) .....	38
<b>Figura 6.</b> Esquema metodológico del proyecto .....	43
<b>Figura 7.</b> Preparación general de nanoemulsiones de carvacrol (O/W) .....	47
<b>Figura 8.</b> Protocolo experimental para los ensayos de actividad acaricida mediante el método del paquete larval modificado.....	56
<b>Figura 9.</b> Protocolo experimental para los ensayos de actividad acaricida por el método de inmersión larval modificado .....	57
<b>Figura 10.</b> Mecanismos de desestabilización de nanoemulsiones .....	64
<b>Figura 11.</b> Resultados de mortalidad con concentraciones múltiples de carvacrol mediante el método del paquete larval .....	72
<b>Figura 12.</b> Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones, evaluadas mediante el método del paquete larval. Se emplearon etión y carvacrol a 750 ppm como controles positivos.....	75
<b>Figura 13.</b> Resultados de mortalidad con la concentración diagnóstica de 1500 ppm de carvacrol en nanoemulsiones, evaluadas mediante el método del paquete larval. Se utilizaron etión y carvacrol a 750 ppm.....	80
<b>Figura 14.</b> Resultados de mortalidad con concentraciones múltiples de la nanoemulsión NE2b mediante el método del paquete larval.....	85
<b>Figura 15.</b> Resultados de la prueba de estabilidad en el tiempo de NE2b a diferentes temperaturas .....	90
<b>Figura 16.</b> Resultados de la prueba de centrifugación de la nanoemulsión NE2b. Las imágenes muestran el aspecto de la nanoemulsión inicial (a) y después de los dos ciclos de centrifugación (b) .....	93

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

<b>Figura 17.</b> Prueba con papel indicador para la medición del pH de la nanoemulsión.....	94
<b>Figura 18.</b> Imágenes SEM de la dilución 1:25 de la nanoemulsión NE2b a diferentes escalas de tamaño.....	95
<b>Figura 19.</b> Imágenes SEM de la dilución 1:250 de la nanoemulsión NE2b .....	95
<b>Figura 20.</b> Imágenes SEM del papel filtro seco que previamente fue impregnado con la solución de la nanoemulsión NE2b a diferentes escalas de tamaño.....	96

**Lista de anexos**

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Distribución del tamaño de partícula y del potencial zeta de las gotas de las nanoemulsiones de carvacrol con HLB 15(1), 9.65(2), 7(3), 5(4) y 4.3(5) el mismo día de su preparación.....	125
<b>Anexo 2.</b> Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones evaluadas mediante el método del paquete larval. Las letras a), b), c), d), e), f), g), h) e i) corresponden a las nanoemulsiones 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b y 5b, respectivamente .....	127
<b>Anexo 3.</b> Datos de mortalidad obtenidos para cada control positivo (Etión 750 ppm) por el método del paquete larval .....	129
<b>Anexo 4.</b> Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones evaluadas mediante el método de inmersión larval. Las letras a), b), c), d), e), f), g), h) e i) indican las nanoemulsiones 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b y 5b, respectivamente.....	130
<b>Anexo 5.</b> Datos de mortalidad obtenidos para cada control positivo (Etión 750 ppm) por el método de inmersión larval.....	132
<b>Anexo 6.</b> Distribución del tamaño de partícula por intensidad de la nanoemulsión NE2b almacenada durante a) 7 y b) 14 días, respectivamente .....	132

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Abreviaturas

<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CL</b>	Concentración letal
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>HLB</b>	Equilibrio hidrofílico-lipofílico
<b>LIT</b>	Prueba de inmersión larval
<b>LogK<sub>ow</sub></b>	Logaritmo decimal del coeficiente de partición octanol-agua
<b>LPT</b>	Prueba del paquete larval
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>N°</b>	Número
<b>NE</b>	Nanoemulsión
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>(O/W)</b>	Aceite en agua
<b>p/p</b>	Peso/peso
<b>PdI</b>	Índice de polidispersidad
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>W/O</b>	Agua en aceite

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Resumen

**Título:** Desarrollo de un bioproducto usando carvacrol como principio activo para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino \*

**Autor:** Karen Yineth Prada Campos \*\*

**Palabras Clave:** carvacrol, garrapatas, *Rhipicephalus microplus*, acaricida, ixodicida, nanoemulsión.

La infestación de *Rhipicephalus microplus* se considera un problema relevante para la ganadería bovina en zonas tropicales y subtropicales del mundo. El uso prolongado de acaricidas químicos para su control ha favorecido el desarrollo de resistencia en las garrapatas y genera riesgos de toxicidad ambiental y para organismos no objetivo. Como alternativa sostenible, se ha propuesto el uso de compuestos naturales como el carvacrol, un fenol monoterpénoide con potencial actividad acaricida, que afecta principalmente la neurotransmisión de estos artrópodos. Sin embargo, su baja solubilidad en agua y alta volatilidad limitan su aplicación en formulaciones clásicas. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar nanoemulsiones de carvacrol para mejorar su estabilidad y biodisponibilidad.

En el desarrollo de este proyecto, se formularon nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) con 0.75 %p/p de carvacrol, 2.25 %p/p de tensoactivos no iónicos (Tween 80 y Span 80) y 97 %p/p de agua, variando el valor de HLB (4.3 - 15) y el tiempo de sonicación (3 y 7 minutos). Las formulaciones se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz y su actividad ixodicida se evaluó por medio de las pruebas del paquete larval y de inmersión larval. Los diámetros promedio de las emulsiones obtenidas oscilaron entre 122 y 218 nm, evidenciando que el incremento del valor HLB y del tiempo de sonicación (7 min) redujeron el tamaño de partícula y aumentaron la estabilidad. La nanoemulsión NE2b (HLB 9.65, 7 min) presentó el menor tamaño de partícula ( $121.9 \pm 1.0$  nm) con un índice de polidispersidad de  $0.260 \pm 0.006$  y un potencial zeta de  $-31.7 \pm 0.6$  mV, indicando estabilidad coloidal. Esta formulación tuvo mayor actividad acaricida en el ensayo de contacto con una  $CL_{50}$  de 723 y 528 ppm a las 24 y 72 horas, respectivamente, contra larvas de *R. microplus*. La prueba de estabilidad evidenció que NE2b mantuvo su homogeneidad durante 7 días a temperatura ambiente con un tamaño medio de partícula de  $105.2 \pm 2.2$  nm e índice de polidispersidad de  $0.263 \pm 0.025$ . Estos resultados demuestran que las nanoemulsiones de carvacrol representan un sistema de administración prometedor para el control de garrapatas en bovinos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Codirectora: Gloria Stefany Avendaño Mora, Qca., Ms.C

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Abstract

**Title:** Development of a bioproduct using carvacrol as the active ingredient for the control of the *Rhipicephalus microplus* tick in cattle \*

**Author:** Karen Yineth Prada Campos \*\*

**Key Words:** carvacrol, ticks, *Rhipicephalus microplus*, acaricide, ixodicide, nanoemulsion.

The infestation of *Rhipicephalus microplus* is considered a major problem for cattle farming in tropical and subtropical regions worldwide. The prolonged use of chemical acaricides for its control has promoted the development of tick resistance and poses risks of environmental toxicity and non-target organisms. As a sustainable alternative, the use of natural compounds such as carvacrol, a monoterpenoid phenol with potential acaricidal activity that mainly affects the neurotransmission in these arthropods, has been proposed. However, its low water solubility and high volatility limit its application in conventional formulations. In this context, the present study aimed to develop carvacrol nanoemulsions to improve its stability and bioavailability.

During the development of this project, oil-in-water (O/W) nanoemulsions were formulated with 0.75% w/w carvacrol, 2.25% w/w nonionic surfactants (Tween 80 and Span 80), and 97% w/w water, varying the HLB value (4.3–15) and sonication time (3 and 7 minutes). The formulations were characterized by dynamic light scattering, and their ixodocidal activity was evaluated using the larval packet and larval immersion tests. The average diameters of the emulsions obtained ranged from 122 to 218 nm, showing that increasing the HLB value and sonication time (7 minutes) reduced particle size and enhanced stability. The NE2b nanoemulsion (HLB 9.65, 7 min) presented the smallest particle size ( $121.9 \pm 1.0$  nm) with a polydispersity index of  $0.260 \pm 0.006$  and a zeta potential of  $-31.7 \pm 0.6$  mV, indicating colloidal stability. This formulation showed greater acaricidal activity in the contact test, with  $LC_{50}$  values of 723 and 528 ppm at 24 and 72 hours, respectively, against *R. microplus* larvae. The stability test demonstrated that NE2b maintained its homogeneity for 7 days at room temperature, with a mean particle size of  $105.2 \pm 2.2$  nm and a polydispersity index of  $0.263 \pm 0.025$ . These results demonstrate that carvacrol nanoemulsions represent a promising delivery system for tick control in cattle.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Codirector: Gloria Stefany Avendaño Mora, Chemistry, M.Sc.

## Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos que infestan a diversos vertebrados como mamíferos, aves, anfibios y reptiles (Ghosh & Nagar, 2014). Su importancia radica en su capacidad para transmitir agentes patógenos - como virus, bacterias, protozoos y nematodos - que pueden afectar al hospedador provocando enfermedades graves e incluso la muerte (Abubakar et al., 2019). Las garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* pertenecen a la familia Ixodidae y son consideradas uno de los artrópodos más relevantes, ya que afectan negativamente el desarrollo de la ganadería en zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Domínguez García et al., 2016). Las principales afectaciones directas e indirectas en el ganado bovino son la pérdida de peso, la disminución de la producción de leche y carne para el consumo, daños en la piel, anemia y la transmisión de patógenos responsables de enfermedades como la anaplasmosis y la babesiosis (Adenubi et al., 2020).

Actualmente, el método más utilizado para el control de *R. microplus* en el ganado, consiste en el empleo de acaricidas comerciales que están hechos a base de compuestos sintéticos como los piretroides, las amidinas, los organofosforados y las lactonas macrocíclicas. Algunos son tóxicos para el medio ambiente y para otros organismos, incluyendo al ser humano; además tienen inconvenientes como la acumulación de residuos en la carne y leche para el consumo (Chen et al., 2022; Johnson et al., 2010). Adicionalmente, el uso prolongado e indiscriminado de estos productos ha favorecido el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes a los componentes y a sus combinaciones y, por lo tanto, disminuye su eficacia de control, genera pérdidas económicas, incrementa los costos de producción y amenaza la seguridad alimentaria (Agwunobi et al., 2021; Dzemo et al., 2022).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Esta problemática ha impulsado la búsqueda de medidas alternativas para el control de garrapatas, como lo son el uso de compuestos de origen natural en formulaciones tópicas gracias a su bajo costo y ecotoxicidad. Por lo tanto, diferentes investigaciones en garrapaticidas se han encaminado hacia la identificación de aceites esenciales y metabolitos secundarios con actividad ixodícida y al desarrollo de formulaciones usándolos como principio activo (Adenubi et al., 2020; Pavela & Benelli, 2016).

Uno de los compuestos más prometedores y que se han reportado en múltiples estudios es el carvacrol (Novato et al., 2022), cuya actividad biocida y mecanismo de acción han sido estudiados por los grupos de investigación CINTROP y GIBIM (Alfonso, 2024; Cabezas, 2024). El carvacrol es un metabolito secundario presente en aceites esenciales de plantas aromáticas como orégano y tomillo, que afecta la producción de energía y la neurotransmisión en las garrapatas *R. microplus* (Cabezas, 2024). Sin embargo, su uso como principio activo en formulaciones clásicas trae consigo problemas de estabilidad y toxicidad de solventes debido a su baja solubilidad en agua y alta volatilidad. A raíz de esto, una de las estrategias que se propone para solucionar estos inconvenientes, mejorar la estabilidad y biodisponibilidad, así como también proteger el compuesto de reacciones adversas con el entorno, es el uso de la nanotecnología, destacando las nanoemulsiones (Athanassiou et al., 2018; Souza et al., 2022).

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación estudió la efectividad de la encapsulación de carvacrol en un sistema de nanoemulsión, con el fin de superar las limitaciones del compuesto relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, mejorar su administración y prolongar su efecto terapéutico. Se sintetizaron nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) de carvacrol con diferentes valores de HLB, empleando dos tiempos de sonicación, para estudiar el efecto de estos parámetros sobre las propiedades, la estabilidad y la actividad de las

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

formulaciones. Esto con el objetivo de desarrollar un bioproducto y evaluar su efectividad por medio de ensayos *in vivo* en condiciones de laboratorio, planteando una alternativa de acaricida tópico para el control de la infestación de garrapatas en el ganado bovino.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en modalidad de póster en el VI Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular, C2B2, realizado del 19 al 21 de noviembre de 2025 en la Universidad Pontificia Bolivariana, en la ciudad de Medellín, Antioquia.

### 1. Marco referencial y antecedentes

#### 1.1 *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Las garrapatas *R. microplus* pertenecen a la familia Ixodidae y son conocidas como “garrapatas duras” por la presencia de un escudo dorsal fuertemente quitinizado. Esta estructura cubre parcialmente el dorso en las hembras y completamente en los machos; por esta razón, las hembras tienen la capacidad de incrementar considerablemente su tamaño durante la alimentación, lo que les permite completar su ciclo de vida parasitario (López & Betancourt, 2024).

Esta especie presenta un ciclo de vida de un solo hospedero y parasita principalmente a los bovinos, en los cuales actúa como vector de diversos patógenos que provocan enfermedades con un impacto significativo en la industria ganadera (Pérez de León et al., 2020).

##### 1.1.1 *Ciclo de vida*

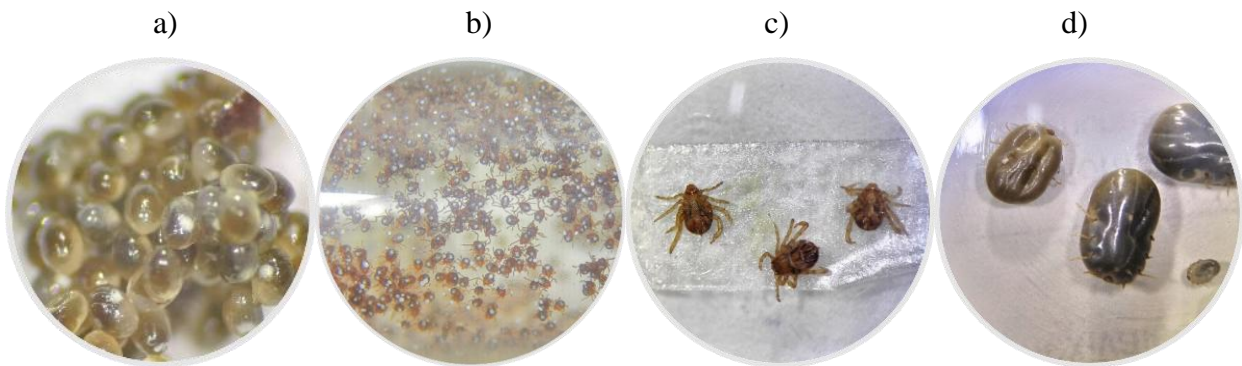
El desarrollo de las garrapatas cuenta con cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto (Figura 1). Las larvas poseen únicamente tres pares de patas, mientras que en los estadios de ninfa

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

y adulto presentan cuatro pares de patas. En el primer par de patas se localiza su principal órgano quimiorreceptor, conocido como el órgano de Haller (Anderson & Magnarelli, 2008).

### Figura 1

*Garrapata R. microplus en diferentes estadios: (a) huevo, b) larva, c) adulta sin alimentar y d) adulta ingurgitada o completamente alimentada.*



El ciclo de vida de *R. microplus* se divide en dos fases: parasitaria y no parasitaria. Los estadios no parasíticos corresponden al huevo y a la larva no alimentada, mientras que las etapas parasitarias incluyen la larva fijada al hospedador, la ninfa y el adulto. A continuación, se describe su ciclo de vida.

#### 1.1.1.1 Fase parasitaria

En esta fase, la garrapata se desarrolla sobre el hospedador, con una duración aproximada de 23 días (Nava et al., 2017). Primero, la larva se fija al hospedador, se alimenta y, tras 8 a 14 días muda a ninfa. La ninfa continúa alimentándose y muda a adulto entre los días 13 y 21. En el estadio adulto sucede la diferenciación sexual y el apareamiento, inducido por las feromonas emitidas por la hembra (Sonenshine et al., 2002).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Después del apareamiento, la hembra se alimenta hasta llenarse completamente y luego se desprende del hospedador; esta etapa dura en promedio de 7 a 12 días. En cambio, el macho se alimenta de forma intermitente y puede permanecer varios meses sobre el bovino, copulando con múltiples hembras (Polanco Echeverry & Ríos Osorio, 2016).

### **1.1.1.2 Fase no parasitaria**

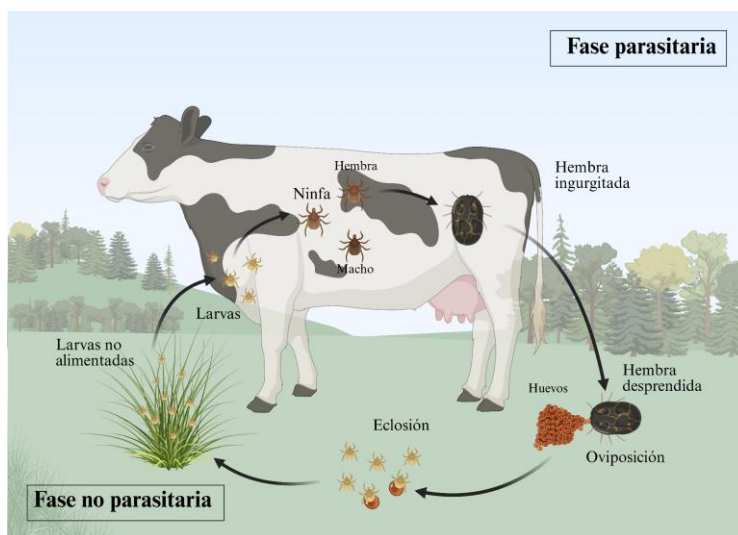
Las hembras ingurgitadas (teleoginas) caen del hospedador al suelo y buscan lugares húmedos, cálidos y protegidos de la luz solar para llevar a cabo la oviposición, la cual tiene una duración de 8 a 9 días aproximadamente, pero en climas fríos puede prolongarse. Una hembra de *R. microplus* deposita entre 2500 y 5000 huevos en una sola postura. Al finalizar este proceso, la hembra muere (Senbill et al., 2018). Posteriormente, bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad, la incubación de los huevos dura de 22 a 31 días y la eclosión puede alcanzar tasas superiores al 80% (Bandaranayaka et al., 2021; Cossio-Bayugar et al., 2023).

Pasados de 5 a 14 días desde la eclosión, las larvas suben a las partes altas de las plantas y detectan al hospedador mediante el órgano sensorial de Haller que es estimulado por olores, dióxido de carbono, humedad, calor y luz. Luego, se adhieren a su hospedero utilizando los quelíceros (estructuras bucales) y mediante el hipostoma se fijan en su piel, iniciando así la fase parasitaria, en donde las garrapatas se alimentan de fluidos tisulares y sangre para completar su desarrollo (Anderson & Magnarelli, 2008).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

### Figura 2

*Ciclo de vida y estadios de las garrapatas R. microplus.*



**Nota.** Imagen adaptada del *Ciclo de vida de las garrapatas de un solo hospedador* de Polanco Echeverry & Ríos Osorio, (2016), *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95. Creado en BioRender.com

La supervivencia de las garrapatas depende de factores climáticos del lugar como la temperatura, la humedad y la vegetación, estas determinan tanto la facilidad para encontrar un hospedero como el desarrollo de su ciclo de vida (Nava et al., 2017). En condiciones naturales, las garrapatas duras en estadio de larva sobreviven hasta encontrar un hospedero, permaneciendo aglomeradas en los pastos y en un estado de diapausa durante largos periodos de tiempo (Sonenshine et al., 2002). En un estudio realizado en los Llanos Orientales de Colombia, se reportó que la supervivencia de las larvas de *R. microplus* dura entre 52 y 174 días (sin alimentarse), lo que les proporciona un intervalo de tiempo de dos a seis meses para encontrar hospedador e infestarlo (Polanco Echeverry & Ríos Osorio, 2016).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

### *1.1.2 Distribución geográfica*

La especie *R. microplus* es originaria del continente asiático, específicamente del subcontinente indio. No obstante, debido a la globalización y al comercio de ganado, se ha expandido ampliamente en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Actualmente, está presente en América Latina, en varios países de América Central y Norte América como México, en el Caribe y en algunas regiones de Asia, África y Australia (Burrow et al., 2019; Estrada-Peña et al., 2006).

La longevidad, alto potencial reproductivo y exoesqueleto les confiere a las garrapatas su capacidad de propagación y adaptación a diversos ambientes (Hurtado & Giraldo-Ríos, 2018; Sonenshine et al., 2002). La distribución geográfica de esta especie se explica por la presencia de hospederos y la disponibilidad de hábitats con condiciones ambientales favorables en cuanto a humedad relativa, temperatura y altitud (Rocha et al., 2019).

En Colombia, se han registrado garrapatas de diferentes géneros en la mayoría de los departamentos y en diversos hospederos; sin embargo, *R. microplus* es la especie predominante en el territorio, afectando de manera predominante al ganado bovino y reportándose en 28 de los 32 departamentos del país (Acevedo-Gutiérrez et al., 2020). Esta especie se distribuye desde el nivel del mar hasta altitudes por encima de los 2600 metros sobre el nivel del mar. Esta expansión podría estar relacionada con el cambio climático, que ha favorecido su migración hacia zonas más altas, donde antes no tenían tanta incidencia (Rodríguez et al., 2024; Vecino et al., 2010).

### **1.2 Afectaciones económicas en la ganadería causadas por *R. microplus***

Las garrapatas afectan al 80% de la población bovina del mundo, siendo los principales transmisores de patógenos que causan enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis (de Castro, 1997). Además, generan afectaciones directas e indirectas en el ganado, tales como la anemia, la disminución en la ganancia de peso, daños en la piel a causa de heridas locales, inapetencia, retardo en el desarrollo y la reducción de la producción de leche y de la calidad de la carne destinada para el consumo (Jonsson, 2006; Singh et al., 2022). Por consiguiente, la infestación de garrapatas tiene un fuerte impacto económico en la producción ganadera, ya que aumenta los costos relacionados con su control y tratamiento, y amenaza la seguridad alimentaria (Jongejan & Uilenberg, 2004). En 1996, se estimó que las pérdidas anuales en la industria ganadera a causa de las garrapatas en el mundo oscilaban entre los \$13.900 y \$18.700 millones de dólares; actualmente, estas cifras podrían estar entre \$20.000 y \$30.000 millones de dólares (Lew-Tabor & Rodríguez Valle, 2016). En Colombia, solo en el año 2017, estas pérdidas alcanzaron aproximadamente los \$168 millones de dólares; hasta el momento no se encuentran reportes más recientes (Hurtado & Giraldo-Ríos, 2018).

#### **1.2.1 Enfermedades transmitidas por *R. microplus***

La anaplasmosis y la babesiosis son enfermedades de gran relevancia clínica y económica en la industria pecuaria a nivel mundial, debido al impacto negativo que generan en la salud y productividad del ganado (Ghosh & Nagar, 2014). Ambas suelen presentarse en las mismas zonas geográficas, diferenciándose en que la babesiosis produce hemoglobinuria (sangre en la orina). Estas afecciones son causadas por patógenos transmitidos a través de la saliva de las garrapatas *R. microplus* durante su alimentación en los bovinos. La transmisión ocurre de animal a animal, ya

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

que los parásitos ingeridos por la garrapata al alimentarse de bovinos infectados se multiplican en el intestino de las larvas y luego migran a los ovarios, incorporándose en los huevos en un proceso conocido como transmisión transovárica. En el hospedador, estos agentes atacan y destruyen progresivamente los eritrocitos, comprometiendo así la función hematológica del animal. Por ello, el control de estas enfermedades se enfoca en el control vectorial, una estrategia directa y efectiva que interrumpe el ciclo de transmisión y reduce la propagación (Ferreira et al., 2022; Jabbar et al., 2015; Jonsson et al., 2008).

La anaplasmosis es causada por la rickettsia *Anaplasma marginale*, una bacteria intracelular, cuyo ciclo de vida transcurre parcialmente en el artrópodo vector (Kocan et al., 2010). Esta infección genera síntomas como fiebre, anemia severa, ataxia, ictericia, anorexia, letargia, deshidratación, reducción en la producción de leche y, en casos avanzados, hipoglucemia, abortos en vacas gestantes, afectaciones cardíacas y hepáticas, e incluso la muerte del animal (Spare et al., 2020; Underwood et al., 2015). Por su parte, la babesiosis es una enfermedad hemoparasitaria causada por protozoos del género *Babesia*, principalmente *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (de la Fuente et al., 2017). Se caracteriza por fiebre alta, anemia, anorexia, hemoglobinuria, ictericia, disnea, taquicardia, abortos, y en los casos graves, convulsiones y muerte (Bock et al., 2004; Martínez-Mercado et al., 2019).

### **1.3 Métodos para el control de la infestación de *R. microplus***

Actualmente, existen diversos métodos para el control de garrapatas en el ganado bovino. El control químico ha sido el método más utilizado durante mucho tiempo; sin embargo, su efectividad ha disminuido progresivamente debido al desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas a los acaricidas. Ante esta problemática, se han implementado estrategias de control,

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

tanto alternativas como convencionales. Entre ellas se encuentran la rotación de praderas de alimentación para interrumpir el ciclo de vida de las garrapatas y el uso de pasturas antigarrapatas con propiedades repelentes. También se aplican la rotación y mezcla de productos, la extracción manual de garrapatas, la selección de razas bovinas naturalmente resistentes a las plagas, y el control biológico, que incluye la aplicación de vacunas (Tick Gard®, Gavac™, Bovimune Ixovac®, Tick Vack® y Go-Tick®) y la introducción de enemigos naturales como los hongos entomopatógenos, para controlar la población de garrapatas (Beys-da-Silva et al., 2020; Bissinger & Roe, 2010; Rodríguez-Vivas et al., 2018).

Finalmente, lo que más se recomienda es la implementación de un sistema de control integrado, que combine los métodos anteriormente mencionados. Esta estrategia busca mantener las poblaciones de garrapatas en niveles bajos y sostenibles; sin embargo, su aplicación incrementa los costos de producción de ganado por la compra de insumos, además de que son prácticas muy laboriosas (Lagunes-Quintanilla et al., 2024).

### **1.4 Acaricidas químicos**

El control químico consiste en la aplicación de acaricidas comerciales que tienen como principio activo compuestos químicos capaces de interrumpir el ciclo de vida de las garrapatas (Araque et al., 2014). Los primeros productos utilizados fueron los derivados del arsénico; sin embargo, luego de casi 40 años de uso, fueron retirados del mercado debido al desarrollo de resistencia en las poblaciones de garrapatas y a su alta toxicidad (Agwunobi et al., 2021).

Posteriormente, surgieron los organoclorados como el dicloro difenil tricloroetano (DTT), pero también fueron discontinuados por la aparición de resistencia, su acumulación en los tejidos

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

grasos de los animales, el riesgo de intoxicación y su persistencia en el ambiente (Jayaraj et al., 2016). En reemplazo de estos aparecieron los organofosforados, carbamatos, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, los fenilpirazoles y reguladores de crecimiento como el fluazurón, que inhiben la formación de la quitina. Estos compuestos constituyen los principales grupos acaricidas utilizados actualmente (Abbas et al., 2014). No obstante, el uso continuo de este método tiene múltiples efectos adversos en la industria ganadera, como la disminución de la eficacia a causa de una alta carga de garrapatas (Felippelli et al., 2022) y el desarrollo de resistencia tanto a los compuestos individuales como a sus combinaciones (Githaka et al., 2022).

En el mercado, los productos más comunes tienen como principio activo la ivermectina, el amitraz, la cipermetrina, el fipronil y el etión (Villar et al., 2016; Yaima Yate & Díaz Rivera, 2022). A pesar de esta gran variedad, actualmente ya se han reportado múltiples casos de poblaciones de la especie *R. microplus* resistentes a todas estas clases de acaricidas químicos en diferentes partes del mundo (Dzemo et al., 2022; Gupta et al., 2021). También se comercializan formulaciones que mezclan varios ixodicidas para potenciar su actividad contra las garrapatas; no obstante, esta práctica representa un mayor riesgo para el desarrollo de cepas resistentes (Rodríguez-Vivas et al., 2014b). Por otra parte, se han reportado que algunos de estos acaricidas generan residuos que se acumulan en los tejidos de los animales, afectando la comercialización de la carne, leche y otros subproductos de origen bovino (Welsh et al., 2019).

Se ha informado que la resistencia de este parásito a los acaricidas convencionales está determinada por factores intrínsecos de la garrapata (genética, ecología, fisiología y generación) y operativos, como la clase de compuesto activo, frecuencia, concentración y método de aplicación (Abbas et al., 2014).

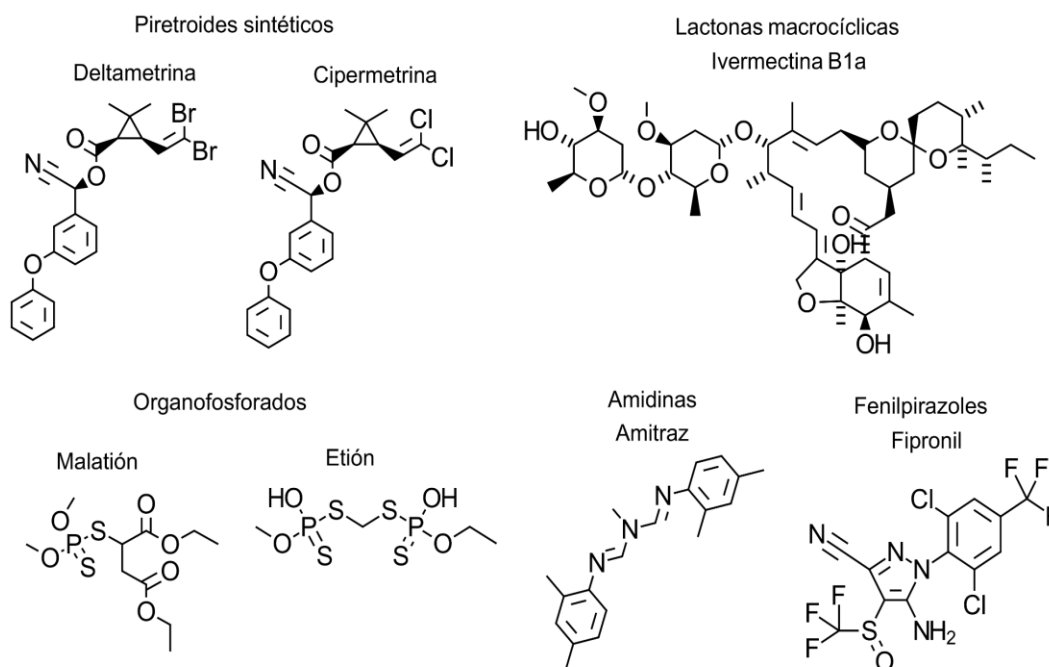
# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## 1.4.1 Acaricidas químicos convencionales y su mecanismo de acción

A continuación, se describen los principales grupos químicos de los acaricidas disponibles en el mercado y se presentan algunos ejemplos en la Figura 3.

**Figura 3**

*Clases de compuestos presentes en acaricidas químicos.*



**Nota.** Imagen creada con ChemDoodle

En el primer grupo están los piretroides sintéticos, que son derivados estructurales de las piretrinas naturales y constituyen uno de los grupos más utilizados a nivel mundial para el control de plagas. Tienen niveles bajos de toxicidad para los mamíferos y son muy estables químicamente. Su mecanismo de acción es neurotóxico y consiste en la inhibición de los canales de sodio de las células excitables, evitando su cierre y provocando la entrada continua de iones sodio a la neurona, causando hiperexcitación, parálisis y, finalmente, la muerte del parásito (Kumar, 2019; Soderlund, 2012). Entre los acaricidas de este grupo se encuentran la deltametrina y la cipermetrina.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

En segundo lugar, están las lactonas macrocíclicas, antiparasitarios de amplio espectro que se producen de la fermentación de microorganismos que habitan en el suelo; estos compuestos tienen aspectos negativos que dependen de su formulación y aplicación, como su persistencia, toxicidad y generación de residuos que causan la muerte de varios invertebrados como los insectos benéficos del suelo (Lumaret et al., 2012). Actúan uniéndose a los receptores de glutamato para impedir el cierre de los canales de cloro, favoreciendo la entrada masiva de iones cloro y generando la hiperpolarización de la membrana, esto frena la transmisión de impulsos nerviosos y ocasiona parálisis flácida y la muerte (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

En tercer lugar, están los organofosforados que inactivan la acetilcolinesterasa (AChE), generando la acumulación de acetilcolina en la sinapsis, por lo que altera la transmisión de señales neuronales, terminando en parálisis y muerte (Agwunobi et al., 2021). Estas moléculas no persisten en el ambiente, pero son inestables químicamente y tóxicas para organismos de los ecosistemas cercanos a los sitios de aplicación, como abejas (polinizadores), aves y peces (especies acuáticas) (Terry, 2012). En humanos, la exposición a estos compuestos puede provocar alteraciones respiratorias, metabólicas y neurológicas, por lo tanto, son nocivos para la salud (Johnson et al., 2010). Entre los más utilizados se encuentran el malatión, etión y clorpirifos.

En el cuarto lugar se tienen las amidinas, como el amitraz, el cual actúa sobre los receptores de octopamina, un neuroregulador presente en los invertebrados, provocando sobreestimulación de las sinapsis octopaminérgicas y causando convulsiones, anorexia, desprendimiento e interrupción de la reproducción (Rodríguez-Vivas et al., 2014a). Este compuesto como ingrediente activo en las formulaciones es inestable en los tanques de inmersión, por lo que es necesario agregar hidróxido de calcio para aumentar y mantener el pH (George et al., 2004).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Por último, está el fipronil, un acaricida del grupo de los fenilpirazoles, bloquea la neurotransmisión de señales del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso central (SNC). Es ampliamente utilizado para el control de plagas en la agricultura y ganadería; puede ser tóxico para organismos no objetivo, tiene características persistentes en el ambiente y se han reportado residuos en muchas muestras biológicas y ambientales, como agua, suelo, alimentos y productos derivados de animales (Singh et al., 2021).

### **1.5 Compuestos de origen natural como método alternativo para el control de garrapatas**

Los compuestos de origen natural representan una alternativa prometedora a los acaricidas químicos convencionales (Benelli & Pavela, 2018). Una de sus principales formas son los aceites esenciales, que son mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles, liposolubles y olorosos; en las plantas se encargan de atraer polinizadores y dispersores de semillas, que a su vez la protegen de parásitos, patógenos y depredadores (Gonzaga et al., 2023).

Algunos de los productos comerciales de origen natural que han sido probados contra garrapatas *R. microplus* son NootkaShield, Stop the Bites y BioUD. NootkaShield™ (Evolva) contiene nootkatona, un compuesto orgánico natural derivado de diversas plantas. Stop the Bites es una mezcla patentada que incluye 19% de aceites esenciales de limoncillo, cedro, ricino y maíz, además de geraniol, 1% de lauril sulfato de sodio (tensoactivo aniónico) y 80% de ingredientes inertes, su aplicación se realiza mediante pulverización en exteriores. Por último, BioUD® es un repelente formulado con 7.75% de 2-undecanona, un compuesto orgánico derivado de *Lycopersicon hirsutum*. Estos productos fueron evaluados por Oliva Chávez et al., (2023) mediante pruebas de inmersión larval (LIT) y ensayos de repelencia. Los resultados indicaron que los tres

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

productos generaron mortalidades significativas en bajas concentraciones (0.2, 0.02 y 0.08%, respectivamente) y demostraron fuertes propiedades repelentes.

En estudios recientes se ha evaluado la eficacia de varios extractos de plantas y aceites esenciales contra *R. microplus*, principalmente en los estadios de larva y adulta ingurgitada (Adenubi et al., 2018). Asimismo, se han identificado los metabolitos secundarios responsables de esta actividad ixodicida, demostrando su gran potencial para el control de este parásito en el ganado bovino. Entre los grupos químicos descritos se encuentran terpenos, cumarinas, ácidos, flavonoides, taninos, alcoholes, compuestos sulfurados y aldehídos, entre otros. Dentro de los principales metabolitos identificados destacan el timol, carvacrol, p-cimeno,  $\alpha$ -pineno, 1.8-cineol, geraniol, eugenol y limoneno (Quadros et al., 2020; Rosado-Aguilar et al., 2017).

Lunguinho et al., (2021) reportaron las concentraciones letales promedio de los aceites de *B. citriodora* (CL<sub>50</sub>: 3.276  $\mu$ g/mL), *C. viminalis* (CL<sub>50</sub>: 8.195  $\mu$ g/mL) y *C. dinisii* (CL<sub>50</sub>: 8.936  $\mu$ g/mL) sobre hembras ingurgitadas de *R. microplus*. Por otra parte, los aceites extraídos de las hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y ajo (*Allium sativum*) fueron evaluados mediante la prueba del paquete larval. Los resultados mostraron que tanto el aceite de orégano como el de ajo provocaron mortalidades entre el 90 y 100% en todas las concentraciones probadas, desde 1.25 hasta el 20% v/v. El timol, carvacrol y 1.8-cineol eran algunos de los compuestos principales de estos aceites esenciales (Martinez-Velazquez et al., 2011).

Incluso se han evaluado mezclas de aceites y su efecto sinérgico, como en el caso de una combinación al 10% de *Cinnamomum verum* (canela), *Cuminum cyminum* (comino) y *Pimenta dioica* (pimienta de Jamaica) en proporciones de 66, 17 y 17%, respectivamente, la cual presentó

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

una mortalidad del 100% en larvas y adultas de *R. microplus*. En el mismo estudio se prepararon emulsiones incorporando dicha mezcla con 2 y 5% de tensoactivos (Tween 20 o Tween 80), que permanecieron estables y conservaron su eficacia (Lazcano Díaz et al., 2019).

Con base en lo anterior, cabe señalar que los aceites esenciales presentan variaciones en su composición, pueden contener entre 20 y 60 componentes diferentes en concentraciones variables, sin embargo, en muchos casos, las propiedades biológicas como la actividad acaricida están determinadas por los componentes que se encuentran en mayor proporción (Salman et al., 2020). Esta variabilidad representa una limitación para su aplicación en formulaciones comerciales, ya que dificulta los controles de calidad y la obtención de las materias primas a gran escala. Por esta razón, se ha optado por trabajar con los metabolitos secundarios aislados (Gonzaga et al., 2023). Compuestos como el carvacrol, eugenol, citral y timol han mostrado fuertes propiedades acaricidas (Quadros et al., 2020).

En el estudio previo realizado por Alfonso (2024) en la Universidad Industrial de Santander, se validó mediante ensayos *in vivo* la actividad acaricida del carvacrol, eugenol y citral, los cuales mostraron porcentajes de mortalidad elevados en larvas de *R. microplus*, tanto en pruebas de contacto como de inmersión desde las primeras 24 horas de exposición. Entre estos compuestos evaluados, el carvacrol fue catalogado como promisorio en ambas pruebas.

### **1.6 El carvacrol y su actividad acaricida**

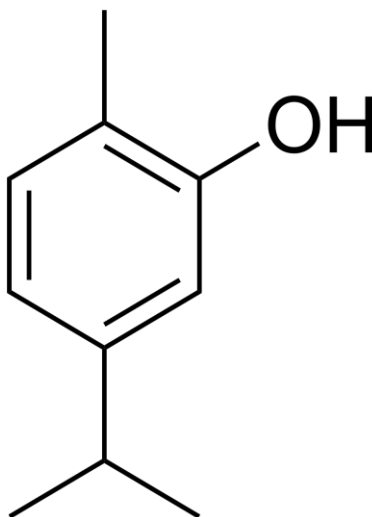
El carvacrol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) es un fenol monoterpenoide, insoluble en agua y altamente volátil, su estructura química se muestra en la Figura 4. Este compuesto tiene baja biodisponibilidad y estabilidad, lo que genera limitaciones para su uso en diferentes productos a pesar de tener una

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

amplia gama de bioactividades (Suntres et al., 2015; Wang & Wu, 2021). El carvacrol es un componente importante de los aceites esenciales de orégano, tomillo, pimienta y otras plantas aromáticas. Además, es utilizado como aditivo alimentario y se considera un compuesto seguro, ya que no causa sensibilidad cutánea ni fotoirritación y tampoco es bioacumulativo o persistente en el medio ambiente (Sharifi-Rad et al., 2018).

### Figura 4

*Estructura del carvacrol.*



#### *1.6.1 Mecanismo de acción en larvas *R. microplus**

En un estudio previo realizado en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) se evaluó la actividad del carvacrol sobre los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria y la acetilcolinesterasa (AChE) de *R. microplus*. Los resultados mostraron una inhibición significativa de varios de estos complejos y principalmente de la AChE, cuya actividad se redujo en un 27% (Cabezas, 2024). De manera similar, Lee et al., (2025) reportaron una inhibición de la AChE de hasta un 85%, lo que indica que el carvacrol interfiere con la neurotransmisión de las garrapatas *Haemaphysalis longicornis*

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

(Ixodidae), contribuyendo en su efecto acaricida. Cardoso et al., (2020) también confirmaron la capacidad inhibitoria del carvacrol sobre esta enzima, con una  $CI_{50}$  de 0.04 mg/mL para la cepa susceptible y de 0.28 mg/mL para la cepa resistente, lo que produce una acumulación de la acetilcolina en la sinapsis, interrumpiendo la transmisión nerviosa y produciendo la muerte de larvas de *R. microplus*.

### **1.7 Formulaciones de insecticidas**

#### ***1.7.1 Formulaciones clásicas***

Los métodos tradicionales de administración de acaricidas en los bovinos consisten en tratamientos de aspersión usando un rociador manual o una carrera de aspersión, baños de inmersión y la aplicación epicutánea (pour-on) sobre zonas específicas. Por lo que, es necesario que las formulaciones se puedan diluir o suspender en agua para asegurar que se cubra toda la superficie del animal sin causar afectaciones negativas al mismo (George et al., 2004; Rodríguez-Vivas et al., 2014b).

De acuerdo con la naturaleza del ingrediente activo se desarrollan las formulaciones, los que son solubles en agua, se preparan en concentrados o polvos solubles, mientras que los que tienen baja hidrosolubilidad o son líquidos oleosos, se preparan en concentrados emulsionables, suspensiones concentradas y polvos mojables o humectables (Knowles, 2008). Karasali & Maragou, (2016) presentan los diferentes tipos de formulación de plaguicidas disponibles en el mercado, según lo informado en el “Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de los plaguicidas químicos de la FAO y de la OMS”. Entre ellos están, los concentrados (SL) y polvos solubles (SP), que se aplican como una solución del compuesto activo después de diluirlo

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

en agua. Los polvos mojables (WP) son partículas finas mezcladas con tensoactivos y rellenos que se dispersan en agua para formar una suspensión homogénea. La suspensión concentrada (SC) que contiene tensoactivos y disolventes, la cual consiste en una suspensión estable de principios activos en una fase acuosa y que se aplica luego de diluirse en agua. Por último, los concentrados emulsionables (EC) que forman una emulsión.

En general, las formulaciones más comunes se caracterizan por su facilidad de producción, transporte, almacenamiento y manipulación, además de que la mayoría permite una alta concentración de los ingredientes activos y tienen un alto efecto residual; sin embargo, son difíciles de mezclar en los tanques de inmersión, tienen baja compatibilidad con otras sustancias, son inestables y pueden ser tóxicas debido al uso de solventes derivados del petróleo, afectando negativamente el medio ambiente y los organismos del entorno (Kala et al., 2020). En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas de algunas de las formulaciones.

Independientemente del método de aplicación, la efectividad de las formulaciones clásicas de los acaricidas se ve afectada por factores operativos; por ejemplo, es necesario realizar un mantenimiento a los tanques de inmersión, ya que el tratamiento es susceptible al tipo de formulación y al grado de contaminación del mismo. Por lo tanto, se debe tener cuidado con la dosis del producto, la dilución y reposición de la solución de acaricida, la agitación del tanque (George et al., 2004) y hasta el pH de la emulsión o del agua utilizada para disolver la formulación (Nicaretta et al., 2023).

### ***1.7.2 Nuevas formulaciones***

Las nuevas formulaciones de insecticidas se basan en sistemas de liberación controlada, que consisten en la encapsulación de los compuestos activos en un vehículo o material portador.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Esta tecnología permite mejorar sus propiedades, eliminar el uso de solventes, reducir la persistencia y toxicidad ambiental y el desarrollo de resistencia gracias a las diferentes vías de administración. Además, superan las limitaciones asociadas a sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad en agua, volatilidad y estabilidad (Kala et al., 2020; Knowles, 2008; Vanegas-Estévez et al., 2024).

Las emulsiones y microemulsiones (ME) son las principales alternativas a los concentrados emulsionables, estas dispersiones coloidales se preparan a base de agua, tensoactivos, aceites y a veces disolventes orgánicos en niveles bajos (Ohkouchi & Tsuji, 2022).

Por su parte, las nanoemulsiones (NE) aunque son inestables termodinámicamente, el diámetro nanométrico de las gotas aumenta su estabilidad, y gracias a su gran área superficial mejoran la biodisponibilidad, lo que las convierte en sistemas más versátiles que otras formulaciones y se consideran más compatibles para la entrega de compuestos bioactivos como los metabolitos secundarios (Ashaolu, 2021; Wang & Wu, 2021). Otras tecnologías como las suspoemulsiones (SE), las emulsiones múltiples, la suspensión microencapsulada (CS) y los gránulos dispersables en agua (WG) tienen dificultades en cuanto a su preparación, almacenamiento y manipulación.

### **Tabla 1**

*Ventajas y desventajas de los principales tipos de formulación de insecticidas.*

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Tipos de formulación	Ventajas	Desventajas
Concentrado emulsionable (EC) <sup>d,f</sup>	No hay sedimentación ni separación, requieren de poca agitación. No son abrasivos y generan pocos residuos visibles.	Contienen solventes que emiten vapores tóxicos, inflamables y corrosivos. Facilidad de sobredosis y absorción a través de la piel.
Concentrado soluble (SL) <sup>e,h</sup>	Facilidad de formulación y no emplean solventes. No son inflamables ni tóxicos, tienen baja volatilidad.	Baja resistencia a la lluvia y sensibles a la congelación. Pueden precipitarse y ser corrosivos para algunos metales.
Polvo mojable (WP) <sup>d,f,h</sup>	Fácil transporte y almacenamiento. Menor absorción a través de la piel.	Suspensiones inestables que requieren de agitación constante. Dificultad de dosificación, alto riesgo por inhalación y abrasivos para los equipos.
Suspensión concentrada (SC) <sup>e,c</sup>	No emiten olor y no contienen componentes inflamables. Facilidad de dosificación.	Puede contener solventes tóxicos. Requiere de agitación moderada. Abrasivos, sensibles a la congelación y generan residuos.
Emulsiones <sup>a,d</sup>	Tienen baja toxicidad ambiental. Facilidad de preparación, requieren de un aporte reducido de energía.	Menor carga del compuesto activo. Termodinámicamente inestables, tienden a la formación de cremas y sedimentación. Sensibles a cambios de temperatura y salinidad.
Microemulsiones (ME) <sup>a,e</sup>	Vida útil extendida. Mayor solubilidad, compatibilidad y absorción con la mezcla en el tanque. Facilidad de preparación, requieren de un aporte reducido de energía. Sistemas termodinámicamente estables	Mayor cantidad de tensoactivos (>10%) y menor carga de compuesto activo (<30%). Pueden contener solventes tóxicos e inflamables. Sensibles a cambios de temperatura y salinidad.
Nanoemulsiones (NE) <sup>b,g</sup>	Baja cantidad de tensoactivos (<10%). Sistemas estables cinéticamente. Aumento de la absorción y se pueden incorporar a geles, cremas, espumas y aerosoles. No son tóxicas ni irritantes por naturaleza.	Requieren de un aporte de energía mecánica o química para su preparación. Sistemas inestables termodinámicamente, tienden a la coalescencia, formación de cremas y floculación.

**Nota.** <sup>a</sup>Athanassiou et al., (2018). <sup>b</sup>Bahuguna et al., (2020). <sup>c</sup>FAO & OMS, (2022). <sup>d</sup>Kala et al., (2020). <sup>e</sup>Knowles, (2008). <sup>f</sup>Ohkouchi & Tsuji, (2022). <sup>g</sup>Sharma et al.,(2020). <sup>h</sup>Zimdahl, (2018).

## **1.8 Nanoemulsiones**

La nanotecnología es una herramienta emergente con gran potencial gracias a sus diversas ventajas en varios campos de aplicación, permitiendo mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos (Silva et al., 2012). Las nanoemulsiones son un sistema prometedor de administración que se aplica en diversas áreas como la industria farmacéutica, la alimentaria, la cosmética (Gupta et al., 2016) y más recientemente también para el control de parásitos, plagas y vectores (Pavoni et al., 2019).

Las nanoemulsiones se definen como dispersiones de dos fases no miscibles, tienen un tamaño de partícula entre 5 y 200 nm y contienen tres componentes principales: agua, aceite y tensioactivos. Las nanoemulsiones actúan como sistemas de protección para los componentes activos encapsulados en su interior, mejoran la solubilidad de compuestos lipofílicos en medios acuosos, permiten reducir su dosificación, optimizan la capacidad de liberación y eliminan la necesidad de solventes tóxicos para minimizar sus efectos secundarios (McClements et al., 2007; Sharma et al., 2020).

### ***1.8.1 Tensioactivos***

Los tensioactivos, surfactantes o agentes emulsionantes son compuestos anfifílicos que se absorben en la interfaz aceite-agua, para reducir la tensión interfacial entre las dos fases y que se vuelvan miscibles, para así alcanzar un tamaño de gota pequeño. Esto permite que también se establezca la nanoemulsión mediante interacciones electrostáticas repulsivas y efectos estéricos (Kulkarni & Shaw, 2016).

Los tensioactivos se clasifican en iónicos (catiónicos, aniónicos y anfóteros) que dependen del pH, y en no iónicos. Los tensioactivos no iónicos no se disocian en iones en solución acuosa y

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

son los más utilizados en las formulaciones, su estructura química está compuesta por grupos funcionales con diferente afinidad dentro de la misma molécula (Nakama, 2017).

Un tensoactivo ideal debe ser capaz de reducir lo suficiente la tensión superficial, adsorberse en la superficie de la fase dispersa, ser químicamente estable, no tóxico, efectivo en bajas concentraciones y contribuir a la formación de un potencial zeta adecuado (Silva et al., 2015).

### ***1.8.2 Equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB)***

Para facilitar la clasificación y selección de tensoactivos no iónicos en las formulaciones, se emplean los valores del equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB), un término empírico introducido por Griffin que describe las propiedades solubilizantes de estos compuestos. Este parámetro se expresa en una escala numérica, donde los valores bajos de HLB indican una alta afinidad por el aceite (lipofílico), mientras que los valores altos indican una mayor solubilidad en agua (hidrofílico) (Desimone et al., 2025). Cada tensoactivo tiene un valor de HLB definido, y cuando se combinan, el HLB de la mezcla puede calcularse utilizando la siguiente expresión (1):

$$HLB_{mezcla} = F_1HLB_1 + F_2HLB_2 \quad (1)$$

Donde F corresponde a la fracción másica y los subíndices 1 y 2 representan a los tensoactivos que conforman la mezcla.

### ***1.8.3 Tipos de nanoemulsiones***

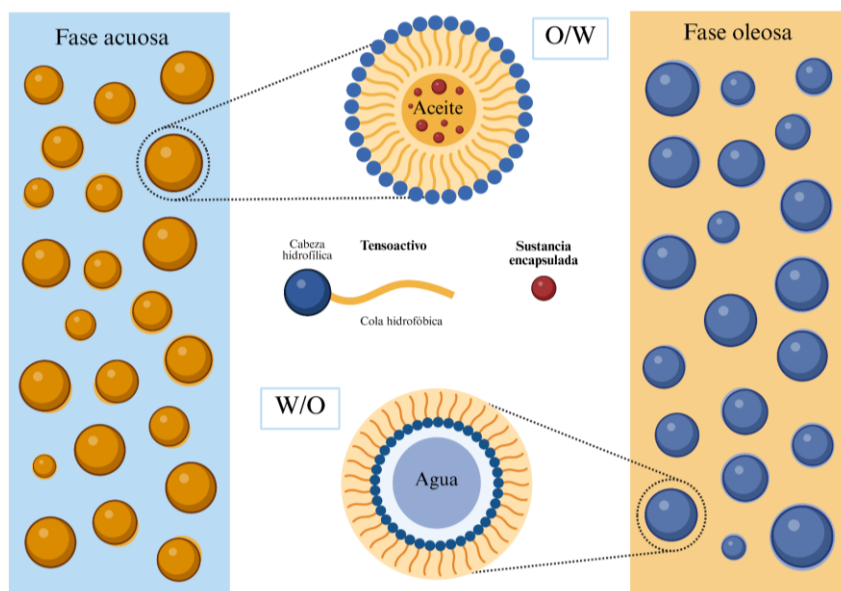
Dependiendo de la naturaleza del compuesto a encapsular, las nanoemulsiones se clasifican en dos tipos: aceite en agua (O/W), donde las gotas de aceite o de compuesto lipofílico están rodeadas por el tensoactivo y dispersas en la fase acuosa; y agua en aceite (W/O) donde las gotas

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

de agua están distribuidas a lo largo de la fase continua de aceite (Desimone et al., 2025; Singh et al., 2017).

### Figura 5

*Nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O).*



*Nota.* Imagen adaptada de *Structure of an O/W or a W/O nanoemulsión* de Singh et al., (2017), *Journal of Controlled Release*, 252, 28–49. Creado en BioRender.com

### 1.8.4 Métodos para preparar nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas que no pueden formarse espontáneamente, por lo tanto, necesitan de energía y tensoactivos para formarse. Pueden formarse mediante métodos de alta y baja energía (Solans et al., 2005).

#### 1.8.4.1 Métodos de baja energía

Los métodos de baja energía permiten la formación de nanoemulsiones aprovechando las propiedades fisicoquímicas del sistema, esto se hace modificando la composición o las condiciones

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

de preparación. Entre ellos se encuentra la emulsificación espontánea (EE), basada en la difusión espontánea de los componentes, aunque limitada por la necesidad de solventes y bajas concentraciones de fase oleosa, y la inversión de fase mediante cambios de temperatura (PIT) o composición (PIC) (Mushtaq et al., 2023).

### **1.8.4.2 Métodos de alta energía**

Los métodos de alta energía emplean fuerzas mecánicas intensas para reducir el tamaño de las gotas a través de diversas técnicas que se describen a continuación según Kumar et al., (2019). La microfluidización consiste en hacer pasar el fluido a través de un microtubo a alta presión, donde colisiona en la cámara de interacción y produce nanoemulsiones. La homogeneización a alta presión requiere de múltiples ciclos y los agitadores de alto cizallamiento difícilmente alcanzan tamaños inferiores a 300 nm. Entre estos métodos, la ultrasonificación es el proceso preferido en estudios de laboratorio, ya que es económicamente eficiente y fácil de usar. Permite obtener nanoemulsiones con diámetros pequeños y distribución uniforme de manera rápida y controlada, aunque su escalabilidad industrial puede verse limitada por la necesidad de equipos especializados. El generador ultrasónico produce energía aplicando ondas sonoras (frecuencia mayor a 20 kHz) a través de una sonda que está en contacto con la microemulsión creando intensas vibraciones que llevan a la formación y colapso de burbujas (cavitación), lo que fragmenta las gotas en tamaños nanométricos (Jafari et al., 2008).

### ***1.8.5 Caracterización de las nanoemulsiones***

#### **1.8.5.1 Tamaño e índice de polidispersidad**

La dispersión dinámica de luz es la técnica que más se utiliza para medir el tamaño de partícula de las nanoemulsiones. Esta técnica mide las fluctuaciones de intensidad de la luz

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

dispersada debido al movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas en suspensión dentro de un líquido, es causado por las colisiones entre las partículas y la velocidad de este movimiento depende del tamaño de las mismas, entre más grandes sean más lentamente se mueven (Preeti et al., 2023). Esta técnica proporciona la distribución de tamaño y el tamaño promedio  $Z$ , un parámetro hidrodinámico que se aplica a partículas en dispersión.

El índice de polidispersidad (PdI) representa la uniformidad del tamaño de las gotas dentro de una emulsión. Un valor alto de PdI sugiere que el sistema es heterogéneo, mientras que un valor bajo indica que el sistema es homogéneo y que la distribución del tamaño de las gotas es estrecha, por tanto, tienen mayor estabilidad (Danaei et al., 2018).

### **1.8.5.2 Potencial zeta**

El potencial zeta indica la carga superficial de las gotas presentes dentro de una nanoemulsión. La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad potencial de un sistema coloidal como una emulsión. Si las partículas de una nanoemulsión tienen un valor grande de potencial zeta negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí y no habrá agregación. Se dice que una suspensión es estable cuando su potencial zeta es más positivo que +30 mV y más negativo que -30 mV (Silva et al., 2012). El potencial zeta se ve afectado principalmente por el pH, ya que cualquier cambio en la acidez o alcalinidad de la emulsión afectará la carga de las partículas. Este valor también depende de la naturaleza de los surfactantes, el tamaño y la morfología de las partículas y la concentración de electrolitos (Malvern Panalytical, 2000).

### 1.9 Nanoemulsiones de carvacrol

Dada la importancia del carvacrol y el potencial de las nanoemulsiones como sistemas de encapsulación, en esta sección se presentan algunas de las nanoemulsiones de carvacrol, sus características fisicoquímicas y aplicaciones reportadas. Entre los estudios publicados, se destacan aquellas formulaciones compuestas por 3% de carvacrol, 9% de tensoactivos (Tween 80 y Span 80 en diferentes combinaciones) y 88% de agua, con una proporción de 1:3 entre el metabolito y la mezcla de tensoactivos, obtenidas mediante métodos de alta energía. Estas nanoemulsiones presentan elevada efectividad en las actividades evaluadas, tamaños inferiores a 200 nm, estabilidad y cuentan con un mayor respaldo en la literatura (Mazarei & Rafati, 2019; Motta Felício et al., 2021; Xavier et al., 2022).

Mazarei & Rafati (2019) desarrollaron una nanoemulsión optimizada de carvacrol empleando diferentes proporciones de tensoactivos no iónicos. A diferencia de otros estudios de nanoemulsiones, no adicionaron aceites portadores en la fase oleosa, los cuales suelen emplearse para disminuir fenómenos de inestabilidad, aunque con el tiempo pueden ser contraproducentes. Con un HLB de 10 y preparada mediante homogeneización de alta velocidad, la formulación resultante fue estable, presentó un tamaño medio de gota de 95 nm y una actividad antimicrobiana mejorada contra bacterias de alimentos.

Por su parte, Motta Felício et al., (2021) elaboraron una nanoemulsión con HLB 11 mediante ultrasonicación, la cual se mantuvo estable durante 90 días. En el primer día de preparación y al finalizar el periodo de almacenamiento, la formulación presentó tamaños promedio de 125 y 164 nm, PdI de 0.200 y 0.118, potenciales zeta de -26 y -14.6 mV y valores de pH de 5.43 y 5.52, respectivamente. Además, exhibió una mejor actividad antimicrobiana.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Finalmente, Xavier et al., (2022) evaluaron una nanoemulsión de carvacrol en un modelo de ratón infectado con esquistosomiasis, observando una reducción significativa de la carga de gusanos y huevos. Esta formulación preparada por sonicación, presentó inicialmente un tamaño medio de 124 nm, que aumentó a 165 nm tras 90 días de almacenamiento; el Pdl se mantuvo por debajo de 0.3 y el potencial zeta varió entre  $-14$  y  $-26$  mV. Aun así, la nanoemulsión conservó su estabilidad sin evidencia de separación de fases durante el periodo de evaluación.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo de investigación.

### 2. Objetivos

#### 2.1 Objetivo General

Desarrollar un bioproducto con actividad ixodicida para el control de *Rhipicephalus microplus* en el ganado bovino, usando el carvacrol como principio activo.

#### 2.2 Objetivos Específicos

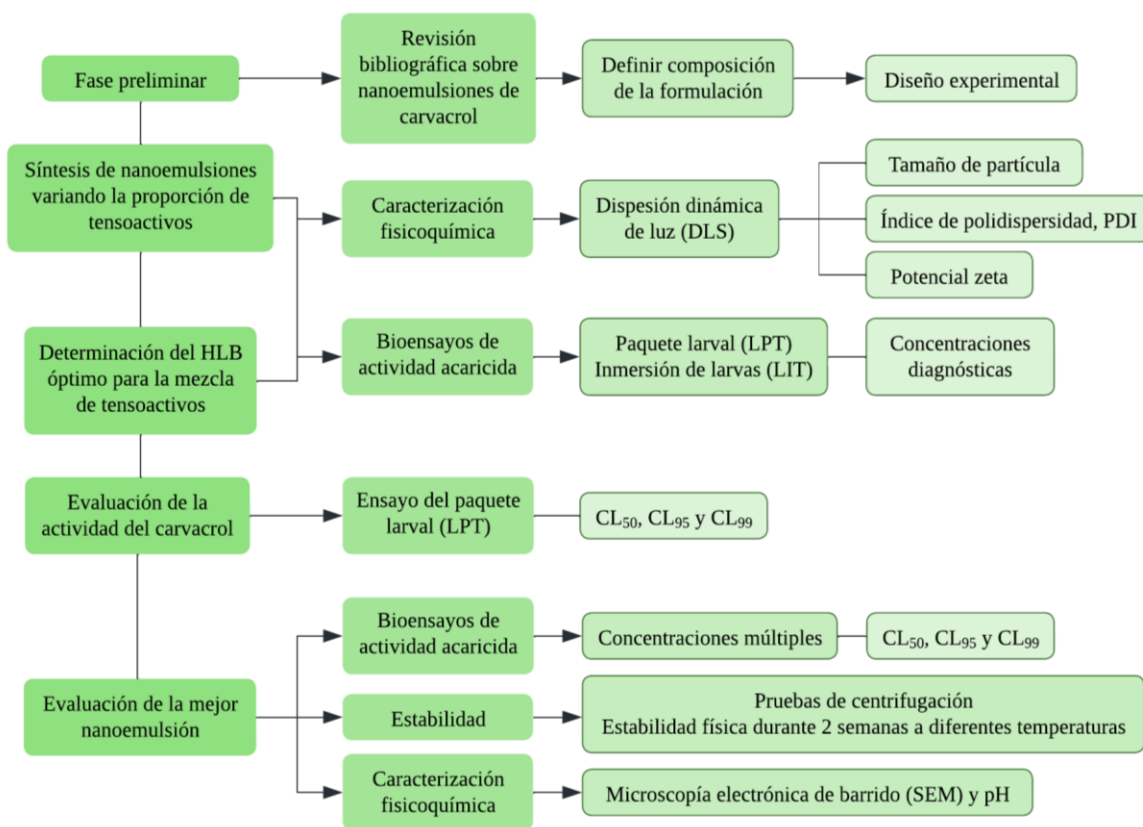
- Sintetizar nanoemulsiones con acción acaricida contra garrapatas de la especie *R. microplus* usando el carvacrol como principio activo.
- Evaluar la actividad ixodicida de las nanoemulsiones mediante pruebas de contacto y de inmersión en condiciones de laboratorio.
- Determinar la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de las mejores nanoemulsiones para obtener un bioproducto que sea de uso tópico para el ganado bovino.

### 3. Metodología

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos, se desarrolló el proceso experimental descrito en el esquema de la Figura 6 y que se describe a continuación.

**Figura 6**

*Esquema metodológico del proyecto.*



**Nota.** Esquema realizado en Lucidchart.

La investigación se dividió en cinco fases. Inicialmente se realizó una revisión en la literatura sobre la composición y los métodos de preparación de nanoemulsiones de carvacrol reportadas con diversas actividades, con el fin de establecer la proporción óptima entre los tensoactivos y el metabolito para la formulación base. En la primera fase, se sintetizaron nanoemulsiones de carvacrol utilizando diferentes proporciones de tensoactivos para determinar

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

el valor de HLB óptimo que permitiera obtener una mayor bioactividad. Se describió el aspecto visual, la caracterización fisicoquímica mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y se evaluó la actividad ixodicida de las nanoemulsiones que mostraron estabilidad el mismo día de su preparación. Posteriormente, se evaluó la actividad acaricida del carvacrol mediante la prueba del paquete larval y de inmersión larval, con el objetivo de comparar su actividad con la de las nanoemulsiones previamente preparadas. A partir de estos resultados, se seleccionó la mejor nanoformulación considerando los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y actividad ixodicida. Finalmente, se evaluó el pH, la estabilidad durante dos semanas y la eficacia de dicha formulación para el control de garrapatas *R. microplus* en condiciones de laboratorio.

### 3.1 Síntesis de nanoemulsiones de carvacrol

#### 3.2.1 Diseño experimental

En la preparación de las nanoemulsiones se empleó el carvacrol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) con una pureza del 98% adquirido de la empresa SIGMA-ALDRICH y se utilizaron los tensoactivos Tween 80 (DIBIKOS S.A.S) y Span 80 (SIGMA-ALDRICH), disponibles en el laboratorio. Se estableció como formulación base la preparación de 10 mL de nanoemulsión (volumen mínimo requerido para el proceso de sonicación). Se usó una concentración de 0.75 %p/p de carvacrol (7500 ppm), correspondiente a una solución concentrada 10 veces por encima de la CL<sub>50</sub> (Concentración letal media) previamente estimada para el metabolito puro en ensayos acaricidas con larvas de *R. microplus* (Alfonso, 2024). Y partiendo de reportes de la literatura (Mazarei & Rafati, 2019; Motta Felício et al., 2021; Xavier et al., 2022), se definió la proporción 1:3 entre el metabolito y los

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

tensoactivos, por lo tanto, la formulación contenía 2.25 %p/p de tensoactivos y 97 %p/p de agua ultrapura.

Esta formulación fue diseñada a escala de laboratorio, teniendo en cuenta que se trata de un bioproducto concentrado que, en ensayos de campo, será diluido en agua para su aplicación en bovinos mediante los métodos, ya sea de aspersión, baños de inmersión o pour-on (López & Betancourt, 2024).

La síntesis de nanoemulsiones de carvacrol se llevó a cabo considerando como variables principales el equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de los dos tensoactivos utilizados y el tiempo de sonicación. Se utilizaron los tensoactivos Tween 80 y Span 80 para tener un amplio rango de HLB (Chong et al., 2018; Hong et al., 2018). Para estudiar el efecto de estos parámetros, se establecieron las siguientes condiciones iniciales de HLB de la mezcla de tensoactivos para la preparación de 10 mL de nanoemulsión (Tabla 2):

**Tabla 2**

*Condiciones iniciales para la preparación de las nanoemulsiones de carvacrol.*

N° de la nanoemulsión	HLB	Composición	
		Tween 80 [g]	Span 80 [g]
1	15	0.225	0
2	9.65	0.113	0.113
3	4.3	0	0.225

A partir de una prueba preliminar de preparación de estas emulsiones, y utilizando las condiciones descritas en la tabla anterior, se comprobó la formación de una nanoemulsión estable.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Se establecieron experimentalmente dos tiempos de sonicación: uno mínimo de 3 minutos y otro de 7 minutos. También se definieron las siguientes relaciones de HLB a trabajar:

**Tabla 3**

*Relaciones de HLB para la preparación de las nanoemulsiones de carvacrol.*

N° de la nanoemulsión	HLB	Composición	
		Tween 80 [g]	Span 80 [g]
1	15	0.225	0
2	9.65	0.113	0.113
3	7	0.057	0.168
4	5	0.015	0.210
5	4.3	0	0.225

Las nanoemulsiones obtenidas fueron evaluadas mediante una caracterización fisicoquímica que consistió en la medición del tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI), el potencial zeta de las gotas y la actividad acaricida.

### **3.2.2 Nanoemulsiones de tipo aceite en agua (O/W) con HLB alto ( $\geq 7$ )**

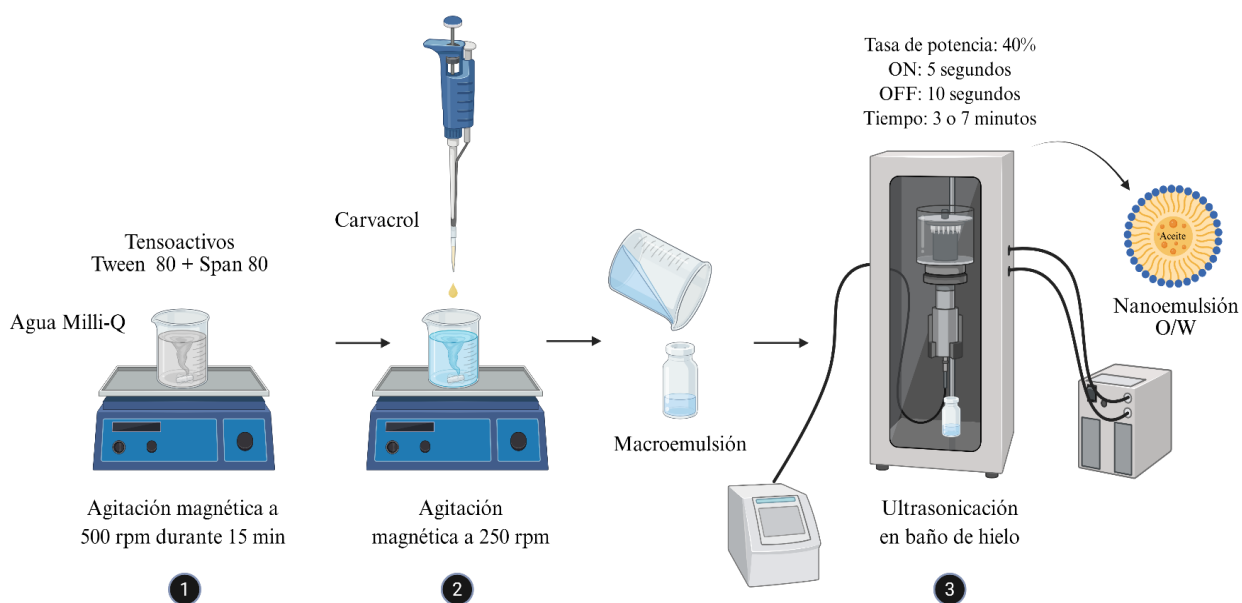
Para la síntesis de estas nanoemulsiones, la metodología que se utilizó fue adaptada de Ibrahim et al., (2022) y Mazarei & Rafati, (2019). En un vaso de precipitado se adicionó la cantidad en gramos el tensoactivo más hidrofílico (Tween 80), al agua Milli-Q bajo agitación magnética a 500 rpm. La mezcla se dejó en agitación durante 10 minutos, después se agregó la cantidad correspondiente de Span 80 y se continuó la agitación hasta lograr una completa solubilización. Luego, se añadió el carvacrol gota a gota, con intervalos de 10 minutos entre cada adición, manteniendo la mezcla en agitación magnética a 250 rpm hasta la obtención de una fase homogénea. Posteriormente, la mezcla se trasvasó a un recipiente de vidrio pequeño, que se colocó

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

en un baño de hielo y se sometió a sonicación con el ultrasonido de punta (Ultrasonic Homogenizer PULSE 150) bajo las siguientes condiciones establecidas: 40% de tasa de potencia, 5 segundos en modo ON y 10 segundos en modo OFF, durante el tiempo indicado en el diseño experimental (3 y 7 minutos), con el fin de producir la nanoemulsión.

### Figura 7

*Preparación general de nanoemulsiones de carvacrol (O/W).*



*Nota.* Imagen creada en BioRender.com

### 3.2.3 Nanoemulsiones de tipo aceite en agua (O/W) con HLB bajo ( $\leq 5$ )

Para la síntesis de las nanoemulsiones 4 y 5, primero se prepararon macroemulsiones mediante la agitación suave de la mezcla durante un tiempo suficiente para favorecer la emulsificación. Este método consistió en la adición progresiva de agua a la fase oleosa, basado en el procedimiento descrito por Forgiarini et al., (2007). Para ello, se pesó la cantidad correspondiente de Span 80 en un matraz Erlenmeyer y se agregó gota a gota el carvacrol mientras se agitaba vigorosamente con una varilla de vidrio. Posteriormente, se incorporó gota a gota, la

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

mitad del volumen total de agua Milli-Q a esta fase oleosa, previamente mezclada con la cantidad específica de Tween 80 y se agitó manualmente. Luego, se introdujo una barra de agitación magnética, se añadió el volumen restante de agua y se continuó la agitación a 250 rpm durante un periodo de mínimo 12 horas. Durante este tiempo, la boca del matraz se cubrió con Parafilm y papel aluminio para evitar la evaporación del metabolito. Transcurrido este tiempo, la mezcla fue transferida a un recipiente de vidrio, colocada en un baño de hielo y sometida a sonicación bajo las condiciones previamente descritas.

### **3.3 Descripción física**

Las formulaciones preparadas se evaluaron visualmente mediante la descripción de su aspecto físico teniendo en cuenta su coloración, transparencia, fluidez y presencia de señales de inestabilidad como sedimentación, cremosidad y separación de fases, durante tres días mientras se realizaban los ensayos acaricidas (Duarte et al., 2024).

### **3.4 Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones**

#### ***3.4.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)***

Se prepararon diluciones 1:100, 1:500 y 1:1000 para la medición de las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones de carvacrol. Además, para la configuración del equipo se utilizaron como referencia los parámetros de la nanoemulsión con HLB 9.65, dado que representa el valor intermedio entre las formulaciones evaluadas y permite obtener una aproximación representativa de las propiedades ópticas. Por lo tanto, se determinó su índice de refracción con un refractómetro Abbe y se midió su absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-Vis

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

(Spectroquant ® Pharo 300 MERCK) a una longitud de onda de 632 nm, correspondiente a la longitud de onda del láser del equipo (Malvern Instruments, 2013).

Todas las mediciones de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta se realizaron el mismo día de la preparación de la nanoemulsión en el equipo Zetasizer Nano ZS90 modelo ZEN3690. Se procesaron utilizando el software Malvern Zetasizer Nano versión 7.11 y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de mínimo 4 réplicas.

### **3.4.1.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad**

Para estas mediciones, se depositó 1 mL de la solución de la nanoemulsión en una celda de vidrio de cuatro caras transparentes. Se hicieron un total de seis mediciones a temperatura constante (25 °C) con un ángulo de dispersión de 90°.

### **3.4.1.2 Potencial zeta**

Se realizaron seis mediciones del potencial zeta a temperatura constante (25 °C). Para esto, se depositarán 0.7 mL de la solución en una celda capilar plegada DTS1070, que cuenta con dos electrodos para determinar la movilidad electroforética de las partículas.

## **3.5 Caracterización de la nanoemulsión más prometedora**

### ***3.5.1 Estabilidad de la nanoemulsión***

La nanoformulación más prometedora fue aquella que presentó un menor tamaño promedio de gotas, bajo índice de polidispersidad, un valor absoluto alto de potencial zeta, mayor estabilidad aparente y mejor actividad acaricida. Para el monitoreo de su estabilidad, se evaluó a temperatura ambiente ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) y bajo refrigeración ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (Zanela da Silva Marques et al., 2018). Se tomaron alícuotas de la nanoemulsión en Eppendorfs de 200  $\mu\text{L}$ , los cuales se sellaron con

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

parafina, se cubrieron con papel aluminio y se almacenaron a temperatura ambiente y en refrigeración por un período de dos semanas. La evaluación de la estabilidad se realizó en los días 7 y 14, esto con el fin de observar los efectos sobre la estabilidad en condiciones de temperatura variables.

### ***3.5.2 Prueba de centrifugación***

Cuando una nanoemulsión con baja estabilidad se somete a la centrifugación, aumentan los movimientos brownianos incrementando la probabilidad de colisión entre las partículas dispersas. Las colisiones promueven la coalescencia que lleva a la separación de fases de la formulación, para prevenir esto se deben proporcionar fuerzas repulsivas (superposición estérica, hidratación y fluctuaciones térmicas) eligiendo adecuados tensoactivos (Silva et al., 2015).

Para medir la estabilidad de la nanoemulsión, se colocó 1 mL de la nanoemulsión en tubos eppendorf de 2 mL y se registró la altura inicial de la muestra utilizando una regla. Posteriormente, las alícuotas se sometieron a dos ciclos de centrifugación a 25°C, el primero a 3500 rpm durante 20 minutos y el segundo a 5000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga SL 8R (Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado. Al finalizar, se evaluó la presencia de fenómenos de inestabilidad como sedimentación, separación de fases o formación de crema (Desimone et al., 2025) y se midieron las propiedades fisicoquímicas mediante DLS para realizar el análisis estadístico y detectar diferencias significativas .

### ***3.5.3 Evaluación del pH***

El pH de la formulación se determinó a temperatura ambiente utilizando un pH metro calibrado con soluciones tampón de pH 7.0 y 4.0. Se realizaron mediciones directas por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) (Pinto et al., 2017).

### ***3.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

Las técnicas microscópicas permiten realizar el análisis de la morfología, tamaño y estructura de las gotas de una nanoemulsión. La microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) proporcionan suficiente resolución para visualizar estructuras de tamaño nanométrico (Klang et al., 2012).

Los análisis mediante microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*) se realizaron con un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) modelo QUANTA FEG 650 ubicado en el laboratorio de Microscopía de la sede Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander. Este equipo está dotado con un detector de electrones secundarios (SE): Everhart Thornley detector ETD, uno de electrones retrodispersados (BSE) tipo SSD y un detector de rayos X EDAX APOLO X con una resolución de 126.1 eV.

Para la toma de imágenes, se prepararon diluciones de la nanoemulsión 1:25 y 1:250, de allí se depositó 5  $\mu$ L sobre una lámina portaobjetos de vidrio, la gota se distribuyó uniformemente hasta formar una película delgada y se dejó secar a temperatura ambiente durante mínimo 24 horas. Luego, se recubrieron con oro utilizando un recubridor rotativo con bomba (Q150R ES Plus marca Quorum). También se pasó por el equipo un fragmento de papel de filtro cualitativo tipo Whatman que fue impregnado con una dilución 1:10 de la nanoemulsión y secado durante 12 horas; se fijó con cinta adhesiva de carbono sobre el stub metálico y se recubrió con oro. Las muestras se escanearon en alto vacío con diversas ampliaciones, usando un voltaje de aceleración de 30 kV para la nanoemulsión y 15 kV para el papel.

### **3.6 Metodología para el manejo de las garrapatas**

Durante la investigación se manipularon garrapatas de la especie *R. microplus* en tres estadios de su ciclo de vida: huevo, larva y adulta ingurgitada. Este estudio contó con el aval del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI), otorgado el 9 de mayo de 2025, en el Acta N°09.

A continuación, se presenta una breve descripción del protocolo empleado para el manejo de este material biológico.

#### ***3.6.1 Colecta y limpieza de garrapatas ingurgitadas***

Las garrapatas adultas ingurgitadas se recolectaron de bovinos naturalmente infestados en fincas ganaderas ubicadas en diferentes municipios del departamento de Santander, como Betulia, Socorro, San Gil, Málaga, Molagavita, entre otros. Se inspeccionaron las zonas con mayor fijación de garrapatas y se desprendieron cuidadosamente de la piel del animal, asegurándose de no dañar su estructura corporal. Posteriormente, se depositaron en frascos de plástico limpios, que contaban con una malla de tela entre el tarro y la tapa de plástico para permitir la entrada de oxígeno y reducir el riesgo de fuga de los individuos. Luego, fueron trasladadas al laboratorio.

El protocolo de limpieza de la colonia de garrapatas *R. microplus* consistió en retirar manualmente los residuos externos, disponerlas en un recipiente sobre papel absorbente, lavarlas con agua destilada y secarlas para eliminar el exceso de humedad, evitando la proliferación de hongos en su superficie (FAO, 2004). Luego, las garrapatas se colocaron ventralmente sobre un trozo de cinta doble faz adherido a un papel filtro, dentro de una caja de Petri. Estas se almacenaron en el insectario del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) en el

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Laboratorio de Entomología Médica (LEM), donde se incubaron bajo un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura de 27-28 °C.

### ***3.6.2 Colecta e incubación de huevos de garrapatas en el laboratorio***

Una vez las hembras ovipositaron, los huevos se recogieron con una microespátula y se depositaron en tubos de ensayo de vidrio o plástico. Estos tubos mantuvieron las larvas después de la eclosión de los huevos. Los tubos fueron debidamente marcados con la fecha y el lugar de la colecta y tapados con algodones que se humedecieron diariamente con el fin de mantener la humedad relativa entre el 85 y 95 % y asegurar así su supervivencia (FAO, 2004). Estos huevos se monitorearon constantemente bajo estereoscopio para determinar la fecha de eclosión de las larvas.

### ***3.6.3 Incubación de las larvas de garrapatas en el laboratorio***

Una vez iniciado el periodo de eclosión de los huevos, se esperó a que las larvas tuvieran entre 7 y 14 días de edad para ser utilizadas en los bioensayos de actividad acaricida (Rosado-Aguilar et al., 2017). La manipulación de las larvas se realizó con ayuda de un pincel N°0 de punta suave y de color claro, con el objetivo de evitar daños en su morfología o alteración física y facilitar la visualización de los individuos.

### ***3.6.4 Protocolo para desechar garrapatas adultas y larvas***

Posterior a los ensayos, las garrapatas adultas y las larvas se depositaron en bolsas plásticas transparentes y se almacenaron en un congelador a – 70°C durante un periodo de mínimo 2 horas, para inducir su muerte sin infringir dolor y evitar posibles fugas en el laboratorio. Finalmente, se dispusieron en la bolsa roja.

### 3.7 Metodología fase *in vivo*: Ensayos de actividad acaricida en el laboratorio

La actividad ixodicida de las formulaciones se evaluó mediante ensayos con colonias de *R. microplus* en el estadio de larva de la garrapata y se utilizaron únicamente las nanoemulsiones que no presentaban separación de fases. Para esta evaluación se emplearon las pruebas del paquete larval (LPT) y de inmersión de larvas (LIT) (FAO, 2004; Rosado-Aguilar et al., 2017). Los ensayos se realizaron los días 0, 1 y 2 posteriores a la preparación de la formulación.

Para cada ensayo se realizaron cuatro réplicas por cada concentración de nanoemulsión, durante tres días diferentes. Como control negativo, se empleó una solución acuosa con una concentración total de 4500 ppm de los tensoactivos usados en la formulación evaluada y como control positivo una solución de 750 ppm de Etión, un acaricida sintético comercial que pertenece al grupo de los organofosforados, esta concentración es la recomendada en la etiqueta del producto para el tratamiento de garrapatas en bovinos.

Adicionalmente, se incorporaron controles negativos específicos para cada tipo de ensayo. En la prueba de contacto, se utilizó la acetona como control negativo y una solución de carvacrol a 750 ppm en acetona como referencia. Para la prueba de inmersión, se empleó una solución acuosa al 10% de etanol y una solución de carvacrol a 750 ppm al 10% de etanol como control negativo y de referencia, respectivamente (Alfonso, 2024). Para la preparación de las soluciones de las nanoemulsiones se utilizó agua tipo I como solvente. Las lecturas se realizaron cada 24, 48 y 72 horas, registrando el número de larvas vivas y muertas para determinar el porcentaje de mortalidad.

Se evaluaron las concentraciones diagnósticas de carvacrol (250, 750 y 1500 ppm) en las nanoemulsiones mediante ambos ensayos, con el objetivo de comparar su actividad entre ellas y frente al carvacrol puro, para determinar las formulaciones que debían ser descartadas.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

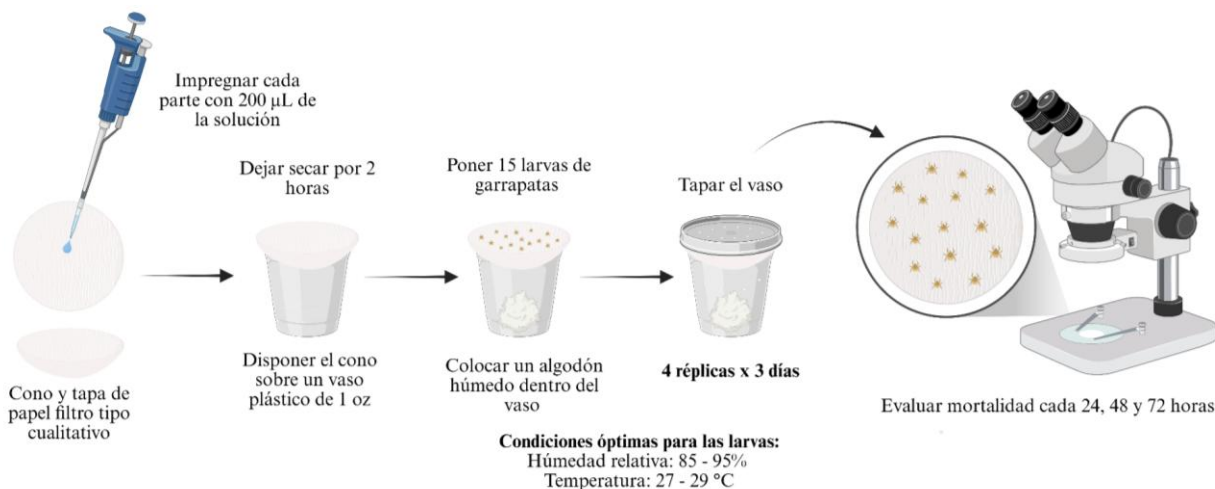
Posteriormente, se seleccionó la formulación más prometedora con base en los resultados de las propiedades fisicoquímicas y la actividad acaricida, y se evaluaron concentraciones múltiples de dicha nanoemulsión para obtener su  $CL_{50}$  tanto en contacto como en inmersión.

### ***3.7.1 Prueba del paquete larval (LPT)***

Este ensayo consiste en la exposición de las larvas a un papel de filtro impregnado con el producto a evaluar (Rosado-Aguilar et al., 2017). Para mejorar la aplicabilidad y repetibilidad del método, se realizaron algunas modificaciones a la metodología original, adaptándola a las condiciones del laboratorio (Figura 8). Cada paquete larval se elaboró usando dos círculos de papel de filtro cualitativo tipo Whatman, un vaso plástico de 1 onza perforado lateralmente que contaba con una tapa con agujeros, esto para permitir el ingreso de oxígeno, y un algodón humedecido dispuesto en el interior del vaso para mantener las condiciones adecuadas de humedad relativa. Cada círculo de papel de filtro se impregnó con 200  $\mu$ L de la solución correspondiente y se dejó secar durante 2 horas. Luego, se dispuso uno de los círculos sobre el vaso, se introdujeron 15 larvas por réplica y se cerró el vaso con su tapa. Para cada concentración evaluada, se utilizaron un total de 180 larvas. A partir de los resultados de la nanoemulsión con mejor porcentaje de mortalidad en la prueba diagnóstica, se evaluaron seis concentraciones múltiples para estimar el valor de la  $CL_{50}$ .

**Figura 8**

*Protocolo experimental para los ensayos de actividad acaricida mediante el método del paquete larval modificado.*



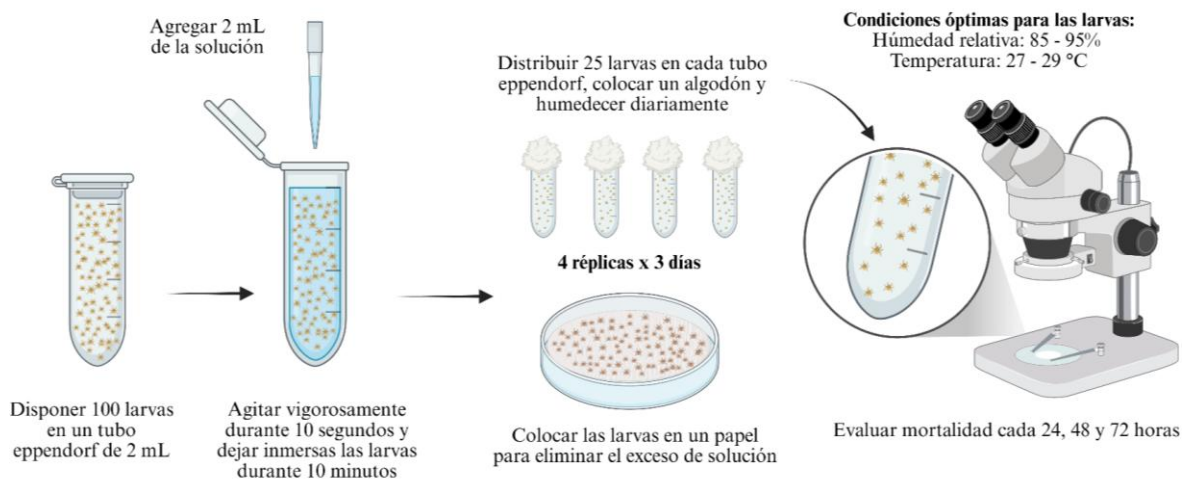
*Nota.* Imagen creada en BioRender.com

### 3.7.2 Prueba de inmersión larval (LIT)

Este ensayo también es conocido como la prueba de Shaw, se basa en sumergir directamente las larvas en la solución durante 10 minutos (Rosado-Aguilar et al., 2017), luego se transfieren 100 larvas a un cónico con un algodón humedecido como tapa. La versión modificada de la LIT utilizada en la metodología de este proyecto consistió en sumergir aproximadamente 100 larvas en viales eppendorf de 2 mL que contenían la solución, durante un periodo de 10 minutos. Terminado este tiempo se transfirieron las larvas a una caja de Petri con papel de filtro para secarlas. Luego, utilizando un pincel delgado, se distribuyeron 25 larvas por réplica, para un total de 300 individuos por cada concentración evaluada (Figura 9). A partir de los resultados de esta prueba, se evaluaron las concentraciones múltiples con la nanoemulsión con mejor porcentaje de mortalidad en la prueba diagnóstica para obtener la CL<sub>50</sub>.

**Figura 9**

*Protocolo experimental para los ensayos de actividad acaricida por el método de inmersión larval modificado.*



*Nota.* Imagen creada en BioRender.com

### 3.8 Análisis estadístico

#### 3.8.1 Análisis estadístico de la actividad acaricida de las nanoemulsiones

El porcentaje de mortalidad larval se calculó utilizando la siguiente fórmula (2):

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{número de larvas muertas}}{\text{número de larvas totales}} \times 100 \quad (2)$$

Para este análisis se utilizó el software Statistica 10.0, primero se realizaron los diagramas de dispersión de los porcentajes de mortalidad en función de las réplicas de cada concentración, con el objetivo de visualizar la distribución de los datos y detectar posibles valores atípicos o extremos. Estas gráficas mostraban la ubicación de cada conjunto de datos en relación con la media, considerando un intervalo de confianza del 95%. Los valores que se encontraron fuera de

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

esta curva se consideraron atípicos y no válidos. Se eliminaron como máximo cuatro valores de las 12 réplicas totales que se realizaron por concentración durante los tres días diferentes del ensayo.

Para cada nanoemulsión se examinó la normalidad de los resultados de mortalidad mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov, ya que el número de datos era mayor que 50 ( $n > 50$ ). En todos los casos se obtuvieron valores de  $p < 0.05$ , lo que indicó que los datos no seguían una distribución normal y que existían diferencias significativas dentro del conjunto de datos analizados. Por eso, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Krustal-Wallis y Student-Newman-Keuls, analizando los respectivos valores de  $p$ . Aquellos resultados que tuvieran un  $p < 0.05$  fueron considerados con diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente, se aplicó una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples, que permitió identificar entre qué grupos de datos estaban estas diferencias, así como su magnitud (Melo Martínez et al., 2020). En este análisis se compararon todas las concentraciones diagnósticas y múltiples con el control negativo, el control positivo (Etión) y el carvacrol.

Para el análisis de los resultados de mortalidad obtenidos a partir de las concentraciones múltiples de la mejor nanoemulsión, se utilizó el programa Polo Plus 2.0 para ajustar los datos a un modelo Probit con el fin de estimar las concentraciones letales ( $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  y  $CL_{99}$ ) y sus respectivos intervalos de confianza (Vanegas-Estévez et al., 2024) para ambas metodologías: la prueba del paquete larval y la prueba de inmersión de larvas.

### ***3.8.2 Análisis estadístico de las propiedades fisicoquímicas de la mejor nanoemulsión en las pruebas de estabilidad***

Se hizo una prueba de normalidad para cada conjunto de datos agrupados según la propiedad medida. Al cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó un análisis ANOVA junto con la prueba post-hoc de Tukey para identificar diferencias significativas entre estas propiedades en el tiempo y a diferentes temperaturas (Chong et al., 2018). Para las comparaciones entre dos grupos de datos se emplearon pruebas t de Student. Los resultados que tuviesen un valor  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Este análisis se realizó con el software Statistica 10.0.

## **4. Resultados y discusión**

En este trabajo de investigación se evaluó la efectividad de las nanoemulsiones de carvacrol como sistema de formulación para el control de la infestación de la garrapata *R. microplus* en el ganado bovino. Este proyecto da continuidad a dos estudios previos: “Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con posible acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus*” y “Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodicida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*” (Alfonso, 2024; Cabezas, 2024). En el primero, se realizó un análisis computacional (*Docking* molecular) para seleccionar moléculas con posible acción acaricida en diferentes dianas farmacológicas de interés de la garrapata *R. microplus*, evaluando posteriormente siete metabolitos mediante ensayos de laboratorio, de los cuales el carvacrol fue identificado como el más promisorio. En el segundo, se confirmó *in vitro* la actividad acaricida del carvacrol sobre la

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

acetilcolinesterasa (AChE) y el metabolismo energético mitocondrial de *R. microplus*, evidenciando que su mecanismo de acción involucra la inhibición de enzimas esenciales interfiriendo con la producción de energía y la neurotransmisión en las garrapatas.













### 4.1 Formulaciones de carvacrol

Con base en los resultados obtenidos previamente en los grupos de investigación GIBIM y CINTROP, se escogió el carvacrol como principio activo para la formulación de un ixodicida. Con este objetivo, se desarrollaron 10 formulaciones de nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) de carvacrol con diferentes valores de HLB comprendidos entre 4.3 y 15, empleando la ultrasonicación como método de emulsificación de alta energía. Se utilizaron los tensoactivos no iónicos Tween 80 y Span 80, y se aplicaron tiempos de sonicación de 3 y 7 minutos para evaluar el efecto de este parámetro sobre la estabilidad y el tamaño de partícula. De las formulaciones preparadas, nueve presentaron características propias de una nanoemulsión y permanecieron estables durante los primeros días posteriores a su preparación. En la Tabla 4 se describe el aspecto físico inicial y luego de este periodo de evaluación, evidenciando que la estabilidad inicial se relaciona principalmente con el valor de HLB y, por ende, con la proporción de tensoactivo, así como con el tiempo en que se aplica energía durante la sonicación.





# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 4**

*Descripción y estabilidad de las formulaciones preparadas de carvacrol con valores de HLB entre 4.3 y 15.*

HLB	N° NE	Aspecto físico inicial	Cambios físicos*	Estabilidad	Registro fotográfico	
					Inicial	Final
15	1a	Líquido turbio, blanco azulado	Líquido blanco lechoso	Media		
	1b	Líquido turbio, blanco azulado	Líquido blanco azulado	Media		
9.65	2a	Líquido blanco lechoso	Capa blanca viscosa en la superficie	Media		
	2b	Líquido blanco lechoso	Sin cambios visibles	Alta		
7	3a	Líquido blanco lechoso	Sin cambios visibles	Alta		
	3b	Líquido blanco lechoso	Sin cambios visibles	Alta		

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

5	4a	Líquido blanco lechoso	Sin cambios visibles	Alta	
	4b	Líquido blanco lechoso	Sin cambios visibles	Alta	
4,3	5a	Mezcla heterogénea, no se forman nanoemulsiones	Separación de fases	Baja	
	5b	Líquido blanco lechoso	Capa blanca viscosa en la superficie	Media	

**Nota.** Las letras a y b indican los tiempos de sonicación de 3 y 7 minutos respectivamente. \* Los cambios físicos se registran en un periodo mínimo de 3 días posteriores a la preparación de la formulación.

En las imágenes de la tabla anterior se observa que las formulaciones con HLB 15 (1a y 1b) que contenían solo Tween 80, presentaron inicialmente una coloración blanca azulada con aspecto turbio que se intensificó con el aumento del tiempo de sonicación. No obstante, tras el tiempo de reposo, esta coloración cambió a blanca lechosa, lo que sugiere un cambio en las propiedades de la emulsión y en su estabilidad, atribuible a la maduración de Ostwald o a la coalescencia, que se describen más adelante. La apariencia física de las nanoemulsiones puede explicarse mediante los fenómenos de dispersión: las tonalidades azuladas se asocian con la dispersión de Rayleigh debido a la presencia de gotas más pequeñas que la longitud de onda de la

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

luz, mientras que el color blanco y opaco se relacionan con la dispersión múltiple, a causa de partículas de mayor tamaño (Mason et al., 2007).

Las formulaciones con HLB 9.65 (2a y 2b) que contenían una proporción 1:1 de Tween 80 y Span 80, también experimentaron un cambio de coloración, pasando de blanca azulada a blanca lechosa; aunque este cambio no fue tan notorio. En particular, las muestras 2a y 5b presentaron, tras el tiempo de reposo, una capa blanca viscosa en la superficie, lo que indica la aparición de crema. Este fenómeno constituye un signo de inestabilidad termodinámica, asociado a los procesos de maduración de Ostwald, floculación y coalescencia, que generan un aumento en el tamaño de las gotas, que al ser menos densas que la fase continua, se elevan por flotabilidad y, en consecuencia, producen la separación de fases (Gupta et al., 2016).

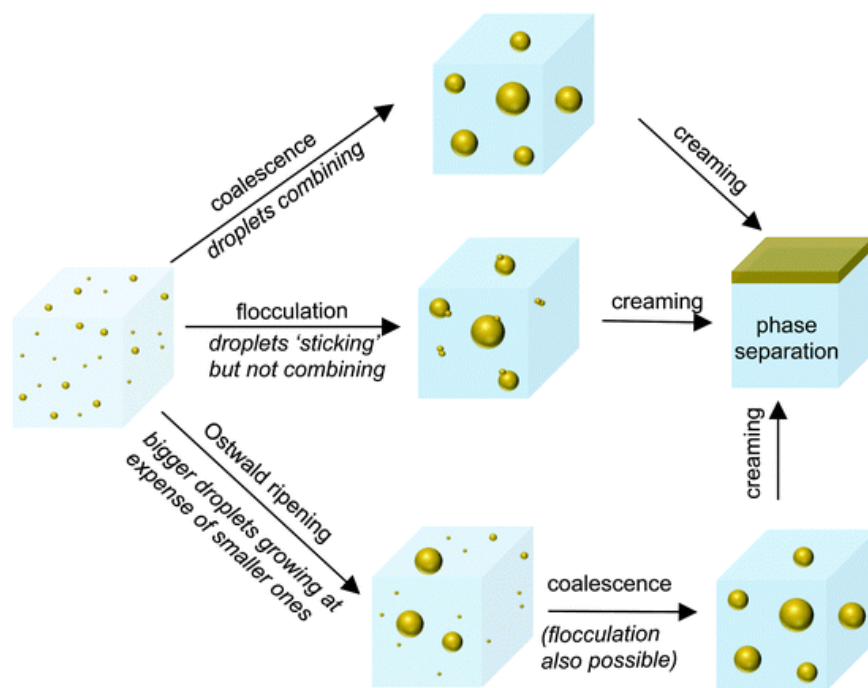
Los fenómenos de desestabilización de las nanoemulsiones han sido descritos por Gupta et al., (2016) y se ilustran en la Figura 10. Entre los principales procesos se encuentran: (i) la floculación, que hace referencia a la aglomeración de las gotas inducida por interacciones atractivas, esto forma flóculos que se comportan como una sola entidad y que, dependiendo de su densidad, pueden sedimentarse o formar una capa cremosa en la superficie; (ii) la coalescencia, que consiste en la fusión de gotas para formar gotas de mayor tamaño, lo que favorece la separación de fases; y (iii) la maduración de Ostwald, que se produce por la diferencia en el potencial químico entre gotas de distintos tamaños. En este proceso, las partículas más pequeñas tienen un mayor potencial químico o una mayor solubilidad en la fase acuosa, lo que impulsa a que se disuelvan y le transfieran masa a las gotas más grandes. Por lo tanto, las gotas más pequeñas disminuyen su tamaño y las más grandes crecen o coalescen.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Estos fenómenos se pueden controlar mediante el uso correcto de tensoactivos para obtener nanoemulsiones con cargas grandes que favorezcan la repulsión por interacciones estéricas y la estabilidad de las capas interfaciales de las gotas.

### Figura 10

*Mecanismos de desestabilización de nanoemulsiones.*



*Nota.* Imagen tomada del *Esquema de diversos mecanismos de desestabilización de nanoemulsiones* de Gupta et al., (2016), *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841.

Por otro lado, las emulsiones con HLB intermedio y bajo de 7 y 5 (3a, 3b, 4a, 4b) no evidenciaron cambios visibles en su aspecto físico, manteniendo una coloración blanca y un aspecto uniforme, mostrando una buena estabilidad durante este tiempo. Por el contrario, la formulación 5a (HLB 4.3 con 3 min de sonicación) no mostró indicios de la formación de nanoemulsión después de la homogeneización ultrasónica, presentando separación de fases y gotas

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

de carvacrol visibles en la superficie, obteniendo una mezcla heterogénea. Por esta razón, dicha formulación fue descartada para estudios posteriores.

En una prueba preliminar, se prepararon tres nanoemulsiones con HLB 15, 9.65 y 4.3 (valores alto, medio y bajo) con 3 minutos de sonicación para tener una visión general del diseño experimental. Sin embargo, para la formulación con HLB 4.3 utilizando el método inicial de preparación no se obtuvo una mezcla homogénea antes de la sonicación. Por lo tanto, se modificó la metodología: primero se mezclaron los componentes más hidrofóbicos para la fase oleosa, posteriormente se adicionó el agua de manera gradual y se mantuvo en agitación magnética durante un periodo de mínimo 12 horas para favorecer la emulsificación y luego se sonicó para obtener emulsiones de tamaño nanométrico (Sugumar et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la sonicación durante 3 minutos no fue suficiente para lograr un sistema estable, debido a que la formulación contenía solamente Span 80, un tensoactivo altamente hidrofóbico. En general, los tensoactivos con HLB inferiores a 7 son adecuados para emulsiones W/O (Forgiarini et al., 2007; Tadros et al., 2004). Una elevada proporción de Span 80 vuelve el sistema demasiado hidrofóbico, provocando que el empaquetamiento de las moléculas de tensoactivo alrededor de la interfaz sea deficiente, dificultando su capacidad para estabilizar emulsiones de aceite en agua (Leong et al., 2009).

De manera que era necesario aumentar el tiempo de aplicación o la intensidad de la fuerza externa para forzar la nanoemulsión. Lo más idóneo para mantener las condiciones de preparación era incrementar el tiempo de sonicación hasta obtener una nanoemulsión aparentemente estable, esto sucedió luego de 7 minutos. A partir de este ajuste, se establecieron dos tiempos de sonicación

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

(3 y 7 minutos) y se formularon nanoemulsiones con valores de HLB intermedios dentro de los rangos evaluados.

La inestabilidad observada en NE5a puede deberse a un desequilibrio energético que favorece la separación de fases, ya que el sistema requiere menor energía para desestabilizarse en comparación con la energía necesaria para mantener el aceite en forma de gotas pequeñas. Este fenómeno depende principalmente de la intensidad de las fuerzas aplicadas durante los métodos de alta energía y de la adecuada disposición de los tensoactivos en la superficie de las gotas (Smejkal et al., 2024).

### **4.2 Caracterización fisicoquímica de las nanoemulsiones de carvacrol**

#### ***4.2.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta***

Para la configuración del equipo Zetasizer se registró un índice de refracción de 1.338 y una absorbancia de 0.003, correspondientes a los parámetros medidos de la nanoemulsión con HLB 9.65. Los valores de diámetro promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta obtenidos para las nanoemulsiones de carvacrol preparadas se presentan en la Tabla 5.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 5**

*Diámetro promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta de las formulaciones preparadas de carvacrol con valores de HLB entre 4.3 y 15.*

HLB	N° NE	Diámetro promedio [nm]	Índice de polidispersidad (PdI)	Potencial zeta [mV]
15	1a	137.1 ± 2.8	0.153 ± 0.010	-34.2 ± 0.9
	1b	131.1 ± 6.8	0.258 ± 0.015	-29.9 ± 1.4
9.65	2a	148.5 ± 5.8	0.385 ± 0.045	-30.5 ± 1.1
	2b	121.9 ± 1.0	0.260 ± 0.006	-31.7 ± 0.6
7	3a	216.8 ± 5.8	0.260 ± 0.037	-17.6 ± 0.2
	3b	210.0 ± 1.5	0.216 ± 0.015	-19.0 ± 0.4
5	4a	208.7 ± 3.3	0.203 ± 0.016	-30.6 ± 0.8
	4b	204.9 ± 6.2	0.234 ± 0.015	-37.6 ± 0.3
4.3	5b	217.6 ± 1.8	0.209 ± 0.015	-37.9 ± 1.2

**Nota.** Las letras a y b indican los tiempos de sonicación de 3 y 7 minutos, respectivamente. Los datos se expresan como media ± desviación estándar,  $n \geq 4$ .

Los diámetros promedio variaron entre  $121.9 \pm 1.0$  nm (HLB 9.65, 2b) y  $217.6 \pm 1.8$  nm (HLB 4.3, 5b), confirmando que con esta metodología de preparación fue posible obtener emulsiones de tamaño nanométrico. Se observó que la disminución del HLB al agregar el Span 80 aumenta el tamaño de partícula, que el tiempo de sonicación de 7 minutos favorece la formación de partículas más pequeñas en cualquier proporción de los tensoactivos y que la nanoemulsión con HLB de 9.65 y 7 minutos de sonicación (NE2b) presenta el menor tamaño y una aparente estabilidad física (Tabla 5).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

El aumento del tamaño de partícula con la disminución de HLB observado en este estudio coincide con los resultados de Carpenter & Saharan (2017), quienes reportan que al incrementar el valor de HLB de 8 a 10, el tamaño de las gotas disminuye de 128.5 a 87.38 nm, pero que no se evidenció una disminución adicional al pasar de 10 a 11. Según estos autores, esto se debe a que la fuerza de empaquetamiento del Tween 80 en la interfaz alcanza su punto de saturación en un HLB de 10, y a HLB más altos, las moléculas de Tween 80 están en exceso, ocupando más sitios activos sin mejorar las propiedades de la nanoemulsión, lo que explica la ausencia de cambios pronunciados en nuestra formulación con HLB 15.

Resultados similares fueron obtenidos en un estudio donde la emulsión de petróleo más estable tenía un HLB de 9.65, empleando la misma proporción de Tween 80 y Span 80. Esto se explica porque, cuanto más cercano sea el valor de HLB del sistema al del aceite o en nuestro caso al del metabolito, mejor será la solubilización del compuesto para que las moléculas de surfactante se empaqueten más estrechamente en la interfaz aceite-agua, generando mayor repulsión entre ellas y mejores propiedades (Wang et al., 2023). Por otro lado, nuestros resultados se alinean también con Mazarei & Rafati, (2019), quienes obtuvieron una nanoemulsión estable de HLB 10, con un diámetro medio de partícula de 95 nm de carvacrol que contenía 3% p/p del aceite y 9% p/p de mezcla de surfactante (Tween 80 + Span 80).

En cuanto al índice de polidispersidad, en términos generales, los valores promedio fueron menores que 0.4, oscilando entre  $0.153 \pm 0.010$  y  $0.385 \pm 0.045$ . Los valores de PDI cercanos a 0.2 son aceptables e indican estabilidad cinética con una distribución estrecha y monodispersa (Danaei et al., 2018; Dantas et al., 2021). Por lo tanto, en este estudio se obtuvieron distribuciones de tamaño homogéneas y monomodales a sistemas moderadamente polidispersos, relacionados con las condiciones de preparación.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Todos los valores de potencial zeta fueron negativos y se situaron en un rango de  $-17.6 \pm 0.2$  a  $-37.9 \pm 1.2$  mV, sugiriendo estabilidad coloidal moderada a buena, siendo las formulaciones con HLB 15, 9.65, 5 y 4.3 las que mostraron mayor negatividad en su potencial superficial promedio; sin embargo, no se observó alguna relación de esta propiedad con el valor de HLB y con el tiempo de sonicación.

Los valores negativos de potencial zeta de las nanoemulsiones pueden atribuirse a diversos factores. En primer lugar, la adsorción de iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) en la superficie de las gotas, generados por la disociación del agua. Estos iones pueden formar enlaces de hidrógeno con las cadenas de éteres polioxietilénicos (EO) del Tween 80, favoreciendo su retención en la interfase. Adicionalmente, los grupos EO poseen un momento dipolar que contribuye a la polarización de la interfaz y refuerza la acumulación de  $\text{OH}^-$ ; este fenómeno puede intensificarse por cambios en la estructura de los tensoactivos durante la sonicación (Hsu y Nacu, 2003). En segundo lugar, la presencia de impurezas o residuos provenientes de los tensoactivos (por ejemplo, ácidos grasos libres presentes en el Tween 80) o del propio metabolito, también contribuyen a esta carga superficial. Finalmente, el proceso de sonicación puede promover la hidrólisis de los enlaces éster de los tensoactivos, liberando ácidos grasos libres que, a pH neutro, se ionizan formando carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ), aportando a la carga negativa de la interfase (Çiçek et al., 2025; Ganguly et al., 2024; Modarres-Gheisari et al., 2019; Ozogul et al., 2025).

Estos resultados de potencial zeta coinciden con lo reportado por Duarte et al., (2024), quienes mencionan que en estudios sobre nanoemulsiones que contienen terpenos, se han obtenido valores de potencial zeta en el rango de  $-20$  y  $-30$  mV. Además, al usar Tween 80 y Span 80 con monoterpenos como cimeno y mirceno, también obtuvieron valores entre  $-17$  y  $-34$  en el primer día de preparación.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Los resultados indican que tanto el HLB como el tiempo de sonicación influyen en el tamaño de partícula y en la estabilidad de las nanoemulsiones, evidenciando una tendencia a la formación de partículas más pequeñas y con mejores potenciales zetas con tiempos de sonicación más prolongados (7 min). A excepción de las nanoemulsiones de HLB 15 (1a y 1b) donde se observa un aumento de esta carga con el incremento del tiempo de sonicación. Según los estudios de Modarres-Gheisari et al., (2019) y Pratap-Singh et al., (2021) el tiempo de sonicación afecta el tamaño de partícula, a mayor tiempo menor tamaño; sin embargo, esta relación ocurre hasta cierto punto, por lo tanto, concluyen que existe un tiempo óptimo de sonicación para la preparación de nanoemulsiones en función de las condiciones y la composición del sistema.

Como señalan Yan et al., (2025), la selección de tensoactivos afecta significativamente las propiedades y la estabilidad de las emulsiones, esto comúnmente se realiza según el valor del HLB requerido. Sin embargo, elegir un solo tensoactivo no es suficiente para mejorar la capacidad de estos sistemas para administrar un compuesto bioactivo, ya que esto también depende de la solubilidad del compuesto (Kaur & Mehta, 2017). Por esta razón, el uso de proporciones óptimas de tensoactivos mejora las propiedades de la película interfacial, favoreciendo las tasas de adsorción entre las fases oleosa y acuosa, así como las propiedades interfaciales. En consecuencia, se incrementa la estabilidad de las nanoemulsiones y se minimiza la ocurrencia de fenómenos como la maduración de Ostwald y los procesos subsecuentes a este (Chong et al., 2018). Chong et al., (2018) también explica el efecto sinérgico de usar Tween 80 y Span 80 en una formulación, ya que con base en la diferencia significativa que existe entre los tamaños de los grupos cabeza de los surfactantes, es posible el empaquetamiento más eficiente de los tensoactivos en la interfaz.

Por otra parte, utilizando el software Zetasizer se obtuvieron las gráficas de distribución de tamaño de partícula por intensidad, donde el eje y corresponde a la intensidad relativa de la luz

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

dispersada, así como las de potencial zeta para cada nanoemulsión, las cuales se presentan en el Anexo 1. A continuación, se expone su análisis.

La gráfica de potencial zeta de NE1b mostró variaciones significativas en la tasa de conteo, reflejando baja estabilidad o presencia de impurezas. La NE2a (Anexo 1, NE2a) presentó agregados o partículas grandes cercanas a 1000 nm, con una distribución amplia que se extiende desde 100 hasta 1000 nm, lo que se observa en el ancho de las curvas. Esta variabilidad en la distribución explica su elevado índice de polidispersidad ( $0.385 \pm 0.045$ ), evidenciando que la muestra no es monodispersa.

En la NE2b (Anexo 1, NE2b), los datos cumplieron con los criterios de calidad; se observaron partículas con tamaños menores a 100 nm, sin embargo, se detectó un pico de baja intensidad que sugiere la presencia de partículas con diámetros cercanos a 10  $\mu\text{m}$ . De manera similar sucedió con las nanoemulsiones 3a, 3b, 4b y 5b. De igual forma, en la NE4a se evidenció la presencia de partículas menores a 100 nm. En cuanto al potencial zeta, NE3a y 5b mostraron fluctuaciones en las tasas de conteo, indicando baja estabilidad.

De acuerdo con el análisis realizado, la formulación NE2b presentó el menor tamaño promedio ( $121.9 \pm 1.0$  nm) en comparación con las demás nanoemulsiones evaluadas, con un potencial zeta de  $-31.7 \pm 0.6$  mV, lo que indica una buena estabilidad coloidal. Demostrando que la proporción óptima de estos dos tensoactivos en una nanoemulsión de carvacrol debe ser 1:1. Por el contrario, las demás formulaciones mostraron distribuciones de tamaño más heterogéneas o multimodales, lo que afecta su estabilidad física al favorecer fenómenos como la coalescencia y la floculación.

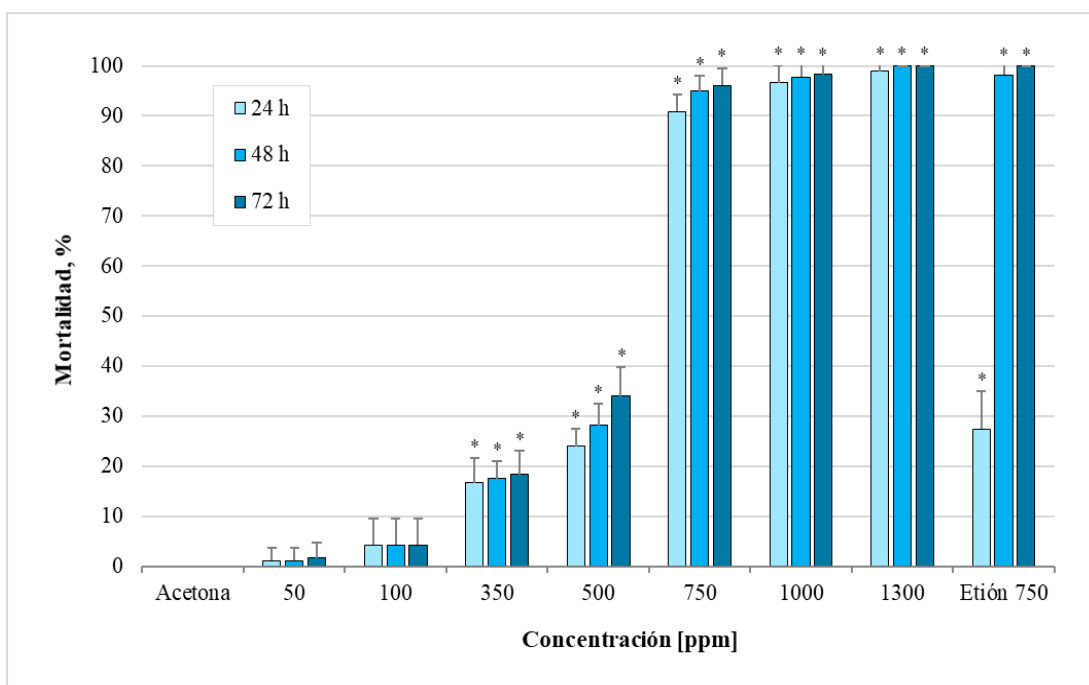
### 4.3 Fase *in vivo*: Actividad acaricida

#### 4.3.1 Actividad acaricida del carvacrol por el método del paquete larval

La actividad del carvacrol sin encapsular se evaluó mediante el ensayo del paquete larval. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en esta prueba para siete concentraciones diferentes (Figura 11).

**Figura 11**

*Resultados de mortalidad con concentraciones múltiples de carvacrol mediante el método del paquete larval.*



**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ), que consistió en el solvente (Acetona) usado en la preparación de las soluciones, expuesto también al tiempo de secado bajo las mismas condiciones.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Las concentraciones más bajas (50 - 100 ppm) registraron mortalidades inferiores al 10%, sin diferencias significativas entre los tiempos evaluados. Se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo a partir de la concentración de 350 ppm hasta la de 1300 ppm desde las primeras 24 horas de lectura y hubo un aumento progresivo de mortalidad, alcanzando valores cercanos al 35% en 500 ppm a las 72 horas. A partir de 750 ppm, la mortalidad superó el 90% desde las 24 horas de lectura. Con base en estos resultados, se realizó un análisis Probit para estimar las concentraciones letales (CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> y CL<sub>99</sub>) cuyos valores se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por el método del paquete larval.*

	Tiempo de lecturas		
	24 h	48 h	72 h
<b>CL<sub>50</sub> ppm</b>	507.1 [403.5 – 606.1]	482.6 [383.4 – 589.3]	474.0 [382.0 – 578.5]
<b>CL<sub>95</sub> ppm</b>	903.5 [739.1 – 1296.8]	796.5 [642.4 – 1230.4]	768.1 [620.8 – 1191.0]
<b>CL<sub>99</sub> ppm</b>	1147.7 [897.5 – 1880.8]	980.3 [757.5 – 1753.2]	938.1 [726.6 – 1678.3]
$\chi^2$	4.9	5.8	5.5
<b>SLOPE</b>	6.6	7.6	7.8

*Nota.* Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre corchetes.

Los valores de  $\chi^2$  (4,9 - 5,8) indican una distribución homogénea de los datos de mortalidad para las concentraciones evaluadas, lo que confirma un buen ajuste al modelo Probit. De igual manera, las pendientes (SLOPE) se encuentran dentro de un rango alto, pero aceptable, y sugieren

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

que la población tiene alta homogeneidad, respondiendo de manera similar a la concentración de carvacrol a medida que avanza el tiempo de exposición.

La actividad acaricida del carvacrol ha sido reportada en múltiples estudios mediante la prueba del paquete larval (LPT) y de inmersión larval (LIT). Novato et al., (2022) obtuvieron valores de  $CL_{50}$  que variaron entre 550 y 3210 ppm a las 24 horas en 20 poblaciones de garrapatas de *R. microplus* por el método de contacto (LPT), con una  $CL_{50}$  media de 1740 ppm. Cruz et al., (2013) reportaron una  $CL_{50}$  de 220 ppm a las 24 horas para larvas de la misma especie utilizando 3% de DMSO. En el estudio de Alfonso, (2024), la actividad del carvacrol fue evaluada obteniendo  $CL_{50}$  de 756 y 683 ppm (24 y 72 horas, respectivamente) por LPT, y 718 y 570 ppm (24 y 72 horas) por LIT.

En nuestro estudio, utilizando las mismas concentraciones y metodología de Alfonso, (2024), se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  inferiores: 507 ppm a las 24 horas y 474 ppm a las 72 horas. Las concentraciones (50 y 100 ppm) mostraron concordancia entre ambos estudios, con mortalidades menores al 10%; no obstante, se observaron diferencias notables en la concentración de 750 ppm, donde nuestro ensayo alcanzó mortalidades superiores al 90% desde las primeras 24 horas. Las diferencias observadas en estos ensayos de contacto podrían deberse a la variabilidad que existe entre las poblaciones de garrapatas *R. microplus* provenientes de diferentes lugares. Por otro lado, en el ensayo de inmersión larval, los resultados fueron similares a los reportados por Alfonso, (2024), con una mortalidad del 50 y 60% a las 48 y 72 horas para 750 ppm.

Por inmersión larval, se ha demostrado que el carvacrol tiene una excelente actividad acaricida en larvas de *R. microplus*; para cepas susceptibles a los acaricidas químicos, se reportó una  $CL_{50}$  de 1410 ppm y para cepas resistentes de 1100 ppm (Cardoso et al., 2020). En otro estudio

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

similar, para una cepa multirresistente se reporta una  $CL_{50}$  de 1760 ppm y para la cepa susceptible a acaricidas sintéticos de 1420 ppm (Tavares et al., 2022).

Los estudios mencionados anteriormente reportan valores de  $CL_{50}$  para el carvacrol por LPT que oscilan entre 220 y 3210 ppm en distintas poblaciones de *R. microplus* (Cruz et al., 2013; Novato et al., 2022), por lo que nuestras estimaciones se encuentran dentro de este rango y representan un aporte significativo, validando la actividad acaricida del metabolito para su uso en una formulación y como referencia para la comparación de su efectividad.

### ***4.3.2 Actividad acaricida de las nanoemulsiones***

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en los bioensayos acaricidas, los cuales se realizaron mediante los métodos del paquete e inmersión larval.

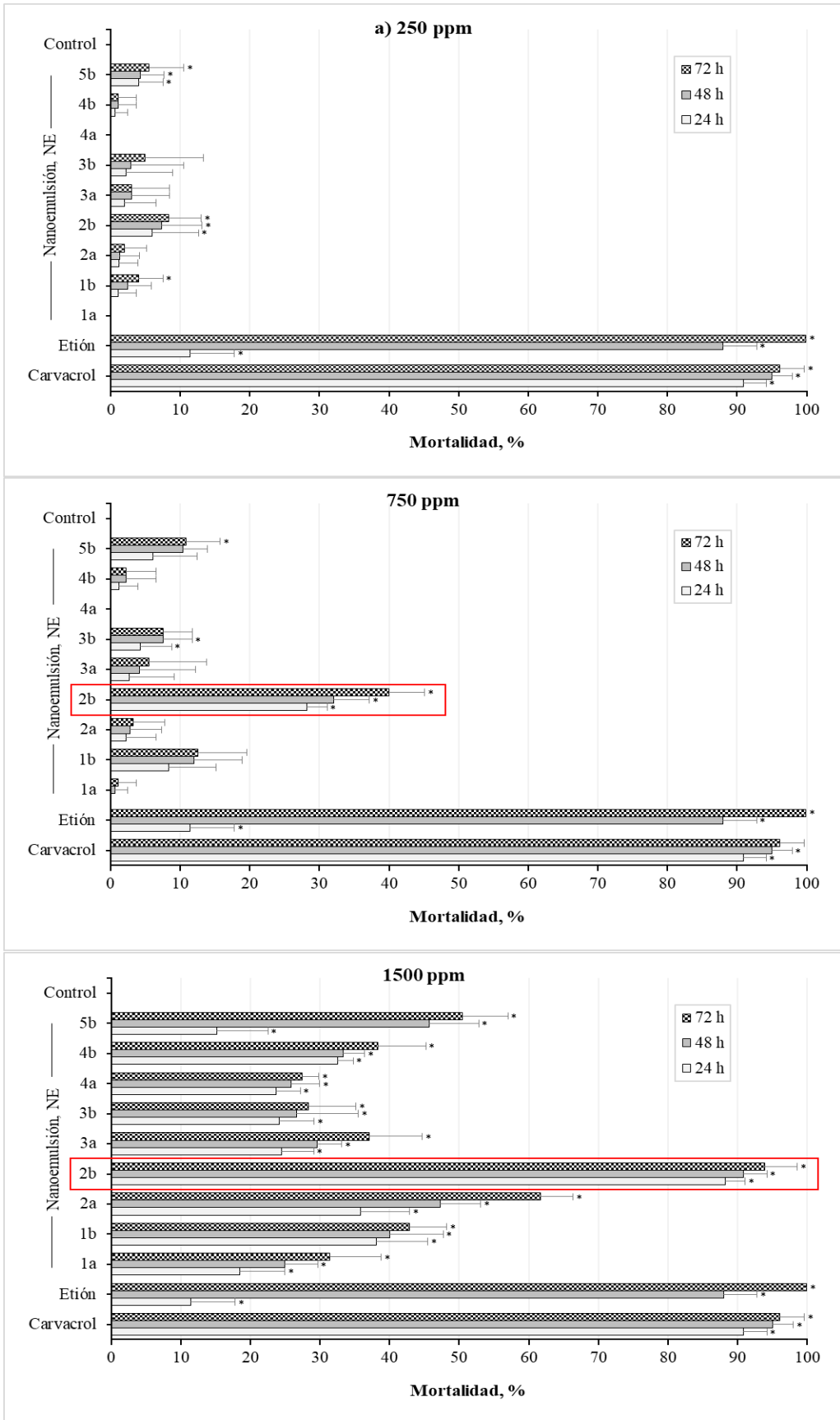
#### **4.3.2.1 Resultados de la prueba del paquete larval (LPT)**

Se evaluó la actividad ixodocida de las nueve formulaciones que mostraron estabilidad durante las primeras horas posteriores a su preparación (NE 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b y 5b) mostrados en la Tabla 5, utilizando concentraciones diagnósticas de 250, 750 y 1500 ppm de carvacrol en la nanoemulsión (Figura 12). Las gráficas de mortalidad correspondientes a cada nanoemulsión se presentan en el Anexo 2.

#### **Figura 12**

*Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones, evaluadas mediante el método del paquete larval. Se emplearon etión y carvacrol libre a 750 ppm como controles positivos.*

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL



## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ).

Para las concentraciones diagnósticas de 250, 750 y 1500 ppm, se obtuvieron porcentajes de mortalidad entre 0 y 94% para las nueve nanoemulsiones evaluadas en los tres tiempos de lectura (24, 48 y 72 horas). Las nanoemulsiones 1a, 3a, 3b, 4a y 4b mostraron porcentajes de mortalidad inferiores al 40% en la concentración más alta (1500 ppm) tras 72 horas de exposición. Por su parte, NE1b alcanzó mortalidades por debajo del 50%, mientras que NE2a y NE5b no superaron el 65% en las mismas condiciones.

Los porcentajes de mortalidad a 1500 ppm y después de 72 horas de exposición fueron: NE1a 31.4%, NE1b 42.9%, NE2a 61.7%, NE3a 37.1%, NE3b 28.3%, NE4a 27.5%, NE4b 38.3% y NE5b con 50.5%. Debido a su baja eficacia en comparación con el control positivo (Etión) y con el carvacrol, estas formulaciones fueron descartadas para su posterior evaluación con concentraciones múltiples.

Se observa una leve tendencia a que la actividad acaricida aumente cuando el tamaño de partícula es menor, lo cual se logra mediante un mayor tiempo de sonicación. Este efecto se debe a una mayor superficie de interacción entre el metabolito y la larva, ya que las larvas están expuestas a partículas más pequeñas con una distribución uniforme mejorando su biodisponibilidad. Además, como lo indica Yener et al., (2009), la cantidad de fase oleosa de la nanoemulsión influye en la liberación del compuesto, ya que el carvacrol tiene buena solubilidad en la fase lipofílica ( $\log K_{ow} = 2.5-3.52$ ), favorece su retención en nanoemulsiones más lipofílicas o con HLB bajo.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

En contraste, la nanoemulsión NE2b presentó un porcentaje de mortalidad cercano al 88% desde las primeras 24 horas a 1500 ppm, alcanzando una máxima mortalidad de 94% a las 72 horas. Además, mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo desde la concentración más baja (250 ppm) a las 24 horas. La concentración de 750 ppm a las 24 horas de la NE2b alcanzó un porcentaje de mortalidad superior a la del etión a las 24 horas. Asimismo, se observó que la concentración de 1500 ppm superó al etión a las 24 horas, presentando diferencias significativas con respecto a este, aunque no frente al carvacrol a 750 ppm; evidenciando una ventaja de esta formulación frente a la molécula libre durante las primeras 24 horas de exposición. Estas comparaciones con el control positivo y el carvacrol se detallan en la Tabla 7.

Para las demás nanoemulsiones evaluadas a la concentración más alta (1500 ppm) y tras un periodo de exposición de 72 horas, se mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo y al carvacrol; sin embargo, estas diferencias se deben a sus bajas tasas de mortalidad en relación con dichos compuestos. Por lo tanto, es posible concluir que la actividad acaricida de NE2b es comparable a la observada en el control positivo y con el carvacrol libre, lo que la convierte en la formulación más prometedora bajo las condiciones evaluadas.

FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 7**

*Datos de mortalidad obtenidos para cada nanoemulsión por el método de paquete larval.*

Nanoemulsiones de carvacrol evaluadas por el método del paquete larval												
	Concentración [ppm]	Tiempo de lectura	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5b	Carvacrol 750 ppm
% Mortalidad ± Desviación estándar	250	24 h	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.1 ± 2.6 <sup>b</sup>	1.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	6.0 ± 6.6 <sup>b</sup>	2.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	2.2 ± 6.7 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	0.6 ± 1.9 <sup>a.b</sup>	4.0 ± 3.5 <sup>b</sup>	90.9 ± 3.3
	750		0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	8.3 ± 6.9 <sup>b</sup>	2.2 ± 4.3 <sup>b</sup>	28.2 ± 2.9 <sup>b</sup>	2.7 ± 6.4 <sup>b</sup>	4.3 ± 4.5 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	1.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	6.1 ± 6.3 <sup>b</sup>	
	1500		18.5 ± 6.5 <sup>a.b</sup>	38.1 ± 7.4 <sup>b</sup>	35.8 ± 7.1 <sup>a</sup>	88.2 ± 2.9 <sup>a</sup>	24.5 ± 4.7 <sup>b</sup>	24.2 ± 5.0 <sup>b</sup>	23.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	32.5 ± 2.3 <sup>b</sup>	15.2 ± 7.4 <sup>b</sup>	
	250	48 h	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	2.4 ± 3.4 <sup>a.b</sup>	1.3 ± 2.8 <sup>a.b</sup>	7.3 ± 5.8 <sup>a.b</sup>	3.0 ± 5.5 <sup>b</sup>	2.9 ± 7.6 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	1.1 ± 2.6 <sup>a.b</sup>	4.3 ± 3.4 <sup>a.b</sup>	95.0 ± 3.0
	750		0.6 ± 1.9 <sup>a.b</sup>	12.0 ± 6.9 <sup>a.b</sup>	2.8 ± 4.5 <sup>a.b</sup>	32.0 ± 5.2 <sup>a.b</sup>	4.2 ± 8.0 <sup>b</sup>	7.5 ± 4.3 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	2.2 ± 4.3 <sup>a.b</sup>	10.4 ± 3.5 <sup>a.b</sup>	
	1500		25.0 ± 4.7 <sup>b</sup>	40.0 ± 7.7 <sup>a.b</sup>	47.3 ± 5.8 <sup>a.b</sup>	90.9 ± 3.3 <sup>a</sup>	29.6 ± 3.5 <sup>b</sup>	26.7 ± 8.8 <sup>b</sup>	25.9 ± 4.0 <sup>a.b</sup>	33.3 ± 3.1 <sup>a.b</sup>	45.7 ± 7.1 <sup>a.b</sup>	
	250	72 h	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	4.0 ± 3.5 <sup>a.b</sup>	2.0 ± 3.2 <sup>a.b</sup>	8.3 ± 4.7 <sup>a.b</sup>	3.0 ± 5.5 <sup>a.b</sup>	4.9 ± 8.4 <sup>a.b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	1.1 ± 2.6 <sup>a.b</sup>	5.5 ± 5.0 <sup>a.b</sup>	96.1 ± 3.5
	750		1.1 ± 2.6 <sup>a.b</sup>	12.6 ± 7.0 <sup>a.b</sup>	3.3 ± 4.5 <sup>a.b</sup>	40.0 ± 5.1 <sup>a.b</sup>	5.5 ± 8.3 <sup>a.b</sup>	7.5 ± 4.3 <sup>a.b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a.b</sup>	2.2 ± 4.3 <sup>a.b</sup>	10.8 ± 4.9 <sup>a.b</sup>	
	1500		31.4 ± 7.4 <sup>a.b</sup>	42.9 ± 5.3 <sup>a.b</sup>	61.7 ± 4.7 <sup>a.b</sup>	93.9 ± 4.7 <sup>a</sup>	37.1 ± 7.6 <sup>a.b</sup>	28.3 ± 6.9 <sup>a.b</sup>	27.5 ± 2.3 <sup>a.b</sup>	38.3 ± 6.9 <sup>a.b</sup>	50.5 ± 6.5 <sup>a.b</sup>	

*Nota.* Los superíndices a y b indican diferencias estadísticamente significativas respecto a su control positivo (etión 750 ppm) y al carvacrol, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Los datos de mortalidad del control positivo (etión 750 ppm) se muestran en el Anexo 3.

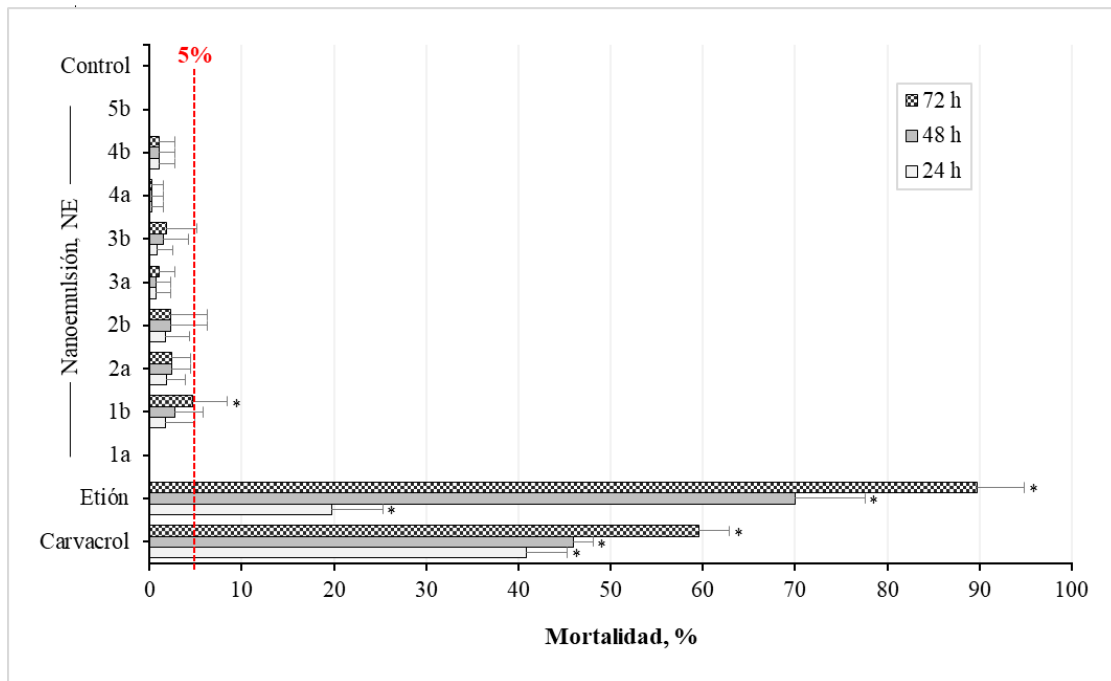
## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

### 4.3.2.2 Resultados de la prueba de inmersión larval (LIT)

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos por el método de inmersión larval para las nueve nanoemulsiones, de igual manera, se trabajaron las concentraciones diagnósticas de 250, 750 y 1500 ppm. Las gráficas de mortalidad correspondientes a cada nanoemulsión se presentan en el Anexo 4.

#### Figura 13

*Resultados de mortalidad con la concentración diagnóstica de 1500 ppm de carvacrol en nanoemulsiones, evaluadas mediante el método del paquete larval. Se utilizaron etión y carvacrol a 750 ppm.*



**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ).

FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 8**

*Datos de mortalidad obtenidos para cada nanoemulsión por el método de inmersión larval.*

Nanoemulsiones de carvacrol evaluadas por el método de inmersión larval												
	Concentración [ppm]	Tiempo de lectura	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5b	Carvacrol 750 ppm
% Mortalidad ± Desviación estándar	250	24 h	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	40.9 ± 4.4
	750		0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.1 ± 1.9 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.4 ± 1.3 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	
	1500		0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.7 ± 3.2 <sup>a,b</sup>	1.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 2.7 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.8 ± 1.7 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	
	250	48 h	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	1.3 ± 2.8 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	46.0 ± 2.1
	750		0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	1.7 ± 2.7 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.5 ± 1.4 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	
	1500		0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	2.7 ± 3.1 <sup>a,b</sup>	2.4 ± 2.1 <sup>a,b</sup>	2.3 ± 4.0 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	1.5 ± 2.7 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	
	250	72 h	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	1.5 ± 3.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.4 ± 1.3 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	59.6 ± 3.3
	750		0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	2.0 ± 2.7 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.9 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	0.7 ± 1.6 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	
	1500		0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	4.7 ± 3.7 <sup>a,b</sup>	2.4 ± 2.1 <sup>a,b</sup>	2.3 ± 4.0 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	1.8 ± 3.3 <sup>a,b</sup>	0.3 ± 1.2 <sup>a,b</sup>	1.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a,b</sup>	

*Nota.* Los superíndices a y b indican diferencias estadísticamente significativas respecto a su control positivo (etión 750 ppm) y al carvacrol, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Los datos de mortalidad del control positivo (etión 750 ppm) se muestran en el Anexo 5.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

En contraste con lo observado en el bioensayo de contacto, el método de inmersión larval no evidenció una actividad acaricida relevante para las nanoemulsiones de carvacrol evaluadas. Los porcentajes de mortalidad obtenidos para las concentraciones diagnósticas de 250, 750 y 1500 ppm oscilaron entre 0 y 4.7% en los tres tiempos de lectura (24, 48 y 72 horas). Únicamente la nanoemulsión NE1b mostró un efecto significativo frente al control negativo en la concentración de 1500 ppm a las 72 horas; sin embargo, dicho porcentaje de mortalidad no superó el 5%.

Particularmente, la formulación NE2b, que previamente presentó la mejor actividad ixodicida por el método del paquete larval, no registró porcentajes de mortalidad significativos en ninguna de las concentraciones evaluadas bajo la metodología de inmersión. Adicionalmente, todas las nanoemulsiones mostraron diferencias significativas con respecto a su control positivo (etión) y al carvacrol puro, como se pueden ver en la Tabla 8; sin embargo, estas diferencias se atribuyen a que las tasas de mortalidad observadas fueron considerablemente bajas en comparación con dichos compuestos.

Los resultados de estas pruebas sugieren que este método no es adecuado para evaluar la efectividad del formulado, indicando que el ensayo presenta una baja sensibilidad para detectar la efectividad de las nanoemulsiones como sistema de administración de compuestos bioactivos con liberación controlada. Según la FAO, este método no es recomendado para compuestos o formulaciones con acción lenta o indirecta, ya que el tiempo de evaluación de la mortalidad es insuficiente para observar su efecto, mientras que la prueba del paquete larval se considera repetible y adecuada para estos estudios (FAO, 2004; Rodríguez-Vivas et al., 2018). Además de que simulan de manera aproximada lo que sucede en los ensayos de campo, en donde la larva se desplaza sobre una superficie impregnada con el compuesto ixodicida; ya que las soluciones acaricidas se aplican directamente sobre la piel del animal, aumentando el área de contacto.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

Sin embargo, lo que sucede en esta prueba podría estar relacionado con la liberación lenta del compuesto gracias a la estabilidad de estos sistemas, que impide que entre en contacto con la larva durante la inmersión. Otro factor a considerar es la cutícula de la garrapata, que representa una barrera para la permeación del metabolito. En los artrópodos, el exoesqueleto está compuesto por la epicutícula formada por lípidos esterificados y por la procutícula, formada por proteínas y quitina, lo que les confiere una estructura compleja y difícil de permear. Dado que el exoesqueleto de las garrapatas es principalmente lipídico, resulta más fácil su interacción con sistemas lipofílicos y de menor tamaño (Beys-da-Silva et al., 2020).

Además, el carvacrol al estar encapsulado interactúa tanto con la fase oleosa como con la fase continua de la nanoemulsión, lo que podría interferir con la permeación del exoesqueleto de las larvas. En una nanoemulsión, cada gota de aceite está rodeada por una capa interfacial de moléculas tensoactivas (Tadros et al., 2004). El Span 80 (lipofílico) se ancla en la fase oleosa y en la interfaz, su cola hidrofóbica se encoge y reduce la curvatura, mientras que las cadenas hidrofílicas de polioxietileno del Tween 80 (hidrofílico) se hidratan y se estabilizan por repulsión estérica (Mazarei & Rafati, 2019). Esto reduce la tensión superficial entre los componentes, uniendo los ingredientes para que no se separen y reteniendo en la fase oleosa el compuesto, disminuyendo su liberación. En la fase oleosa, la parte hidrofóbica de los tensoactivos interactúa con el carvacrol gracias al anillo aromático sustituido y el grupo isopropilo mediante fuerzas de Van der Waals (Ninham et al., 2017). El grupo hidroxilo (-OH) le confiere al carvacrol propiedades hidrofílicas para formar enlaces de hidrógeno con los oxígenos del Tween 80 y del Span 80, lo que genera mayor afinidad por la interfaz atrapando el carvacrol.

Existen estudios que respaldan la hipótesis de la liberación lenta de compuestos como el carvacrol cuando se encuentra en un vehículo nanotransportador. Estos trabajos concluyen que la

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

cinética de liberación depende del tipo de terpeno, por lo que hay algunos compuestos que presentan una liberación más lenta que otros, en sistemas como nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y nanoemulsiones de aceite en agua (Miastkowska & Śliwa, 2020; Zielińska et al., 2020).

Por último, es importante mencionar que, como observamos en los ensayos de actividad acaricida de contacto e inmersión, la mezcla únicamente de los tensoactivos no produce mortalidad significativa en larvas de garrapatas, de manera que no influyen en la efectividad de las nanoformulaciones. Tanto el Span 80 como el Tween 80 presentan una baja toxicidad en varios sistemas biológicos y proveen mejores propiedades de emulsificación para su uso en formulaciones comparado con otros surfactantes de los mismos grupos (Dehghan No et al., 2007; Noudeh et al., 2009; Varma et al., 1985).

### **4.4 Caracterización de la nanoemulsión más prometedora**

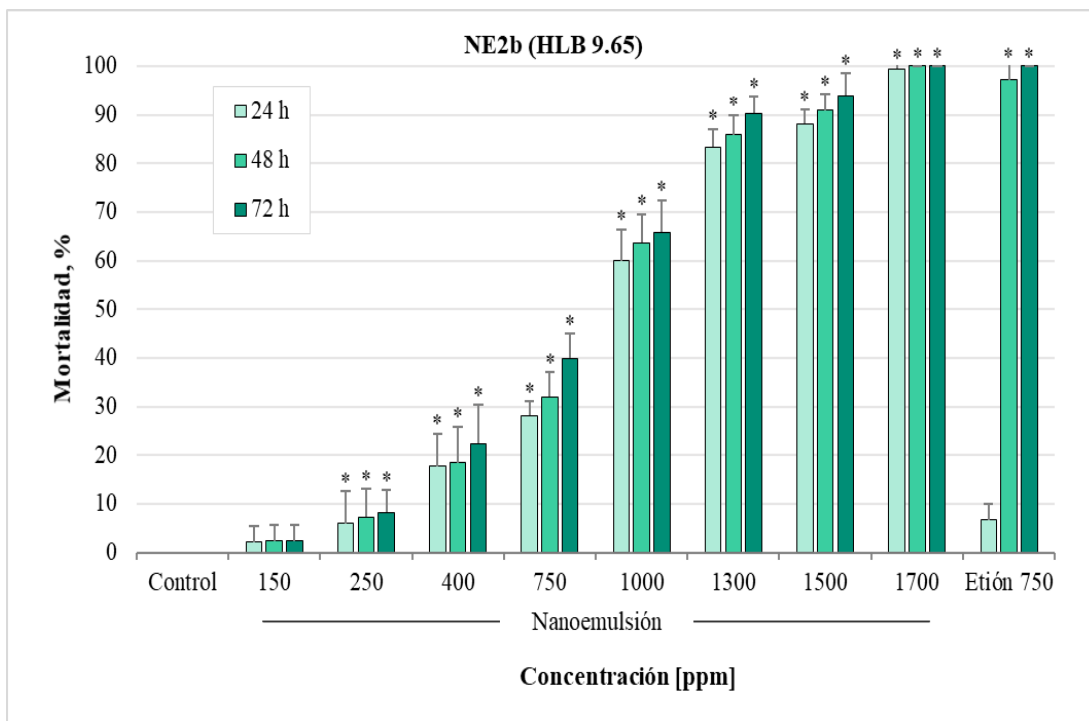
Se seleccionó como mejor formulación la nanoemulsión NE2b (HLB 9.65 y 7 minutos de sonicación), de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas medidas en el DLS y su actividad acaricia evaluada mediante el ensayo del paquete larval.

#### ***4.4.1 Actividad acaricida de la mejor nanoemulsión***

Con la nanoemulsión NE2b (HLB 9.65 con 7 min de sonicación) se evaluó la actividad acaricida usando concentraciones múltiples con el fin de estimar las concentraciones letales. Los resultados se presentan en la Figura 14.

**Figura 14**

*Resultados de mortalidad con concentraciones múltiples de la nanoemulsión NE2b mediante el método del paquete larval.*



**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ).

Las concentraciones más bajas (150 - 250 ppm) registraron mortalidades inferiores al 10%, sin embargo, se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo a partir de la concentración de 250 ppm hasta la de 1700 ppm desde las primeras 24 horas de exposición y hubo un aumento progresivo de mortalidad. Con base en estos resultados, se realizó un análisis Probit para estimar las concentraciones letales ( $CL_{50}$ ,  $CL_{95}$  y  $CL_{99}$ ) cuyos valores son descritos en la Tabla 9.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 9**

*Concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para la nanoemulsión NE2b de carvacrol por el método del paquete larval.*

	Tiempo de lecturas		
	24 h	48 h	72 h
<b>CL<sub>50</sub> ppm</b>	723.0 [590.0 – 895.5]	599.6 [553.7 – 648.6]	528.4 [431.1 – 639.1]
<b>CL<sub>95</sub> ppm</b>	2319.2 [1700.7 – 3752.7]	1977.0 [1762.2 – 2253.5]	1533.5 [1217.5 – 2075.3]
<b>CL<sub>99</sub> ppm</b>	3758.9 [2537.0 – 7062.5]	3240.9 [2800.6 – 3837.9]	2384.5 [1799.7 – 3516.3]
$\chi^2$	7.6	0.3	5.5
<b>SLOPE</b>	3.3	3.2	3.6

*Nota.* Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre corchetes.

Los valores bajos de  $\chi^2$  reflejan una buena concordancia entre los datos observados y los esperados por el modelo Probit, lo que indica un adecuado ajuste estadístico; por otro lado, los valores altos sugieren mayor variabilidad en los resultados de mortalidad. Los valores de SLOPE se encuentran dentro del rango estadísticamente aceptado (2 - 5), evidenciando una distribución homogénea de los datos de mortalidad para las concentraciones evaluadas. Por lo anterior, es posible afirmar que las concentraciones letales estimadas se consideran estadísticamente significativas y confiables.

Al comparar los resultados de mortalidad en la prueba del paquete larval con concentraciones múltiples entre el carvacrol puro y la nanoemulsión NE2b de carvacrol, se observó que la nanoemulsión produjo una mortalidad progresiva con el aumento de la concentración,

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

mientras que el carvacrol mostró un incremento abrupto entre 500 y 700 ppm (25 a 90% a las 24 horas), lo que muestra una mejor dosis-respuesta de la formulación. Las  $CL_{50}$  estimadas fueron 507 ppm para el carvacrol libre y 723 ppm para la nanoemulsión, indicando que la forma libre es más eficaz que en nanoemulsión.

Comparando con estudios previos de Alfonso, (2024), la  $CL_{50}$  obtenida para la nanoemulsión (723 y 528 ppm a 24 y 72 horas, respectivamente) fue menor que la reportada para el metabolito puro (756 y 682 ppm a 24 y 72 horas, respectivamente). Esto demuestra que la nanoemulsión mantiene una actividad larvicida relevante en las concentraciones evaluadas, aunque inferior a la del carvacrol sin formular. Además, este sistema no interfiere negativamente con el efecto tóxico del carvacrol y proporciona una actividad acaricida suficiente, con potencial para ser utilizada como un bioproducto de uso tópico para el control de la garrapata *R. microplus*.

En investigaciones similares se ha encontrado que el metabolito puro suele ser más eficaz que la nanoemulsión contra larvas de garrapatas de diferentes especies. Tal es el caso de Ibrahim et al., (2024), quienes evaluaron nanoemulsiones de D-limoneno contra larvas *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus sanguineus* mediante el método del paquete larval, obteniendo valores de  $CL_{50}$  (6.48 y 11.26%) y  $CL_{90}$  (7.82 y 13.59%) mayores que los de la forma pura del compuesto (1.53 y 2.22% para  $CL_{50}$  y 6.81 y 12.07% para  $CL_{90}$ , respectivamente para *R. annulatus* y *R. sanguineus*).

En otro estudio, se reportó que la combinación binaria de los aceites de limón y árbol de té presentó mejor actividad larvicida, alcanzando una  $CL_{50}$  (0.79%) menor que sus formas puras y en nanoemulsión contra *R. annulatus* por LPT (Ibrahim et al., 2022). También se han reportado nanoemulsiones que funcionan muy bien, pero en una concentración muy alta de principio activo,

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

como en el caso de Anuradha & Shabad., (2023), donde se prepararon nanoemulsiones de aceite esencial de *Cinnamomum camphora* utilizando proporciones diferentes de aceite y Tween 80 mediante ultrasonicación y probaron su actividad contra larvas *R. microplus*, reportando una  $CL_{50}$  de aproximadamente 3364 ppm a las 24 horas por LPT.

De igual manera, se ha reportado que el tiempo de exposición influye crucialmente en el efecto de las nanoemulsiones de aceites de mirra, pachulí y ciprés contra adultos no alimentados de *R. sanguineus* mediante la prueba de inmersión. Estas nanoemulsiones contenían 0.5% de Tween 80 y 20% v/v de aceite, con tamaños de partícula de 29.3, 211.6 y 164.2 nm y PdI de 0.367, 0.221 y 0.237, respectivamente. Durante un seguimiento de 7 días, la mortalidad aumentó con el tiempo y el efecto latente comenzó a partir de las 72 horas posteriores al tratamiento, lo que se demostró por la disminución de las  $CL_{50}$ , que a los 7 días alcanzaron valores de 4.17, 8.57 y 5.04% para las nanoemulsiones de mirra, pachulí y ciprés, respectivamente (Abdel-Ghany et al., 2024).

En otro estudio, se observó una respuesta similar con nanoemulsiones (O/W) de extractos etanólicos de *Aloe vera* y *Rheum rhabarbarum* contra machos y hembras ingurgitadas de la garrapata *H. dromedarii* por el método de inmersión de adultos (AIT). Estas nanoemulsiones aumentaron la eficacia de los extractos de 1 a 7 veces y aceleraron su efecto tóxico de 2 a 4 veces a los 5 días posteriores del tratamiento. En este mismo periodo, las  $CL_{50}$  para los extractos y sus nanoemulsiones fueron 7.8, 7.1, 2.8 y 1.02%, respectivamente. Las formulaciones de *A. vera* y *R. rhabarbarum* presentaron tamaños de 196.7 y 291 nm y potenciales zeta de -29.1 y -53.1 mV, respectivamente (Radwan et al., 2023).

Cabe señalar que, en la mayoría de los estudios de evaluación de nanotransportadores no se emplea la prueba de inmersión de larvas, sino que utilizan principalmente el método de contacto

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

(Gamal et al., 2023; Kancharana et al., 2020). Esto sugiere y confirma que la prueba de inmersión (LIT) no es un método ampliamente reconocido ni estandarizado para evaluar este tipo de formulaciones.

Contrario a lo anterior, también hay reportes donde las nanoemulsiones superan la eficacia del compuesto puro. Por ejemplo, Dos Santos et al., (2017) estudiaron nanocápsulas y nanoemulsiones con 5% de aceite de canela sobre hembras adultas de *R. microplus*, obteniendo eficacias del 95 y 97%, respectivamente, frente al compuesto puro que alcanzó una mortalidad del 100% a una concentración de 10%. Además, al aplicar estas formulaciones en ganado naturalmente infestado, se observó que para el día 20 posterior al tratamiento, los animales estaban libres de garrapatas.

### ***4.4.2 Estabilidad de la mejor nanoemulsión***

#### **4.4.2.1 Estabilidad en el tiempo**

Se evaluó la estabilidad en el tiempo de la nanoemulsión NE2b a temperatura ambiente y bajo refrigeración durante 14 días. Los días 7 y 14 se midieron las propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión mediante DLS y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 10 y en la Figura 15.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

**Tabla 10**

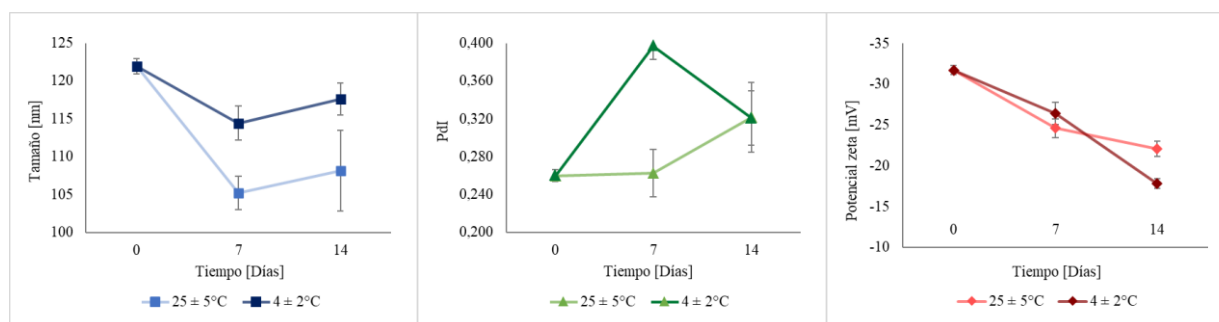
*Evolución del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta de la nanoemulsión NE2b a diferentes temperaturas en un período de 14 días.*

Día	Temperatura [°C]	Diámetro promedio [nm]	Índice de polidispersidad (PdI)	Potencial zeta [mV]
0	25 ± 5	121.9 ± 1.0	0.260 ± 0.006	-31.7 ± 0.6
7	25 ± 5	105.2 ± 2.2*	0.263 ± 0.025	-24.6 ± 1.2*
	4 ± 2	114.4 ± 2.3*	0.397 ± 0.014*	-26.4 ± 1.4*
14	25 ± 5	108.1 ± 5.3*	0.322 ± 0.037*	-22.0 ± 0.9*
	4 ± 2	117.7 ± 2.1	0.321 ± 0.029*	-17.8 ± 0.6*

**Nota.** Los datos se expresan como media ± desviación estándar,  $n \geq 4$ . Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al día 0 ( $p < 0.05$ ).

**Figura 15**

*Resultados de la prueba de estabilidad en el tiempo de NE2b a diferentes temperaturas.*



La nanoemulsión mantiene un tamaño promedio de partícula que varía con el tiempo y la temperatura de almacenamiento, no obstante, dicha variación corresponde a una disminución significativa del tamaño con respecto al día 0. Este comportamiento puede deberse a un

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

reordenamiento de las partículas para estabilizar el sistema o a la ocurrencia de la maduración de Ostwald, lo que explicaría la presencia simultánea de partículas más pequeñas y más grandes dentro de la distribución, lo que conduce a la reducción del tamaño promedio, pero, al mismo tiempo, a un aumento en la polidispersidad.

Se observó que la nanoemulsión permanece estable hasta el día 7 a temperatura ambiente, ya que no hay un cambio significativo en el PDI con respecto al día 0. Sin embargo, en todos los casos se registró una disminución del valor absoluto del potencial zeta, lo que indica una reducción de la estabilidad electrostática de las partículas y, por consiguiente, una mayor probabilidad de agregación y separación de fases. En ambas condiciones de almacenamiento, con excepción del 7 día a temperatura ambiente, el sistema mostró un incremento del PDI, siendo este cambio más marcado bajo refrigeración. Este comportamiento puede explicarse por el reordenamiento progresivo de los tensoactivos en la interfase, así como por la reducción de la movilidad de las partículas en el enfriamiento, lo que aumenta la viscosidad y favorece la floculación y la coalescencia. Estos procesos limitan la capacidad para mantener una distribución homogénea en la superficie de las gotas y facilitan la neutralización de las cargas. En general, los resultados sugieren que esta nanoemulsión es sensible tanto al almacenamiento como a los cambios de temperatura (Li & Lu, 2016; Ozogul et al., 2025).

Estos resultados coinciden con los reportados por Motta Felício et al., (2021), quienes observaron que la nanoemulsión de carvacrol con HLB 11 presentó una disminución progresiva de la magnitud del potencial zeta pasando de -26 mV el primer día a -17.4 y -14.6 mV a los 60 y 90 días de almacenamiento, respectivamente. Sin embargo, indican que la formulación se mantuvo estable debido a la combinación de tensoactivos y al tamaño nanométrico de las gotas (día 0: 125 nm, día 60: 169 nm y día 90: 164 nm), que favorecieron la estabilidad cinética del sistema.

### 4.4.2.2 Prueba de centrifugación

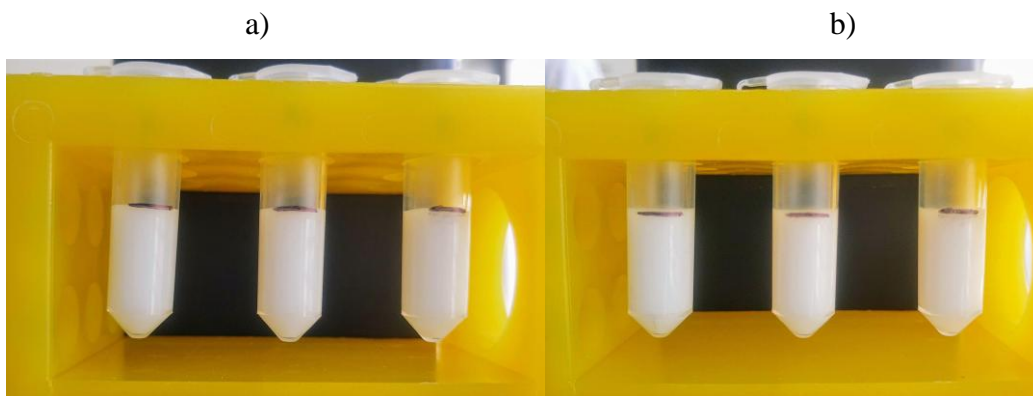
La nanoemulsión fue sometida a dos ciclos de centrifugación: el primero a 3500 rpm durante 20 min y el segundo a 5000 rpm durante 20 min. Luego de la primera centrifugación no se observaron cambios visibles, y al finalizar ambos ciclos tampoco se evidenció sedimentación ni separación de fases en la formulación. Solamente se registró un leve incremento de altura, en promedio menor a 1 milímetro respecto al valor inicial; sin embargo, no hubo presencia de una capa viscosa en la superficie, por lo que no se asocia a la formación de crema (capa superior). De manera que, este cambio no se considera significativo, dado que la magnitud de la variación fue mínima, sin mostrar progresión con el tiempo y consistente en las tres réplicas.

En esta prueba de estabilidad acelerada, los resultados visuales indican que la nanoemulsión presenta alta estabilidad física, manteniéndose homogénea y resistente frente a una fuerza externa como la centrifugación. Para comprobar los hallazgos obtenidos por inspección simple después de la centrifugación, también se midieron las propiedades de la nanoemulsión y se analizaron mediante pruebas estadísticas de tipo t. Los resultados mostraron que el tamaño cambió de  $121.9 \pm 1.0$  a  $116.8 \pm 2.9$  nm y el PDI de  $0.260 \pm 0.006$  a  $0.307 \pm 0.054$ , no presentaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que la distribución de tamaños se mantuvo estable. Por el contrario, el potencial zeta sí presentó diferencias, con un cambio de  $-31.6$  a  $-26.9 \pm 1.0$  mV, esto sucede debido a que la centrifugación aumenta la probabilidad de colisiones entre las gotas y favorece el reordenamiento de los tensoactivos en la interfaz, esto puede afectar la carga superficial de las partículas. Esto último indica que el potencial zeta también es sensible a la aplicación de fuerzas externas. El registro fotográfico de este resultado se presenta en la Figura 16.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

### Figura 16

*Resultados de la prueba de centrifugación de la nanoemulsión NE2b. Las imágenes muestran el aspecto de la nanoemulsión inicial (a) y después de los dos ciclos de centrifugación (b).*



*Nota.* Se muestran las tres réplicas usadas en la prueba.

### 4.4.3 Evaluación del pH

La medición de pH se realizó el mismo día de la preparación de la nanoemulsión utilizando un pH metro previamente calibrado, obteniendo un valor de  $6.87 \pm 0.49$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, se realizó una prueba cualitativa con papel indicador, la cual mostró un pH aproximado de 6, como se observa en la Figura 17. Este valor de pH se debe a la naturaleza débilmente ácida del carvacrol ( $\text{pK}_a = 10.38 \pm 0.10$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), lo que sugiere que una pequeña fracción de los grupos hidroxilo del metabolito se desprotonaron, ocasionando una ligera disminución del pH.

Dado que el pH es una medida de estabilidad de las emulsiones, se espera que este valor se mantenga constante en el tiempo, ya que variaciones significativas de pH podrían indicar reacciones que comprometan la calidad y estabilidad de la formulación (Bernardi et al., 2011). En concordancia con lo anterior, luego de 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

registró un valor de pH de  $6.82 \pm 0.04$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el cual no presenta diferencias significativas con respecto al valor inicial (día 0).

### Figura 17

*Prueba con papel indicador para la medición del pH de la nanoemulsión.*



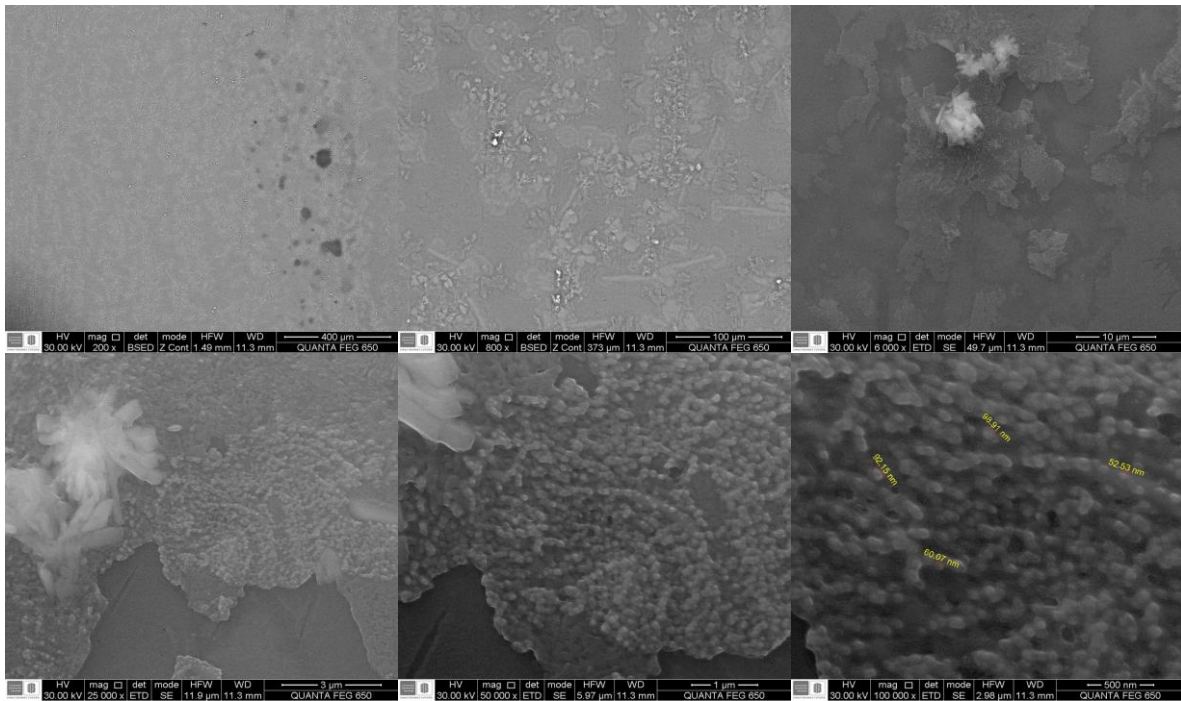
**Nota.** Tira indicadora universal (rango pH 0–14, Merck).

#### **4.4.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió analizar la estructura morfológica de las nanoemulsiones. Las imágenes de la Figura 18 corresponden a la dilución 1:25 de la nanoemulsión NE2b tras el proceso de secado. En ellas se observaron partículas con formas esféricas, regulares y distribución uniforme, con superficies lisas y tamaños inferiores a 100 nm. Estos resultados tienen concordancia con el análisis realizado mediante DLS donde la distribución del tamaño de partícula por intensidad se encuentra dentro del rango nanométrico y se detecta la presencia de partículas con tamaños menores a 100 nm.

**Figura 18**

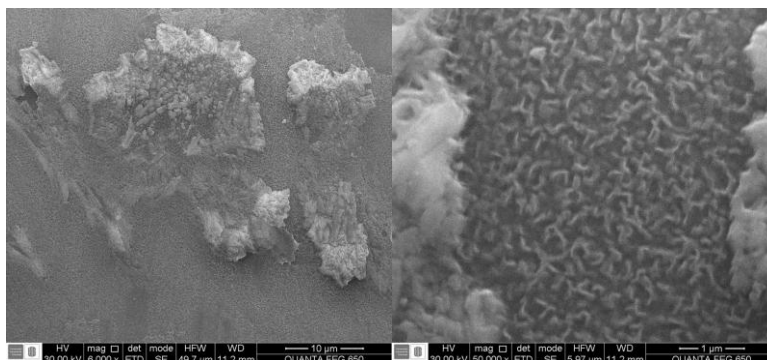
*Imágenes SEM de la dilución 1:25 de la nanoemulsión NE2b a diferentes escalas de tamaño.*



Con una dilución de 1:250 se obtuvieron las imágenes de la Figura 19, en donde se observa una red uniforme formando una película homogénea. Las gotas parecen haberse fusionado parcialmente debido a los tensoactivos, al proceso de secado y a una mayor cantidad de agua o fase acuosa (Nayila et al., 2024).

**Figura 19**

*Imágenes SEM de la dilución 1:250 de la nanoemulsión NE2b.*

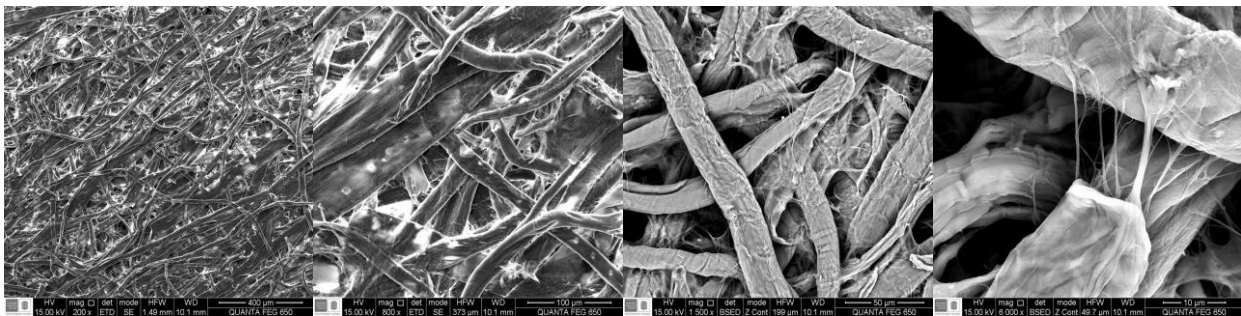


## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

El papel de filtro está compuesto por una red de fibras de celulosa entrelazadas y porosas, que facilitan la filtración de líquidos y permiten retener las partículas insolubles. La fase acuosa de la nanoemulsión se absorbe y al exponerse al aire se evapora, convirtiendo el sistema en una película impregnada de metabolito y tensoactivos, como se observa en la Figura 19. Estas imágenes corresponden a la misma zona del papel, pero con diferentes ampliaciones, en donde se observa que las fibras del papel están recubiertas de forma irregular por estructuras en forma de “telarañas” que corresponden a restos secos de la nanoemulsión. Las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los tensoactivos y el carvacrol con las fibras del papel favorecen su retención y adsorción, lo que explica la efectividad del método gracias al contacto directo con las larvas. Este análisis se fundamentó en los estudios de Ichiura et al., (2017) y Su et al., (2025), quienes documentaron los cambios en la estructura del papel tras someterlos a diferentes tratamientos, así como en Atkinson, (2023), quien describe su composición química. Las imágenes SEM se compararon con la reportada por Boodaghi & Shamloo, (2020).

### Figura 20

*Imágenes SEM del papel filtro seco que previamente fue impregnado con la solución de la nanoemulsión NE2b a diferentes escalas de tamaño.*



### 5. Conclusiones

El presente trabajo demuestra que fue posible formular nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) de carvacrol con tamaños promedio en el rango nanométrico (122 - 218 nm), evidenciando que tanto el HLB como el tiempo de sonicación influyen directamente en el tamaño de partícula y en la estabilidad de la formulación del compuesto carvacrol. Se observó que la disminución del HLB aumentó el tamaño de partícula, mientras que el tiempo de sonicación de 7 minutos favoreció la formación de gotas más pequeñas, uniformes y con potencial zeta más negativo.

Este diseño experimental permitió determinar la proporción óptima de HLB para una formulación efectiva con base en las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad ideales para nuestro caso en particular. La formulación NE2b (HLB 9.65, 7 min) presentó el menor tamaño de partícula ( $121.9 \pm 1.0$  nm) entre todas las nanoemulsiones evaluadas, con un potencial zeta de  $-31.7 \pm 0.6$  mV, lo que indica una buena estabilidad coloidal. La proporción 1:1 de tensoactivos no iónicos resultó ser la relación más adecuada para encapsular el carvacrol en una nanoemulsión.

Los fenómenos de maduración de Ostwald, floculación y coalescencia fueron los principales mecanismos de desestabilización identificados, especialmente en formulaciones con valores de HLB extremos (4.3 y 15), los cuales presentaron un aumento en el tamaño de las gotas y separación de fases, lo que visualmente se vio como la presencia de crema en la superficie y cambios de coloración tras el tiempo de reposo.

La actividad acaricida mostró una tendencia inversamente proporcional con el tamaño de partícula en la prueba de contacto: nanoemulsiones con partículas más pequeñas lograron mayor eficiencia, esto se debe probablemente a una mayor superficie de interacción con la larva de *R. microplus*.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

El método de inmersión larval no resultó ser adecuado para evaluar la efectividad de estas nanoemulsiones, mostrando baja tasa de mortalidad y baja sensibilidad. Esto se debe a la liberación controlada del sistema y a la baja permeación de la cutícula de la garrapata durante el tiempo de inmersión.

La nanoemulsión NE2b alcanzó una mortalidad del 94% a las 72 horas a 1500 ppm, presentando una eficacia comparable a la del carvacrol libre y al control positivo (etión) en el ensayo de contacto desde las primeras 24 horas de exposición, convirtiéndola en la formulación más prometedora bajo las condiciones evaluadas. Esto demuestra que la nanoemulsión mantiene una actividad larvicida relevante, aunque inferior a la del carvacrol sin formular. Además, este sistema proporciona una actividad acaricida suficiente, con potencial para ser utilizada como un bioproducto de uso tópico para el control de la garrapata *R. microplus*.

Las pruebas de estabilidad física demostraron que la nanoemulsión NE2b mantuvo su homogeneidad durante 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en el enfriamiento aumentó su polidispersidad, sugiriendo que la refrigeración puede inducir a la inestabilidad del sistema. Por otra parte, estas pruebas permitieron observar que el potencial zeta es la propiedad más susceptible a los cambios durante el almacenamiento y frente a la aplicación de una fuerza externa como la centrifugación, ya que hubo una disminución significativa de su valor absoluto en todos los casos. También que la distribución del tamaño se ve afectada principalmente por el proceso de maduración de Ostwald.

## 6. Recomendaciones

- Evaluar el efecto de las nanoemulsiones de carvacrol sobre otros estadios de la garrapata *R. microplus*, como huevos y adultas ingurgitadas, con el fin de determinar su potencial para inhibir el ciclo no parasitario (oviposición y eclosión de larvas). Además, se recomienda realizar ensayos de campo a pequeña escala para evaluar la efectividad de la formulación en escenarios reales, donde estará expuesta a diversos factores ambientales.
- Optimizar la prueba de inmersión larvaria, extendiendo tanto el tiempo de lectura como el tiempo de inmersión de las larvas en la solución de la nanoemulsión, con el propósito de obtener resultados más representativos de la eficacia acaricida de este tipo de sistemas.
- Complementar los estudios de estabilidad a largo plazo de la nanoemulsión, almacenando muestras a diferentes temperaturas durante al menos 90 días y evaluar periódicamente sus propiedades fisicoquímicas. Se recomienda determinar la eficiencia de encapsulación.
- Explorar la formulación de nanoemulsiones con otros compuestos bioactivos sobre *R. microplus*, como el eugenol y el citral, así como sus posibles mezclas sinérgicas con el carvacrol, con el objetivo de potenciar la eficiencia del tratamiento.

**Referencias Bibliográficas**

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary Parasitology*, 203(1-2), 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Abdel-Ghany, H. S. M., Ayoob, F., Abdel-Shafy, S., Soliman, A. A. F., Gebely, M. A., & Abuowarda, M. (2024). Comparative toxicity of three variant oils and their nanoemulsions on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Scientific Reports*, 14(1), 27060. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77402-w>
- Abubakar, M., K. Perera, P., Iqbal, A., & Manzoor, S. (2019). Introductory chapter: Ticks and tick-borne pathogens. In M. Abubakar & P. K. Perera (Eds.), *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82510>
- Acevedo-Gutiérrez, L. Y., Paternina, L. E., Pérez-Pérez, J. C., Londoño, A. F., López, G., & Rodas, J. D. (2020). Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 126–139. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75252>
- Adenubi, O. T., Abdalla, M. A., & McGaw, L. J. (2020). Ethnoveterinary plants and practices for the control of ticks and tick-borne diseases in South Africa. In *Ethnoveterinary Medicine* (pp. 251–267). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32270-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32270-0_11)
- Adenubi, O. T., Ahmed, A. S., Fasina, F. O., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2018). Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops and Products*, 123, 779–806. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>
- Agwunobi, D. O., Yu, Z., & Liu, J. (2021). A retrospective review on ixodid tick resistance against

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173(104776), 104776.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104776>

Alfonso, B., Méndez-Sánchez, S. C., Duque, J., & Avendaño, G. (2024). Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con posible acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus* [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad Industrial de Santander

Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>

Anuradha, K. & Shabad, P. (2023). Evaluation of Acaricidal Activity of *Cinnamomum camphora* (F. Lauraceae) Essential Oil Nanoemulsion Against Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *Advances in Zoology and Botany*, 11(2), 121 - 128. DOI: 10.13189/azb.2023.110204.

Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gómez, D., & Rivera, J. (2014). Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia. *Revista Udca Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 161–170.  
<https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n1.2014.951>

Ashaolu, T. J. (2021). Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3381–3395. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01216-9>

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Benelli, G., Losic, D., Usha Rani, P., & Desneux, N. (2018). Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. *Journal of Pest Science*, 91(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0898-0>

Atkinson, V. (2023, April 4). *The complex chemistry of making paper*. Chemistry World.  
<https://www.chemistryworld.com/features/the-complex-chemistry-of-making->

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

paper/4017234.article

- Bahuguna, A., Ramalingam, S., & Kim, M. (2020). Formulation, characterization, and potential application of nanoemulsions in food and medicine. In *Nanotechnology in the Life Sciences* (pp. 39–61). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31938-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31938-0_3)
- Bandaranayaka, K. O., Dissanayaka, U. I., & Rajakaruna, R. S. (2021). Experimental aspects of life cycles of two hard tick species, *Rhipicephalus (Boophilus)* and *Hyalomma isaaci* (Acari: Ixodidae), on New Zealand white rabbits. *Ceylon Journal of Science*, 50(1), 47. <https://doi.org/10.4038/cjs.v50i1.7846>
- Benelli, G., & Pavela, R. (2018). Repellence of essential oils and selected compounds against ticks-A systematic review. *Acta Tropica*, 179, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>
- Bernardi, D. S., Pereira, T. A., Maciel, N. R., Bortoloto, J., Viera, G. S., Oliveira, G. C., & Rocha-Filho, P. A. (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-44>
- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J. B., Vainstein, M. H., Schrank, A., Bittencourt, V. R. E. P., & Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 208(107812), 107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Bissinger, B. W., & Roe, R. M. (2010). Tick repellents: Past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(2), 63–79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.09.010>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

*Suppl*, S247–S269. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005190>

Boodaghi, M., & Shamloo, A. (2020). A comparison of different geometrical elements to model fluid wicking in paper-based microfluidic devices. *AIChE Journal. American Institute of Chemical Engineers*, 66(1). <https://doi.org/10.1002/aic.16756>

Burrow, H. M., Mans, B. J., Cardoso, F. F., Birkett, M. A., Kotze, A. C., Hayes, B. J., Mapholi, N., Dzama, K., Marufu, M. C., Githaka, N. W., & Djikeng, A. (2019). Towards a new phenotype for tick resistance in beef and dairy cattle: a review. *Animal Production Science*, 59(8), 1401. <https://doi.org/10.1071/an18487>

Cabezas, A. F., Avendaño, G. S., Méndez-Sánchez, S. C., Duque, J.E., (2024). Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodícida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*. [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad Industrial de Santander.

Cardoso, A. D. S., Santos, E. G. G., Lima, A. da S., Temeyer, K. B., Pérez de León, A. A., Costa, L. M., Junior, & Soares, A. M. D. S. (2020). Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. *Veterinary Parasitology*, 280(109090), 109090. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>

Carpenter, J., & Saharan, V. K. (2017). Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35(Pt A), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.10.021>

Chen, D., Li, J., Zhao, Y., & Wu, Y. (2022). Human exposure of fipronil insecticide and the associated health risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(1), 63–71. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05694>

Chong, W.-T., Tan, C.-P., Cheah, Y.-K., B Lajis, A. F., Habi Mat Dian, N. L., Kanagaratnam, S.,

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- & Lai, O.-M. (2018). Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. *PloS One*, *13*(8), e0202771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202771>
- Çiçek, S., Korkmaz, Y. B., Tüzün, B., & Işık, S. (2025). Evaluating the insecticidal efficacy of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil and its nanoemulsion form against three stored products pests and molecular docking simulations. *Journal of Stored Products Research*, *114*(102729), 102729. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102729>
- Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., & Kumar, S. (Eds.). (2023). *A laboratory manual on Rhipicephalus microplus*. Cambridge Scholars Publishing.
- Cruz, E. M. de O., Costa, L. M., Jr, Pinto, J. A. O., Santos, D. de A., de Araujo, S. A., Arrigoni-Blank, M. de F., Bacci, L., Alves, P. B., Cavalcanti, S. C. de H., & Blank, A. F. (2013). Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, *195*(1-2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, *10*(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Dantas, A. G. B., de Souza, R. L., de Almeida, A. R., Xavier Júnior, F. H., Pitta, M. G. da R., Rêgo, M. J. B. de M., & Oliveira, E. E. (2021). Development, characterization, and immunomodulatory evaluation of carvacrol-loaded nanoemulsion. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(13), 3899. <https://doi.org/10.3390/molecules26133899>
- de Castro, J. J. (1997). Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- developing countries. *Veterinary Parasitology*, 71(2-3), 77–97.  
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00033-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00033-2)
- Dehghan No, G., Khazaeli, P., & Rahmani, P. (2007). Study of the effects of polyethylene glycol sorbitan esters surfactants group on biological membranes. *International Journal of Pharmacology*, 4(1), 27–33. <https://doi.org/10.3923/ijp.2008.27.33>
- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K. M., Mansfield, K. L., Nijhof, A. M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., ... Rego, R. O. M. (2017). Tick-pathogen interactions and vector competence: Identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>
- Desimone, M. F., Jotania, R. B., Khomane, R. B., & Chaudhary, R. G. (Eds.). (2025). *Nanotechnology: Applications for environmental protection and sustainability*. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-86508-4>
- Domínguez García, D. I., Torres Agatón, F., & Rosario-Cruz, R. (2016). Economic evaluation of tick (*Rhipicephalus microplus*) control in Mexico. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9), 43–52.  
<https://ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/49>
- Dos Santos, D. S., Boito, J. P., Santos, R. C. V., Quatrin, P. M., Ourique, A. F., Dos Reis, J. H., Gebert, R. R., Glombowsky, P., Klauck, V., Boligon, A. A., Baldissera, M. D., & Da Silva, A. S. (2017). Nanostructured cinnamon oil has the potential to control *Rhipicephalus microplus* ticks on cattle. *Experimental & Applied Acarology*, 73(1), 129–138.  
<https://doi.org/10.1007/s10493-017-0171-5>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Duarte, J. L., Di Filippo, L. D., de Faria Mota Oliveira, A. E. M., Sábio, R. M., Marena, G. D., Bauab, T. M., Duque, C., Corbel, V., & Chorilli, M. (2024). Development and characterization of potential larvicidal nanoemulsions against *Aedes aegypti*. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *15*(1), 104–114. <https://doi.org/10.3762/bjnano.15.10>
- Dzemo, W. D., Thekiso, O., & Vudriko, P. (2022). Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, *8*(1), e08718. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08718>
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R., & Walker, A. R. (2006). The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & Applied Acarology*, *38*(2-3), 219–235. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-0003-5>
- FAO. (2004). Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. *Animal Production and Health Division Agriculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*, 83–92.
- FAO y OMS. (2022). Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de los plaguicidas químicos de la FAO y de la OMS (Segunda edición). Roma, FAO y Ginebra, OMS. <https://doi.org/10.4060/cb8401es>
- Felippelli, G., Teixeira, W. F. P., Gomes, L. V. C., Maciel, W. G., Cruz, B. C., Buzzulini, C., Dos Santos, T. R., Ferreira, L. L., Soares, V. E., Rodrigues, D. C., Monteiro, C. M. de O., da Costa, A. J., & Lopes, W. D. Z. (2022). Tick infestation level interferes with spray formulation (organophosphate + pyrethroid) efficacy against *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *13*(2), 101903. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101903>
- Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., Moura, G. de P., Sánchez, J., & Martins, C. E.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- N. (2022). Prevalence of bovine *Babesia spp.*, *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *13*(4), 101967. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C., & Solans, C. (2007). Formation and stability of nano-emulsions in mixed nonionic surfactant systems. In *Trends in Colloid and Interface Science XV* (pp. 184–189). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-45725-9\\_42](https://doi.org/10.1007/3-540-45725-9_42)
- Gamal, A., Aboelhadid, S. M., Abo El-Ela, F. I., Abdel-Baki, A.-A. S., Ibrahim, S. M., El-Mallah, A. M., Al-Quraishy, S., Hassan, A. O., & Gadelhaq, S. M. (2023). Synthesis of carvacrol-loaded invasomes nanoparticles improved acaricide efficacy, cuticle invasion and inhibition of acetylcholinestrase against hard ticks. *Microorganisms*, *11*(3), 733. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030733>
- Ganguly, M., Debraj, D., Mazumder, N., Carpenter, J., Manickam, S. & Pandit, A. B. (2024). Impact of Ultrasonication on the Oxidative Stability of Oil-in-Water Nanoemulsions: Investigations into Kinetics and Strategies to Control Lipid Oxidation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *63*(23), 10212-10225. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c00506>
- George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, *129 Suppl*, S353–S366. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004682>
- Ghosh, S., & Nagar, G. (2014). Problem of ticks and tick-borne diseases in India with special emphasis on progress in tick control research: a review. *Journal of Vector Borne Diseases*, *51*(4), 259–270. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.147842>
- Githaka, N. W., Kanduma, E. G., Wieland, B., Darghouth, M. A., & Bishop, R. P. (2022).

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Acaricide resistance in livestock ticks infesting cattle in Africa: Current status and potential mitigation strategies. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 2(100090), 100090. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100090>
- Gonzaga, B. C. F., Barrozo, M. M., Coutinho, A. L., Pereira E Sousa, L. J. M., Vale, F. L., Marreto, L., Marchesini, P., de Castro Rodrigues, D., de Souza, E. D. F., Sabatini, G. A., Costa-Júnior, L. M., Ferreira, L. L., Lopes, W. D. Z., & Monteiro, C. (2023). Essential oils and isolated compounds for tick control: advances beyond the laboratory. *Parasites & Vectors*, 16(1), 415. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05969-w>
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/c5sm02958a>
- Gupta, S., Gupta, S., & Kumar, S. (2021). Emergence of fipronil resistance in cattle ticks *Rhipicephalus microplus* and *Hyalomma anatolicum* collected from Haryana, India. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 401–407. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00218-4>
- Hong, I. K., Kim, S. I., & Lee, S. B. (2018). Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 67, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.022>
- Hsu J. P. & Nacu, A. (2003). Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259(2), 374–381. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00207-2)
- Hurtado, O., & Giraldo-Ríos, C. (2018). Economic and health impact of the ticks in production animals. *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81167>
- Ibrahium, S. M., Abdel-Baki, A.-A. S., Al-Quraishy, S., Hassan, K. M., Hassan, A. O., Abdel-

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Rahim, M. M., Arafa, W. M., Aboelhadid, S. M., & Gadelhaq, S. M. (2024). Efficacy of D-Limonene Nanoemulsion Against *Rhipicephalus annulatus* and *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. *Acta Parasitologica*, *69*(1), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00734-6>
- Ibrahium, S. M., Wahba, A. A., Farghali, A. A., Abdel-Baki, A.-A. S., Mohamed, S. A. A., Al-Quraishy, S., Hassan, A. O., & Aboelhadid, S. M. (2022). Acaricidal activity of tea tree and lemon oil nanoemulsions against *Rhipicephalus annulatus*. *Pathogens*, *11*(12), 1506. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121506>
- Ichiura, H., Hirose, Y., Masumoto, M., & Ohtani, Y. (2017). Ionic liquid treatment for increasing the wet strength of cellulose paper. *Cellulose (London, England)*, *24*(8), 3469–3477. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1340-8>
- Jabbar, A., Abbas, T., Sandhu, Z.-U.-D., Saddiqi, H. A., Qamar, M. F., & Gasser, R. B. (2015). Tick-borne diseases of bovines in Pakistan: major scope for future research and improved control. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0894-2>
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006>
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, *9*(3-4), 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, *41*(3), 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, *129* Suppl, S3–S14. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005967>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, *137*(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>
- Jonsson, N. N., Bock, R. E., & Jorgensen, W. K. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*, *155*(1-2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.022>
- Kala, S., Sogan, N., Agarwal, A., Naik, S. N., Patanjali, P. K., & Kumar, J. (2020). Biopesticides: Formulations and Delivery Techniques. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (pp. 209–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819304-4.00018-x>
- Kancharana, S., Chengalva, R. V., Kothapalli, S. R., Yegireddy, M., Bollini, S., & Tollamadugu Naga Venkata Krishna Vara, P. (2020). Assessment of acaricidal activity of nanoscale ZnO encapsulated piperine formulation against *Rhipicephalus microplus*. *IET Nanobiotechnology*, *14*(8), 722–731. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2020.0159>
- Karasali, H., & Maragou, N. (2016). Pesticides and Herbicides: Types of Pesticide. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 319–325). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00535-3>
- Kaur, G., & Mehta, S. K. (2017). Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *529*(1-2), 134–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.059>
- Klang, V., Matsko, N. B., Valenta, C., & Hofer, F. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron (Oxford, England: 1993)*, *43*(2-3), 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *The Environmentalist*, 28(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016). Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry. In V. S. Kulkarni & C. Shaw (Eds.), *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages* (pp. 5–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801024-2.00002-9>
- Kumar, M., Bishnoi, R. S., Shukla, A. K., & Jain, C. P. (2019). Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. *Preventive Nutrition and Food Science*, 24(3), 225–234. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>
- Kumar, R. (2019). Molecular markers and their application in the monitoring of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Experimental & Applied Acarology*, 78(2), 149–172. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00394-0>
- Lagunes-Quintanilla, R., Gómez-Romero, N., Mendoza-Martínez, N., Castro-Saines, E., Galván-Arellano, D., & Basurto-Alcantara, F. J. (2024). Perspectives on using integrated tick management to control *Rhipicephalus microplus* in a tropical region of Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 11:1497840. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1497840>
- Lazcano Díaz, E., Padilla Camberos, E., Castillo Herrera, G. A., Estarrón Espinosa, M., Espinosa Andrews, H., Paniagua Buelnas, N. A., Gutiérrez Ortega, A., & Martínez Velázquez, M. (2019). Development of essential oil-based phyto-formulations to control the cattle tick *Rhipicephalus microplus* using a mixture design approach. *Experimental Parasitology*, 201, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.008>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Lee, N.-H., Lee, S., Chung, N., & Lee, H.-S. (2025). *Haemaphysalis longicornis* and Carvacrol as Acaricide: Efficacy and Mechanism of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *30*(7), 1518. <https://doi.org/10.3390/molecules30071518>
- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(6), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.008>
- Lew-Tabor, A. E., & Rodríguez Valle, M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *7*(4), 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>
- Li, P-H. & Chang, C-H. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, *53*, 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.031>.
- López & Betancourt. (2024). Garrapatas de los Animales Domésticos en América: Su Importancia Médica y Veterinaria. ISBN: 978-628-96246-0-1
- Lumaret, J.-P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J., & Wardhaugh, K. (2012). A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(6), 1004–1060. <https://doi.org/10.2174/138920112800399257>
- Lunguinho, A. da S., Cardoso, M. das G., Ferreira, V. R. F., König, I. F. M., Gonçalves, R. R. P., Brandão, R. M., Caetano, A. R. S., Nelson, D. L., & Remedio, R. N. (2021). Acaricidal and repellent activity of the essential oils of *Backhousia citriodora*, *Callistemon viminalis* and *Cinnamodendron dinisii* against *Rhipicephalus* spp. *Veterinary Parasitology*, *300*, 109594. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109594>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Malvern Panalytical. (2000). *Paint Formulations and the Need for Zeta Potential*. Recuperado de <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/articles/ar100812paintformulations>
- Martínez-Mercado, M. R., Caraballo-Blanco, L. E., & Blanco-Tuirán, P. J. (2019). Babesia bigemina en bovinos del municipio Los Palmitos (Sucre, Colombia). *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 20(1). [https://doi.org/10.21930/rcta.vol20\\_num1\\_art:1248](https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num1_art:1248)
- Martinez-Velazquez, M., Rosario-Cruz, R., Castillo-Herrera, G., Flores-Fernandez, J. M., Alvarez, A. H., & Lugo-Cervantes, E. (2011). Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 48(4), 822–827. <https://doi.org/10.1603/me10140>
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2007). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics. Condensed Matter: An Institute of Physics Journal*, 19(7), 079001. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/19/7/079001>
- Mazarei, Z., & Rafati, H. (2019). Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT*, 100, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.094>
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Melo Martínez, O. O., López Pérez, L. A., & Melo Martínez, S. E. (2020). *Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias. <https://doi.org/10.36385/fcbog-4-0>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Miastkowska, M., & Śliwa, P. (2020). Influence of terpene type on the release from an O/W nanoemulsion: Experimental and theoretical studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2747. <https://doi.org/10.3390/molecules25122747>
- Modarres-Gheisari, S. M. M., Gavagsaz-Ghoachani, R., Malaki, M., Safarpour, P., & Zandi, M. (2019). Ultrasonic nano-emulsification - A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 88–105. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.005>
- Motta Felício, I., Limongi de Souza, R., de Oliveira Melo, C., Gervázio Lima, K. Y., Vasconcelos, U., Olímpio de Moura, R., & Eleamen Oliveira, E. (2021). Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 72(3), 299–306. <https://doi.org/10.1111/lam.13411>
- Mushtaq, A., Mohd Wani, S., Malik, A. R., Gull, A., Ramniwas, S., Ahmad Nayik, G., Ercisli, S., Alina Marc, R., Ullah, R., & Bari, A. (2023). Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. *Food Chemistry: X*, 18(100684), 100684. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100684>
- Nakama, Y. (2017). Surfactants. In K. Sakamoto, R. Y. Lochhead, H. I. Maibach, & Y. Yamashita (Eds.), *Cosmetic Science and Technology* (pp. 231–244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802005-0.00015-x>
- Nava, S., Venzal, J. M., González-Acuña, D., Martins, T. F., & Guglielmone, A. A. (2017). Genera and species of Ixodidae. In *Ticks of the Southern Cone of America* (pp. 25–267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811075-1.00002-9>
- Nayila, I., Sharif, S., Shahzad Lodhi, M., Ullah, R., Alotaibi, A., Maqbool, T., & Hameed, S. (2024). Formulation, characterization and evaluation of anti-breast cancer activity of 2-carene

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- nanoemulsion; *in silico*, *in vitro* and *in vivo* study. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(9), 105937. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105937>
- Nicaretta, J. E., Ferreira, L. L., de Cavalcante, A. S. de A., Zapa, D. M. B., Heller, L. M., Trindade, A. S. N., de Moraes, I. M. L., Salvador, V. F., Leal, L. L. L., da Silva, F. L. V., de Aquino, L. M., Couto, L. F. M., Soares, V. E., Monteiro, C. M. O., & Lopes, W. D. Z. (2023). Influence of the acaricide emulsion pH on the effectiveness of spray products to control the cattle tick: laboratory and field investigations. *Parasitology Research*, 122(10), 2267–2278. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07927-y>
- Ninham, B. W., Larsson, K., & Lo Nostro, P. (2017). Two sides of the coin. Part 1. Lipid and surfactant self-assembly revisited. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 152, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.022>
- Noudeh, G. D., Khazaeli, P., Mirzaei, S., Sharififar, F., & Nasrollaho, S. (2009). Determination of the toxicity effect of sorbitan esters surfactants group on biological membrane. *Journal of Biological Sciences (Faisalabad, Pakistan)*, 9(5), 423–430. <https://doi.org/10.3923/jbs.2009.423.430>
- Novato, T. P., Milhomem, M. N., Marchesini, P. B. C., Coutinho, A. L., Silva, I. S., de Souza Perinotto, W. M., de Azevedo Prata, M. C., Ferreira, L. L., Lopes, W. D. Z., Costa-Júnior, L. M., & de Oliveira Monteiro, C. M. (2022). Acaricidal activity of carvacrol and thymol on acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations and combination with cypermethrin: Is there cross-resistance and synergism? *Veterinary Parasitology*, 310(109787), 109787. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109787>
- Ohkouchi, T., & Tsuji, K. (2022). Basic Technology and Recent Trends in Agricultural Formulation and Application Technology. *Journal of Pesticide Science*, 47(4), 155–171.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

<https://doi.org/10.1584/jpestics.d22-055>

- Oliva Chávez, A. S., Guzman Valencia, S., Lynn, G. E., Rosario, C. A., Thomas, D. B., & Johnson, T. L. (2023). Evaluation of the *in vitro* acaricidal effect of five organic compounds on the cattle fever tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 89(3-4), 447–460. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00780-9>
- Ozogul, Y., Karsli, G. T., Yazgan, H., Kuley, E., Oztop, H. M., Ozogul, F., & Esatbeyoglu, T. (2025). Enhanced pathogen control through thymol and carvacrol Nanoemulsions: A microfluidization approach. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-025-03759-z>
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Pavoni, L., Pavela, R., Cespi, M., Bonacucina, G., Maggi, F., Zeni, V., Canale, A., Lucchi, A., Bruschi, F., & Benelli, G. (2019). Green micro- and nanoemulsions for managing parasites, vectors and pests. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1285. <https://doi.org/10.3390/nano9091285>
- Pérez de León, A. A., Mitchell, R. D., 3rd, & Watson, D. W. (2020). Ectoparasites of cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 36(1), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.004>
- Pinto, I. C., Cerqueira-Coutinho, C. S., Santos, E. P., Carmo, F. A., & Ricci-Junior, E. (2017). Development and characterization of repellent formulations based on nanostructured hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(1), 67–73. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1220564>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Polanco Echeverry, D. N., & Ríos Osorio, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:463](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463)
- Pratap-Singh, A., Guo, Y., Lara Ochoa, S., Fathordoobady, F., & Singh, A. (2021). Optimal ultrasonication process time remains constant for a specific nanoemulsion size reduction system. *Scientific Reports*, 11(1), 9241. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87642-9>
- Preeti, Sambhakar, S., Malik, R., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Rani, C., Saharan, R., Kumar, S., Geeta, & Sehrawat, R. (2023). Nanoemulsion: An emerging novel technology for improving the bioavailability of drugs. *Scientifica*, 2023, 6640103. <https://doi.org/10.1155/2023/6640103>
- Quadros, D. G., Johnson, T. L., Whitney, T. R., Oliver, J. D., & Oliva Chávez, A. S. (2020). Plant-derived natural compounds for tick pest control in livestock and wildlife: Pragmatism or utopia? *Insects*, 11(8), 490. <https://doi.org/10.3390/insects11080490>
- Radwan, I. T., Eltaly, R. I., Baz, M. M., Yousif, M., Selim, A., Taie, H. A. A., Manaa, E. A., & Khater, H. F. (2023). Novel acaricidal and growth-regulating activity of *Aloe vera* and *Rheum rhabarbarum* extracts and their oil/water nanoemulsions against the camel tick, *Hyalomma dromedarii*. *Scientific Reports*, 13(1), 16802. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43776-6>
- Rocha, J. F., Martínez, R., López-Villalobos, N., & Morris, S. T. (2019). Tick burden in *Bos taurus* cattle and its relationship with heat stress in three agroecological zones in the tropics of Colombia. *Parasites & Vectors*, 12(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3319-9>
- Rodríguez, M. M., Oviedo, A. & Castro, L. R. (2024). Reporte de garrapatas duras asociadas a la Reserva ProAves El Dorado, Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Revista Conservación Colombiana*, 29(1), 48–57. <https://doi.org/10.54588/cc.2024v29n1a5>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Rodríguez-Vivas, R. I., Arieta-Román, R. J., Pérez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ramírez-Cruz, G. T., & Basto-Estrella, G. (2010). Use of macrocyclic lactones to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 115–123.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Pérez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martínez, I., Miller, R. J., Li, A. Y., de León, A. P., Guerrero, F., & Klafke, G. (2014a). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, 23(2), 113–122. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014044>
- Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M., Carlos, L., Pérez-Cogollo, & Trinidad-Martínez, I. (2014b). CONTROL INTEGRADO DE GARRAPATAS EN LA GANADERÍA BOVINA. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 295–308. <https://doi.org/10.19136/ERA.A1N3.660>
- Rosado-Aguilar, J. A., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J. F. J., Rodríguez-Vivas, R. I., Bolio-González, M. E., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Gutiérrez-Blanco, E., & Aguilar-Caballero, A. J. (2017). Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Veterinary Parasitology*, 238, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.023>
- Salman, M., Abbas, R. Z., Israr, M., Abbas, A., Mehmood, K., Khan, M. K., Sindhu, Z. U. D., Hussain, R., Saleemi, M. K., & Shah, S. (2020). Repellent and acaricidal activity of essential

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. *Veterinary Parasitology*, 283(109178), 109178. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109178>
- Senbill, H., Hazarika, L. K., Baruah, A., Borah, D. K., Bhattacharyya, B., & Rahman, S. (2018). Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini 1888 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Systematic and Applied Acarology*, 23(6), 1169. <https://doi.org/10.11158/saa.23.6.12>
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(9), 1675–1687. <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>
- Sharma, S., Loach, N., Gupta, S., & Mohan, L. (2020). Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation. *Environmental Nanotechnology Monitoring & Management*, 14(100331), 100331. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100331>
- Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854–867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.037>
- Singh, K., Kumar, S., Sharma, A. K., Jacob, S. S., RamVerma, M., Singh, N. K., Shakya, M., Sankar, M., & Ghosh, S. (2022). Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. *Experimental Parasitology*, 243(108408), 108408. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108408>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Singh, N. S., Sharma, R., Singh, S. K., & Singh, D. K. (2021). A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. *Environmental Research*, 199(111316), 111316. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111316>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Smejkal, G., Gross, V., & Lazarev, A. (2024). Theoretical and experimental determinations of the hydrophilic–lipophilic balance (HLB) of representative oils and lecithins. *Colloids and Interfaces*, 8(2), 21. <https://doi.org/10.3390/colloids8020021>
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3-4), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Sonenshine, D. E., Lane, R. S., & Nicholson, W. L. (2002). TICKS (Ixodida). In G. Mullen & L. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 517–558). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012510451-7/50026-8>
- Souza, R. L. de, Dantas, A. G. B., Melo, C. de O., Felício, I. M., & Oliveira, E. E. (2022). Nanotechnology as a tool to improve the biological activity of carvacrol: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76(103834), 103834. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103834>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Spare, M. R., Hanzlicek, G. A., Wootten, K. L., Anderson, G. A., Thomson, D. U., Sanderson, M. W., Ganta, R. R., Reif, K. E., & Raghavan, R. K. (2020). Bovine anaplasmosis herd prevalence and management practices as risk-factors associated with herd disease status. *Veterinary Parasitology: X*, 3, 100021. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100021>
- Sugumar, S., Clarke, S. K., Nirmala, M. J., Tyagi, B. K., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of Entomological Research*, 104(3), 393–402. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000710>
- Su, L., Guo, J., Xiong, Y., Jin, P., Zheng, Y., & Wu, Z. (2025). Nanoarray systems enhanced cellulose paper-based air filter with sustained antimicrobial and effective filtration. *Journal of Membrane Science*, 735(124604), 124604. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2025.124604>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304–318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tavares, C. P., Sabadin, G. A., Sousa, I. C., Gomes, M. N., Soares, A. M. S., Monteiro, C. M. O., Vaz, I. S., Jr, & Costa-Junior, L. M. (2022). Effects of carvacrol and thymol on the antioxidant and detoxifying enzymes of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(3), 101929. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101929>
- Terry, A. V., Jr. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3), 355–365.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.001>

- Underwood, W. J., Blauwiel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., & Schoell, A. (2015). Biology and diseases of ruminants (sheep, goats, and cattle). In J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.), *Laboratory Animal Medicine* (pp. 623–694). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409527-4.00015-8>
- Vanegas-Estévez, T., Duque, F. M., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Méndez-Sánchez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105721>
- Varma, R. K., Kaushal, R., Junnarkar, A. Y., Thomas, G. P., Naidu, M. U., Singh, P. P., Tripathi, R. M., & Shridhar, D. R. (1985). Polysorbate 80: a pharmacological study. *Arzneimittel-Forschung*, *35*(5), 804–808. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4026903/>
- Vecino, J. A. C., Echeverri, J. A. B., Cárdenas, J. A., & Herrera, L. A. P. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, *11*(1), 73–84. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol11\\_num1\\_art:197](https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:197)
- Villar, D., Gutierrez, J., Piedrahita, D., Rodríguez-Durán, A., Cortés-Vecino, J. A., Góngora-Orjuela, A., Martínez, N., & Chaparro-Gutiérrez, J. J. (2016). Resistencia *in vitro* a acaricidas tópicos de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de cuatro departamentos de Colombia. *CES Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, *11*(3), 58–70. <https://doi.org/10.21615/CESMVZ.11.3.6>
- Wang, P., & Wu, Y. (2021). A review on colloidal delivery vehicles using carvacrol as a model bioactive compound. *Food Hydrocolloids*, *120*(106922), 106922.

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106922>

Wang, Q., Zhang, H., Han, Y., Cui, Y., & Han, X. (2023). Study on the relationships between the oil HLB value and emulsion stabilization. *RSC Advances*, *13*(35), 24692–24698.

<https://doi.org/10.1039/d3ra04592g>

Welsh, J. A., Braun, H., Brown, N., Um, C., Ehret, K., Figueroa, J., & Boyd Barr, D. (2019). Production-related contaminants (pesticides, antibiotics and hormones) in organic and conventionally produced milk samples sold in the USA. *Public Health Nutrition*, *22*(16), 2972–2980. <https://doi.org/10.1017/S136898001900106X>

Xavier, E. S., de Souza, R. L., Rodrigues, V. C., Melo, C. O., Roquini, D. B., Lemes, B. L., Wilairatana, P., Oliveira, E. E., & de Moraes, J. (2022). Therapeutic efficacy of carvacrol-loaded nanoemulsion in a mouse model of schistosomiasis. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 917363. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.917363>

Yaima Yate, J., & Díaz Rivera, E. (2022). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Murrell & Barker, 2003 (Ixodida: Ixodidae) evaluación de la efectividad de acaricidas sobre sus poblaciones en el Tolima medio. *Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas*, *26*(1), 25–40. <https://doi.org/10.17151/bccm.2022.26.1.2>

Yan, Z., Tian, Y., Hu, J., Yao, Z., & Fuller, G. G. (2025). Revising HLB theory for surface tension prediction of the aqueous solution of asphalt emulsifiers. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*, *715*(136663), 136663. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.136663>

Yener, G., Dal, O., & Uner, M. (2009). Effect of vehicles on release of meloxicam from various topical formulations. *The Open Drug Delivery Journal*, *3*(1), 19–23. <https://doi.org/10.2174/1874126600903010019>

## FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

- Zanela da Silva Marques, T., Santos-Oliveira, R., Betzler de Oliveira de Siqueira, L., Cardoso, V. da S., de Freitas, Z. M. F., Barros, R. de C. da S. A., Villa, A. L. V., Monteiro, M. S. de S. de B., Dos Santos, E. P., & Ricci-Junior, E. (2018). Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 2827–2837. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164404>
- Zielińska, A., Ferreira, N. R., Feliczak-Guzik, A., Nowak, I., & Souto, E. B. (2020). Loading, release profile and accelerated stability assessment of monoterpenes-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Pharmaceutical Development and Technology*, *25*(7), 832–844. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1744008>
- Zimdahl, R. L. (2018). Herbicide Formulation. In *Fundamentals of Weed Science* (pp. 501–509). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811143-7.00017-2>

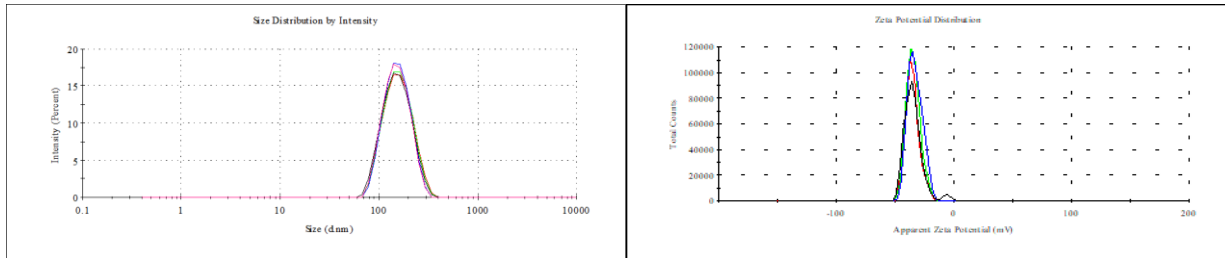
# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Anexos

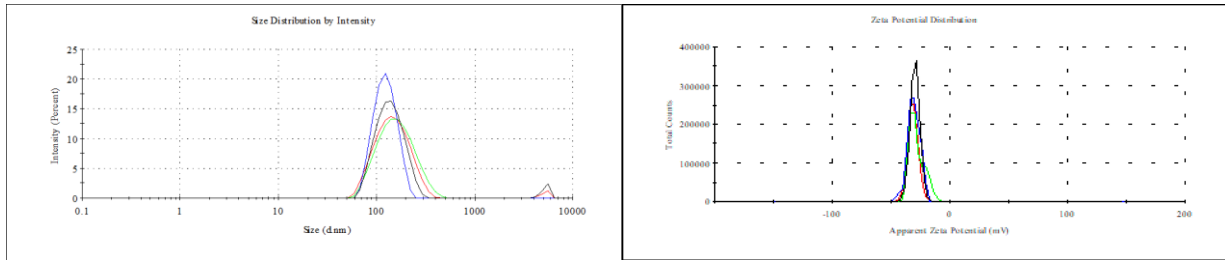
### Anexo 1

*Distribución del tamaño de partícula y del potencial zeta de las gotas de las nanoemulsiones de carvacrol con HLB 15(1), 9.65(2), 7(3), 5(4) y 4.3(5) el mismo día de su preparación.*

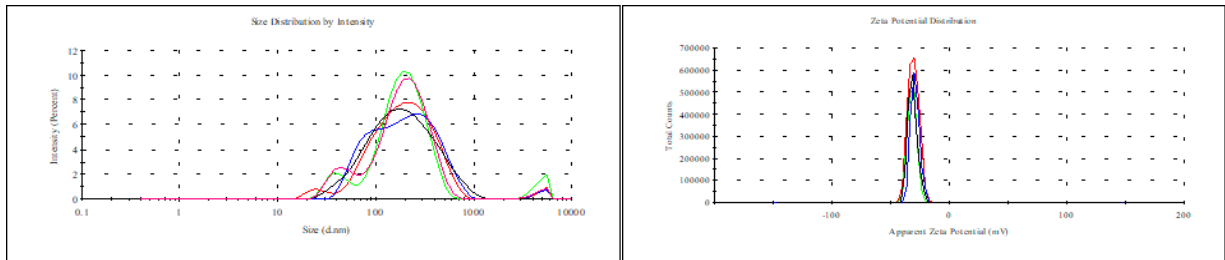
#### NE 1a



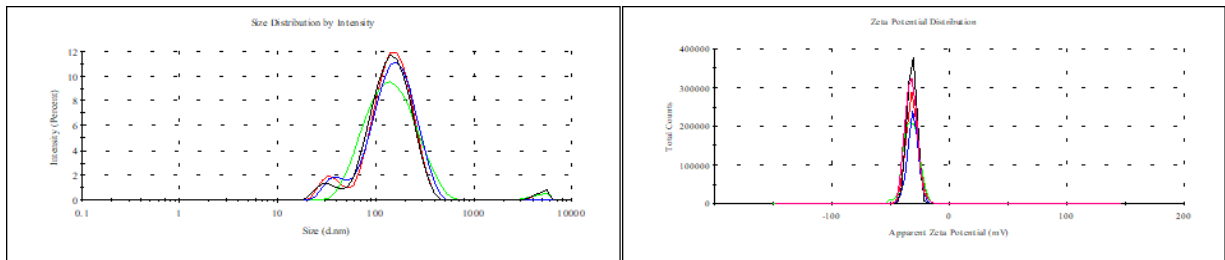
#### NE 1b



#### NE 2a

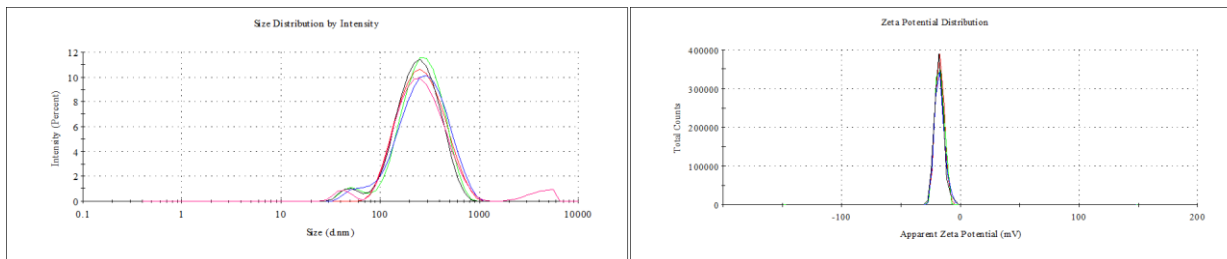


#### NE 2b

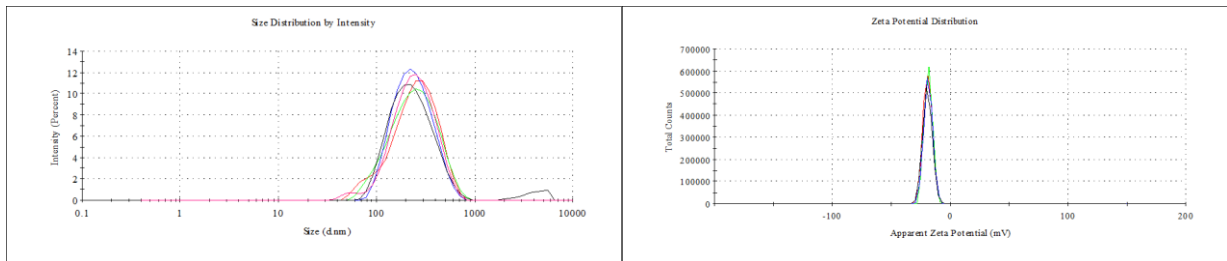


# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

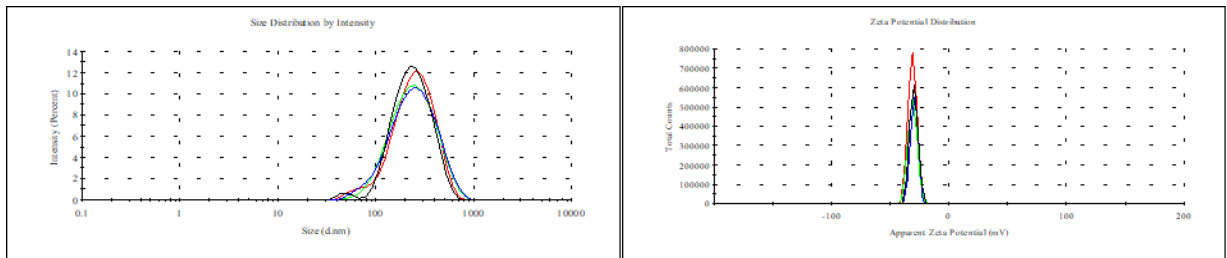
NE 3a



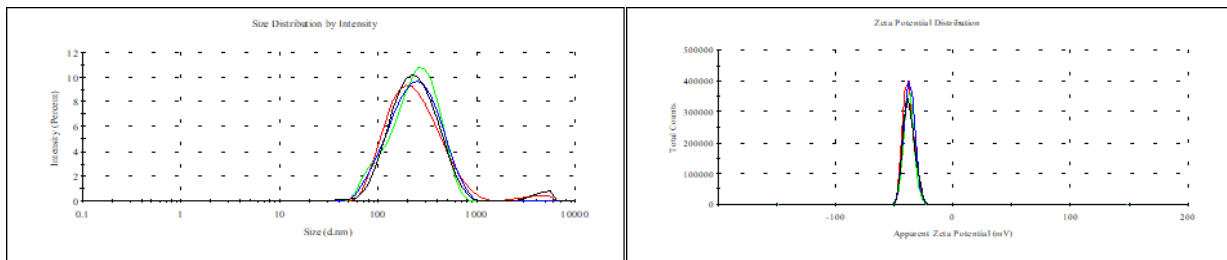
NE 3b



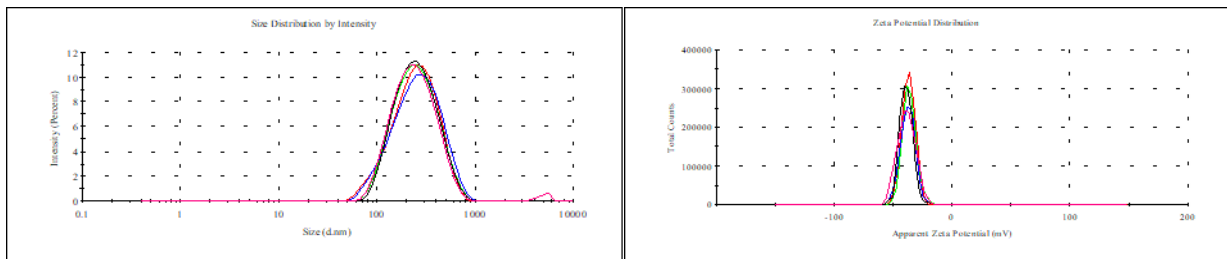
NE 4a



NE 4b



NE 5b

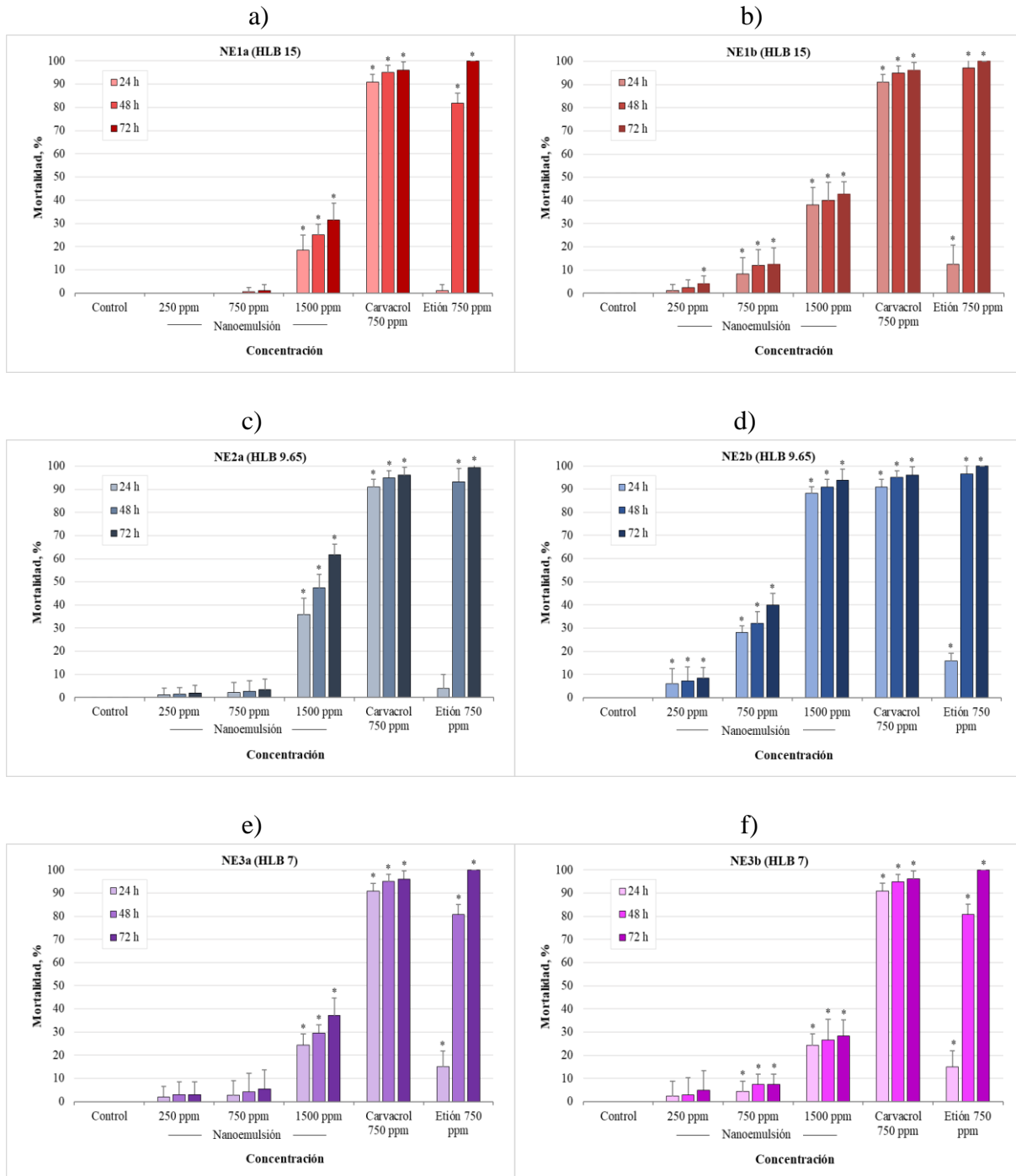


**Nota.** Las letras a y b indican los tiempos de sonicación de 3 y 7 minutos, respectivamente.

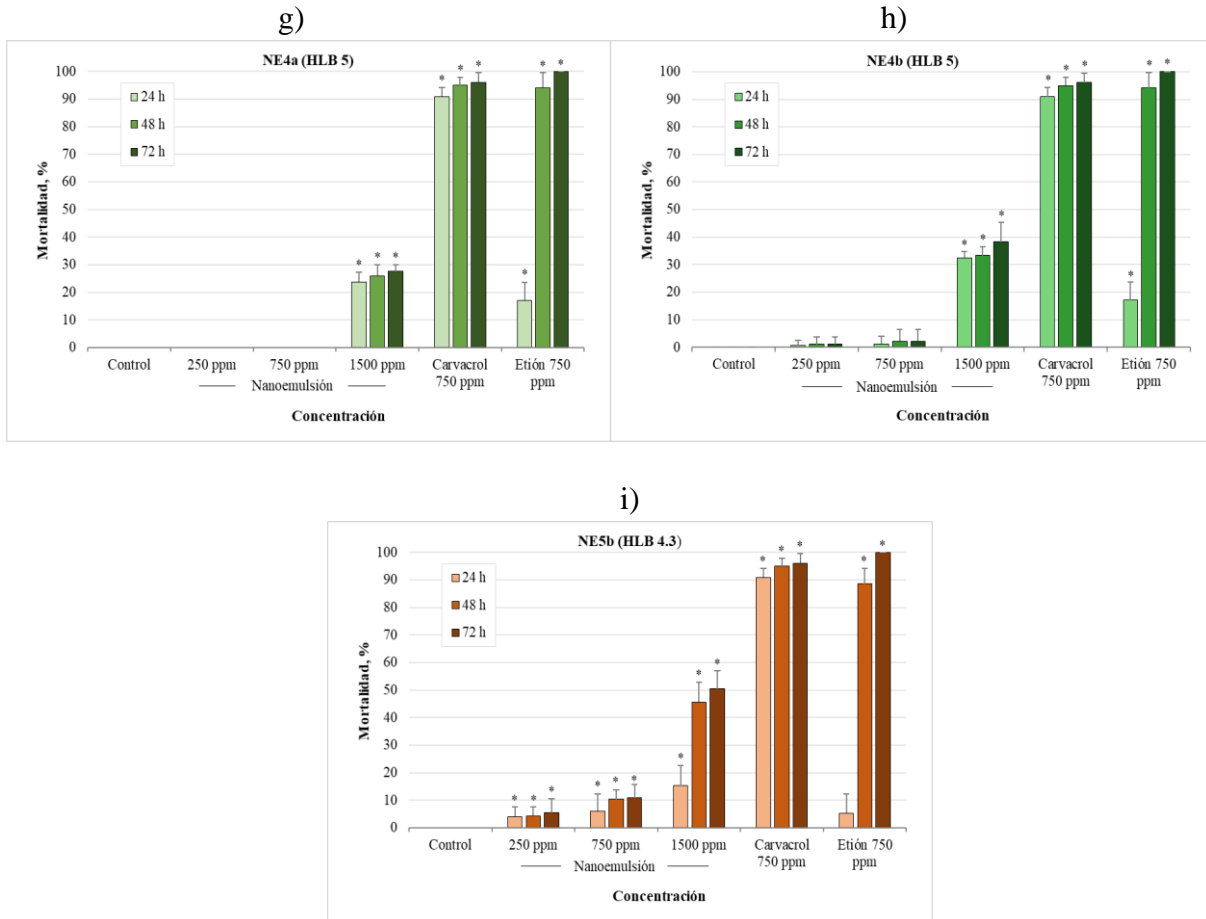
# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Anexo 2

Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones evaluadas mediante el método del paquete larval. Las letras a), b), c), d), e), f), g), h) e i) corresponden a las nanoemulsiones NE 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b y 5b, respectivamente.



# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL



**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ), que consistió en una mezcla de los tensoactivos utilizados en cada nanoemulsión.

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Anexo 3

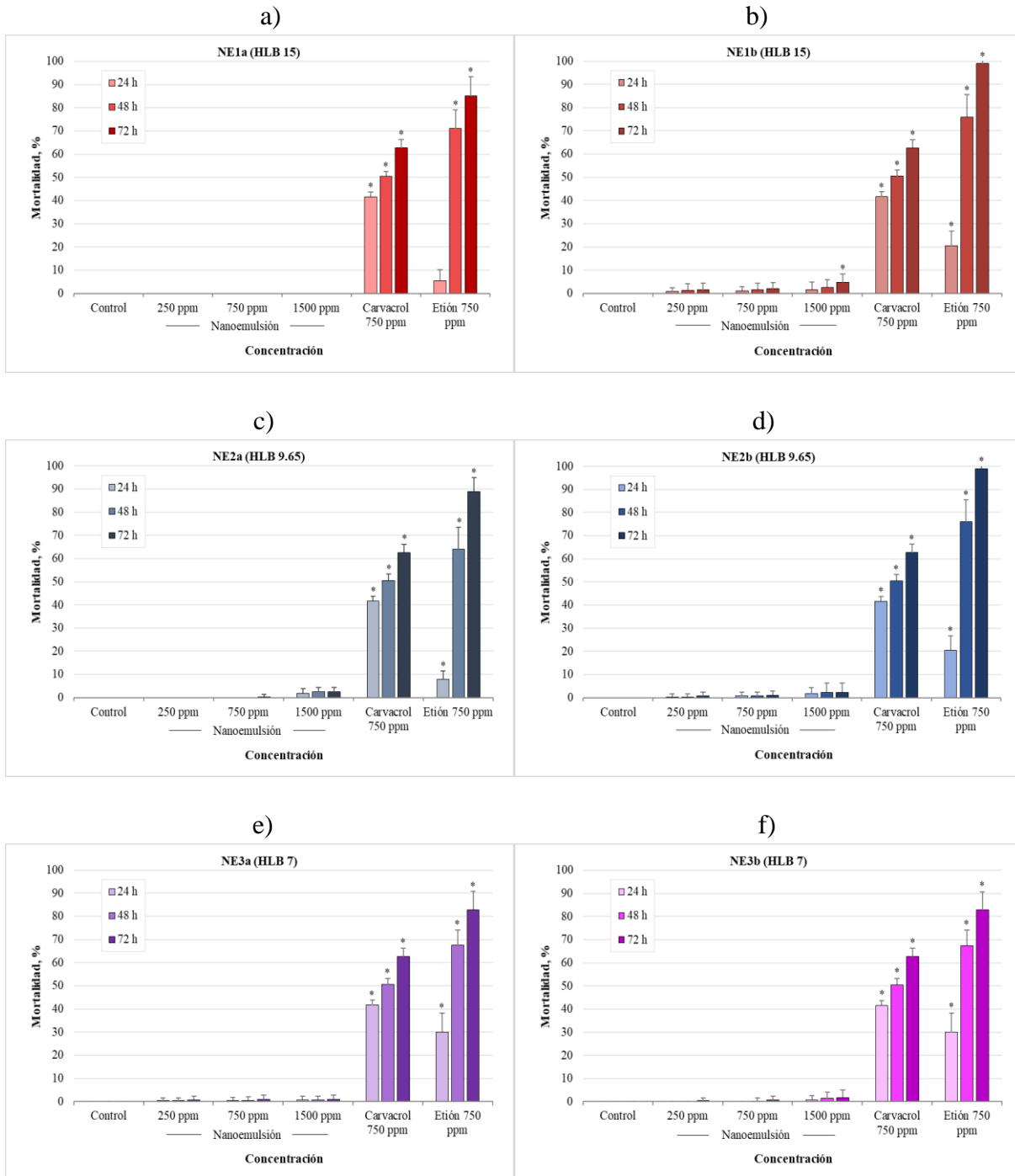
*Datos de mortalidad obtenidos para cada control positivo (Etión 750 ppm) por el método del paquete larval.*

N° NE	Tiempo de lectura		
	24 h	48 h	72 h
1a	1.1 ± 2.6	81.8 ± 4.3	100 ± 0
1b	12.5 ± 8.3	97.2 ± 3.5	100 ± 0
2a	3.9 ± 6.0	93.3 ± 5.8	99.4 ± 1.9
2b	15.8 ± 6.9	80.8 ± 4.3	100 ± 0
3a	15.0 ± 6.9	80.8 ± 4.3	100 ± 0
3b	15.0 ± 6.9	80.8 ± 4.3	100 ± 0
4a	17.1 ± 6.5	94.2 ± 5.6	100 ± 0
4b	17.1 ± 6.5	94.2 ± 5.6	100 ± 0
5b	5.3 ± 6.9	88.7 ± 5.5	100 ± 0

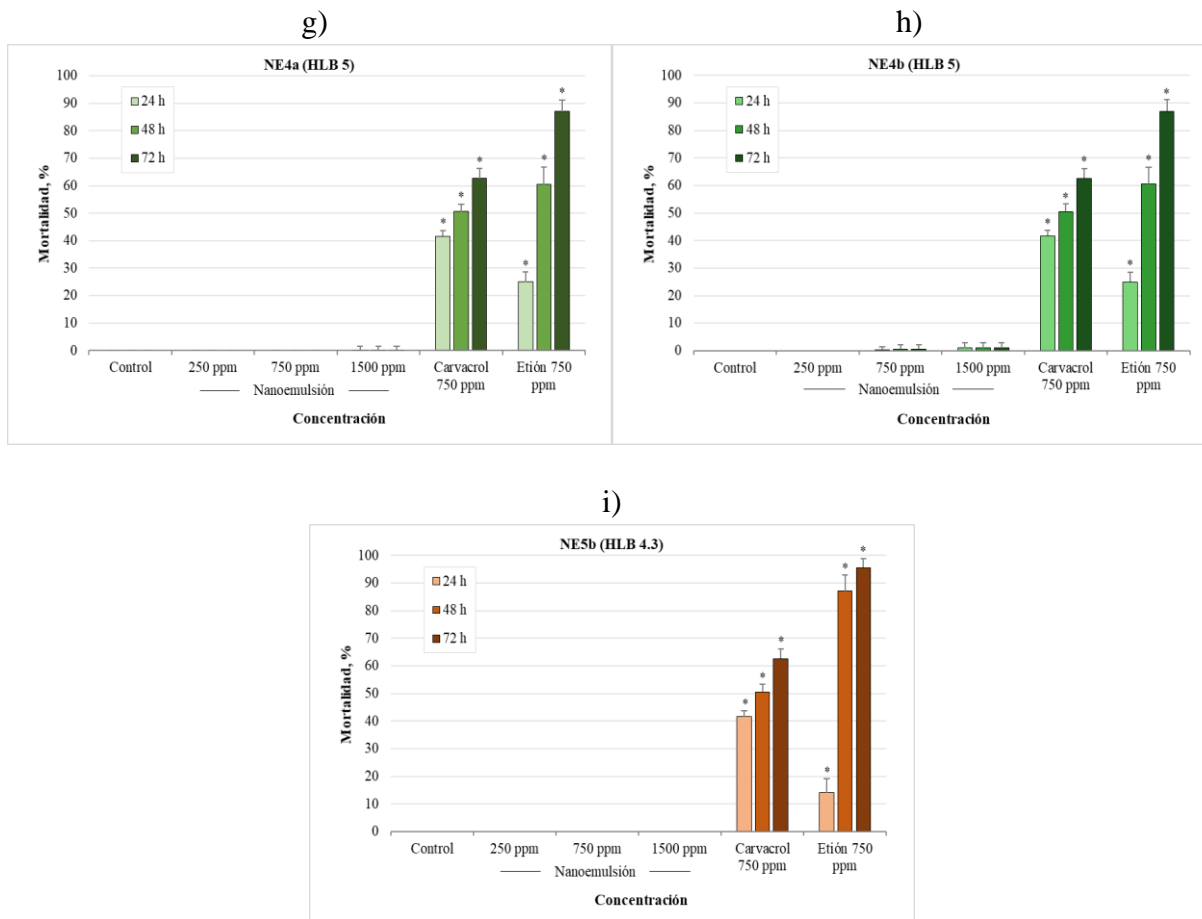
# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

## Anexo 4

Resultados de mortalidad con concentraciones diagnósticas de carvacrol en nanoemulsiones evaluadas mediante el método de inmersión larval. Las letras a), b), c), d), e), f), g), h) e i) indican las nanoemulsiones 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b y 5b, respectivamente.



# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL



**Nota.** Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ).

# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

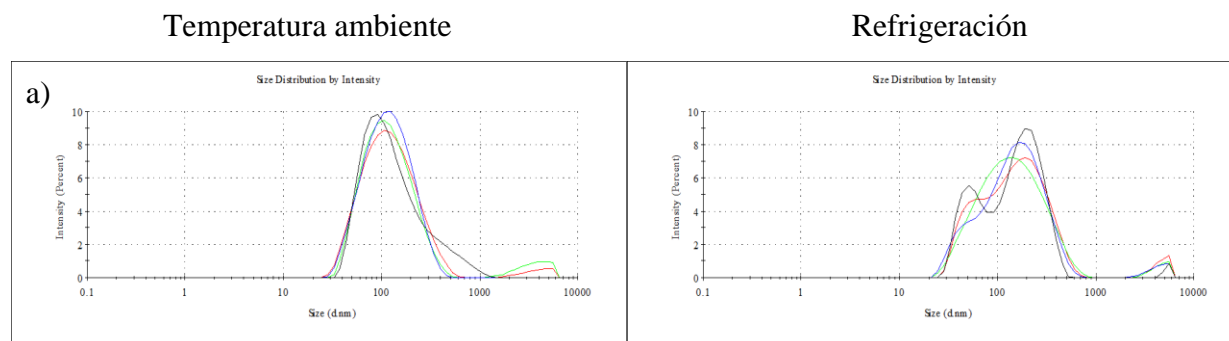
## Anexo 5

Datos de mortalidad obtenidos para cada control positivo (Etión 750 ppm) por el método de inmersión larval.

N° NE	Tiempo de lectura		
	24 h	48 h	72 h
1a	5.5 ± 4.8	71.0 ± 8.2	85.1 ± 8.2
1b	20.5 ± 6.2	76.0 ± 9.5	99.0 ± 2.8
2a	8.0 ± 3.6	64.0 ± 9.5	89.0 ± 6.0
2b	20.5 ± 6.2	76.0 ± 9.5	99.0 ± 2.8
3a	30.0 ± 8.3	67.5 ± 6.6	82.9 ± 7.9
3b	30.0 ± 8.3	67.5 ± 6.6	82.9 ± 7.9
4a	25.0 ± 3.5	60.5 ± 6.2	87.0 ± 4.1
4b	25.0 ± 3.5	60.5 ± 6.2	87.0 ± 4.1
5b	14.0 ± 5.1	87.1 ± 5.9	95.6 ± 3.3

## Anexo 6

Distribución del tamaño de partícula por intensidad de la nanoemulsión NE2b almacenada durante a) 7 y b) 14 días, respectivamente.



# FORMULACIÓN DE UN BIOPRODUCTO ACARICIDA CON CARVACROL

