



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA

“Formulación y caracterización de nanoemulsiones utilizando fitoquímicos con actividad insecticida”.

P R E S E N T A

IBQ. Soraya Cobarrubias Carapia

Tesis presentada al Departamento de Ingeniería Bioquímica como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Director de Tesis

Dr. Francisco Villaseñor Ortega

Co-Director de Tesis

Dr. Gabriel Luna Bárcenas

Celaya, Guanajuato, México.

Junio 2020

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mi el ejemplo de esfuerzo y perseverancia, por estar conmigo en todo momento, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso.

A mi hermana y amigas, por apoyarme cuando más las necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

Agradezco a mis directores de tesis, quienes con su experiencia, conocimiento y motivación me orientaron en la investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|------------|
| Índice general..... | <i>i</i> |
| Índice de figuras..... | <i>III</i> |
| Índice de tablas | V |
| Resumen | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Antecedentes..... | 4 |
| 1.1 <i>Annona muricata</i> | 4 |
| 1.1.1 Importancia del fruto de <i>A. muricata</i> | 5 |
| 1.1.2 Producción del fruto de <i>A. muricata</i> en México..... | 6 |
| 1.1.3 Principales plagas y enfermedades | 7 |
| 1.2 <i>Bephratelloides cubensis</i> Ashmead | 7 |
| 1.2.1 Taxonomía y descripción morfológica | 7 |
| 1.2.2 Biología y hábitos..... | 10 |
| 1.2.3 Daños ocasionados a <i>A. muricata</i> | 12 |
| 1.2.4 Métodos de control | 12 |
| 1.2.4.1 Mecánico y cultural | 12 |
| 1.2.4.2 Biológico | 13 |
| 1.2.4.3 Químico | 13 |
| 1.3 Insecticidas a base de nanotecnología con aplicación en el sector agrícola..... | 14 |
| 1.3.1 Nanoemulsión..... | 15 |
| 1.3.1.1 Métodos de preparación..... | 16 |
| 1.3.1.1.1 Procesos de alta energía..... | 16 |
| 1.3.1.1.2 Método de baja energía..... | 17 |
| 1.3.1.2 Estabilidad de las nanoemulsiones | 18 |
| 1.3.1.3 Caracterización de las nanoemulsiones | 19 |
| 1.3.1.4 Surfactantes | 20 |

| | |
|---|----|
| Justificación | 22 |
| Hipótesis | 23 |
| Objetivo general | 24 |
| Objetivos específicos..... | 24 |
| 2 Materiales y métodos..... | 25 |
| 2.1 Materiales | 25 |
| 2.2 Metodología..... | 25 |
| 2.2.1 Primera etapa de experimentos..... | 25 |
| 2.2.2 Segunda etapa de experimentos..... | 27 |
| 2.2.3 Tercera etapa de experimentos | 28 |
| 2.2.4 Cuarta etapa de experimentos..... | 30 |
| 2.2.5 Caracterización fisicoquímica | 31 |
| 2.2.5.1 Tamaño de partícula y carga eléctrica superficial | 31 |
| 2.2.5.2 Morfología | 32 |
| 2.2.6 Análisis estadístico | 32 |
| 3 Resultados y discusión..... | 33 |
| 3.1 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la primera etapa de experimentos..... | 33 |
| 3.2 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la segunda etapa de experimentos..... | 37 |
| 3.3. Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la tercera etapa de experimentos..... | 42 |
| 3.4 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones del cuarto diseño de experimentos | 47 |
| Conclusiones..... | 63 |
| Bibliografía..... | 65 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Barrenador de semilla <i>B. cubensis</i> (a) macho (b) hembra. | 8 |
| Figura 1.2 Características de <i>B. cubensis</i> (a) vista lateral del escutelo (b) el propodeo liso sin celdas setigera. | 9 |
| Figura 1.3 Etapas de crecimiento de <i>B. cubensis</i> , (a) larva, (b) pupa (c) huevo. | 10 |
| Figura 1.4 Ciclo de vida de <i>B. cubensis</i> utilizando como hospedante el fruto de <i>A. muricata</i> | 11 |
| Figura 2.1 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando dos métodos de alta energía. | 27 |
| Figura 2.2 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando uno y dos métodos de alta energía. | 28 |
| Figura 2.3 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando dos métodos de alta energía, aumentando el tiempo de tratamiento. | 30 |
| Figura 3.1 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 0. | 34 |
| Figura 3.2 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 30, se mantienen estables las formulaciones. | 34 |
| Figura 3.3 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 44, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con el 50% de cosurfactante en la fase continua. | 35 |
| Figura 3.4 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 60, no se observan nuevos cambios. | 35 |
| Figura 3.5 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 90, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y con 20% y 31% de surfactante en la fase dispersa. | 36 |
| Figura 3.6 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 0. | 38 |
| Figura 3.7 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 30, se mantienen estables las formulaciones. | 38 |
| Figura 3.8 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 36, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con el 50% cosurfactante en la fase continua. | 39 |
| Figura 3.9 Nanoemulsiones al día 60, no se observan nuevos cambios. | 39 |
| Figura 3.10 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 88, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y con 20% y 31% de surfactante en la fase dispersa. | 39 |
| Figura 3.11 Nanoemulsiones de la segunda etapa procesadas únicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 0. | 41 |
| Figura 3.12 Nanoemulsiones de la segunda etapa procesadas únicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 30, se observa separación de fases en todas las muestras. | 41 |
| Figura 3.13 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 0. | 43 |
| Figura 3.14 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 26, se observa separación de fases en las elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80%. | 43 |
| Figura 3.15 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 30, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80% y en las nanoemulsiones con 87.5% cosurfactante en la fase continúa al 80%. | 44 |
| Figura 3.16 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 33, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80%, en las muestras con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 80% y en las formulas con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 90%. | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.17 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 38, se observó separación de fases en todas las muestras. | 45 |
| Figura 3.18 Nanoemulsiones de la tercera etapa procesadas unicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 0. | 45 |
| Figura 3.19 Nanoemulsiones de la tercera etapa procesadas unicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 16, se observa separación de fases en todas las muestras..... | 46 |
| Figura 3.20 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela a) día 0 b) día 30 c) día 42 presenta separación de fases. | 48 |
| Figura 3.21 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela durante el almacenamiento a temperatura ambiente..... | 48 |
| Figura 3.22 Nanogotas de forma esférica observadas atraves de TEM. | 49 |
| Figura 3.23 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 50 |
| Figura 3.24 Conductividad y pH y de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 51 |
| Figura 3.25 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A a) día 0 b) día 30 c) día 60 presenta separación de fases. | 51 |
| Figura 3.26 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A durante el almacenamiento a temperatura ambiente..... | 52 |
| Figura 3.27 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 53 |
| Figura 3.28 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 54 |
| Figura 3.29 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B a) día 0 b) día 30 c) día 60 d) día 90 e) día 105 presenta separación de fases. | 55 |
| Figura 3.30 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B durante el almacenamiento a temperatura ambiente..... | 55 |
| Figura 3.31 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y mentol como ingrediente bioactivo elevando la temperatura a 70°C antes de la medición..... | 56 |
| Figura 3.32 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 57 |
| Figura 3.33 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B a) día 0 b) día 30 c) día 60 d) día 83 presenta separación de fases. | 58 |
| Figura 3.34 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B durante el almacenamiento a temperatura ambiente..... | 59 |
| Figura 3.35 Nanogotas de forma esférica observadas atraves de TEM. | 59 |
| Figura 3.36 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición..... | 60 |
| Figura 3.37 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1.1 Desarrollo del cultivo de <i>A. muricata</i> en México. | 6 |
| Tabla 1.2 Clasificación taxonómica de <i>Bephratelloide cubensis</i> | 7 |
| Tabla 1.3 Duración de los estados biológicos de <i>B. cubensis</i> | 11 |
| Tabla 1.4 Ejemplos de insecticidas naturales y sintéticos. | 13 |
| Tabla 2.1 Diseño de experimentos con cosurfactante y agua en la fase continua al 90% en combinación con aceite de citronela y surfactante al 10% a diferentes concentraciones. Se muestran los porcentajes por etapas y el total de la nanoemulsión. | 26 |
| Tabla 2.2 Diseño de experimentos adicionando los compuestos bioactivos a diferentes concentraciones, cosurfactante al 75 y 87.5%, relación fase continua al 80 y 90% en fase dispersa en un 10 y 20%. Se muestran los porcentajes por etapas y en el total de la nanoemulsión. | 29 |
| Tabla 2.3 Diseño de experimentos con 25% cosurfactante, 75% agua en la fase continua al 90% en combinación de citronela, surfactante y compuestos bioactivos. | 31 |
| Tabla 3.1 Mediciones de tamaños de partícula de las diferentes formulaciones y análisis estadístico. | 37 |
| Tabla 3.2 Mediciones de tamaños de partícula de las diferentes formulaciones de la segunda etapa y análisis estadístico. | 40 |
| Tabla 3.3 Tamaño de partícula de las emulsiones dependiendo del o los métodos de alta energía al que fueron sometidos y análisis estadístico de la comparación de los procesos de elaboración en cada formulación. | 42 |
| Tabla 3.4 Tamaño de partícula de las nanoemulsiones en función del o los métodos de alta energía al que fueron sometidos. | 47 |
| Tabla 3.5 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela durante el almacenamiento a temperatura ambiente. | 48 |
| Tabla 3.6 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 49 |
| Tabla 3.7 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 50 |
| Tabla 3.8 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A durante el almacenamiento a temperatura ambiente. | 52 |
| Tabla 3.9 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 53 |
| Tabla 3.10 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A, al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 54 |
| Tabla 3.11 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B durante el almacenamiento a temperatura ambiente. | 55 |
| Tabla 3.12 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 56 |
| Tabla 3.13 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 57 |

| | | |
|------------|---|----|
| Tabla 3.14 | Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B durante el almacenamiento a temperatura ambiente. | 58 |
| Tabla 3.15 | Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición. | 60 |
| Tabla 3.16 | Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm. | 61 |

RESUMEN

En el 2016, se reportó que la producción de *Annona muricata* a nivel nacional se vio seriamente afectada por la infestación del insecto barrenador de la semilla, *Bephratelloides cubensis*. Diversas estrategias han sido implementadas para tratar de eliminar este tipo de plagas, destacando el uso de diversos insecticidas sintéticos (malation, dimetoato, cipermetrina, azadiractina e imidacloprid). Sin embargo, este tipo de compuestos se han correlacionado con efectos tóxicos sobre el fruto, ocasionando la caída de la flor y frutos pequeños por que se aplican en altas concentraciones y en repetidas ocasiones con la finalidad de contrarrestar la infestación. Debido a esto, se requieren de nuevas estrategias que tengan la capacidad de incidir directamente en la repelencia de *B. cubensis* sin tener efectos adversos sobre el fruto, fauna u otro tipo de insectos polinizadores. Una de las estrategias que han surgido en los últimos años con resultados prometedores es la aplicación de sistemas nanométricos para la liberación controlada de diversos compuestos sintéticos o naturales que ayuden a evitar la presencia de plagas, y al mismo tiempo bajar la toxicidad de dichos compuestos en las cosechas, en suelo circundante y en otro tipo de organismos.

El presente estudio se enfocó en la formulación de nanoemulsiones aceite en agua con un efecto repelente e insecticida adquirido por sus componentes, los cuáles fueron estabilizados y emulsificados por la presencia de un surfactante. Las emulsiones formuladas con 25% de cosurfactante en la fase continua y surfactante al 11% en la fase dispersa, en una relación 90:10, son las que presentaron estabilidad física hasta por 120 días, con tamaños de partículas iniciales de 126.27 ± 9.84 y finales de 253.97 ± 26.37 nm, con carga superficial negativa desde -25.7 ± 1.31 hasta -14.83 ± 0.93 mV, la micrografía TEM reveló la forma esférica de las nanogotas. Estos parámetros son los que convierten a esta formulación en la más estable.

Finalmente, se obtuvo una nanoemulsion estable durante 4 meses, que puede ser utilizado como repelente de insectos y que al mismo tiempo es amigable con el medio ambiente, al no generar efectos colaterales en el fruto, en suelos, aguas u otros insectos polinizadores que se encuentren cerca de este tipo de cosechas.

ABSTRACT

In 2016, it was reported that the production of *Annona muricata* nationwide was severely affected by the infestation of the seed borer insect, *Bephratelloides cubensis*. Various strategies have been implemented to try to eliminate these types of pests, highlighting the use of various synthetic insecticides (malathion, dimethoate, cypermethrin, azadirachtin and imidacloprid). However, these types of compounds have been correlated with the toxic effects on the fruit, causing the fall of the flower and small fruits so it is in large concentrations and repeatedly in order to counteract the infestation. Due to this, new strategies will be needed that can directly influence the repellency of *B. cubensis* without having adverse effects on the fruit, wildlife or other types of pollinating insects. One of the strategies that have emerged in recent years with promising results is the application of nanometric systems for the controlled release of various synthetic or natural compounds that help prevent the presence of pests, and at the same time lower the toxicity of these compounds in crops, in surrounding soil and in other organisms.

The present study focused on the formulation of oil-in-water nanoemulsions with a repellent and insecticidal effect acquired by its components, those affected were stabilized and emulsified by the presence of a surfactant. The emulsions formulated with 25% cosurfactant in the continuous phase and 11% surfactant in the dispersed phase, in a 90:10 ratio, those have physical stability up to 120 days, with initial particle dimensions of 126.27 ± 9.84 and final of 253.97 ± 26.37 nm, with a negative surface charge from -25.7 ± 1.31 to -14.83 ± 0.93 mV, the TEM micrograph revealed the spherical shape of the nanogout. These parameters are what changed this formulation the most stable.

Finally, a stable nanoemulsion was obtained during 4 months, which can be used as an insect repellent and at the same time is friendly to the environment, without generating side effects on the product, on soils, water or other pollinating insects found near this kind of crops.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el segundo lugar de producción de *Annona muricata* después de Brasil, se produce principalmente en los estados de Nayarit, Oaxaca, Guerrero, Colima, Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas. El fruto de *A. muricata* tiene un gran potencial de comercialización no solo por su sabor y fragancia característico, sino también por su aporte de nutrientes, como: flavonoides, vitamina C, acetogeninas, antocianinas y carotenoides.

Las plagas y enfermedades que pueden presentarse en el cultivo y causar daños importantes son: barrenador de las semillas, chinche café, cochinilla rosada, gusano rayado, picudo rojinegro, antracnosis y pudrición blanda de frutos; siendo el barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* el más importante, infestando del 60 al 80% de los frutos de todo el país.

Para defender los cultivos de estas problemáticas, se han realizado técnicas mecánicas y químicas, sin embargo, los métodos mecánicos pueden no proteger idóneamente a los frutos y los químicos utilizan compuestos que suelen ser altamente nocivos para el mismo cultivo, medioambiente e insectos polinizadores. Por lo anterior es que se pensó en el uso de la nanotecnología a través de la formulación de nanoemulsiones.

Una nanoemulsión consiste en una fase dispersa de naturaleza lipídica en una fase continua de naturaleza acuosa, en la cual, cada una de las gotas de aceite se encuentra rodeada por una capa interfacial delgada constituida por un emulgente. Por lo general, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional debido a su pequeño tamaño de partícula, así mismo, muestran alta resistencia a la agregación, ya que el rango de fuerzas de atracción entre las gotas disminuye a medida que disminuye el tamaño de las mismas (Silva *et al.*, 2012).

Debido a que las nanoemulsiones son sistemas que no pueden formarse espontáneamente y por lo tanto requieren de la aplicación de energía para su formación, esta energía puede suministrarse por métodos de dispersión (alta energía) o por métodos fisicoquímicos (baja energía).

ANTECEDENTES

1.1 *Annona muricata*

La guanábana (*Annona muricata*) pertenece al género *Annona* y a la familia Annonaceae, es originaria de América y África tropical, con la llegada de los españoles a América fue distribuida en los trópicos y hoy en día es posible encontrarla en el oeste de la India, en norte y sur de América, islas del pacífico y en el sureste de Asia (Badrie y Schauss, 2010). Su óptimo desarrollo es a una altitud menor a 1,200 m snm, temperatura media entre 25 y 28 °C y humedad relativa entre 60% y 80% (Pinto & Williams, 2005).

No se ha encontrado descripción referente a las variedades de guanábana; sin embargo, existen clasificaciones botánicas diferentes en cada país. Además, se presentan diferentes tipos de guanábana clasificados según el sabor, la forma y la consistencia de la pulpa (Hernández *et al.*, 2017).

La planta de *A. muricata* es un árbol de 3 a 10 m de alto, ramificado, cónico, frondoso, con hojas ovaladas elípticas de 2 a 6 cm de ancho por 6 a 12 cm de largo, con yemas axilares. La raíz es pivotante con anclaje ramificado fuerte, el mayor porcentaje se encuentra en los primeros 30 cm de profundidad. Las flores son hermafroditas, distribuidas a lo largo del tallo y en las axilas; los frutos se constituyen en una baya producto de múltiples ovarios.

El fruto de *A. muricata* está clasificado como múltiple de forma oblonga cónica, semejante a un corazón o de forma irregular, esto último es debido a un desarrollo inapropiado del carpelo o vacíos producidos por insectos; el fruto alcanza los 10 a 30 cm de longitud con un peso de entre 1 a 10 kg, con cáscara de color verde oscuro que posee varias espinas pequeñas, suaves y carnosas.

Cuando el fruto está maduro la cáscara es de color verde mate y adquiere una consistencia blanda con apariencia verticulada. La pulpa es de color blanco, cremosa, aromática, jugosa y suave, adherida a la cutícula, pero se separa fácilmente en segmentos y recubre totalmente las semillas negras que tienen dimensiones en promedio de 1 a 2 cm de largo y de 0.33 a 0.59 g de peso, cada fruto puede tener hasta 200 semillas. La pulpa contiene 80-83% de agua, 1% de proteínas, 14-18% de hidratos de carbono, 3.43% de acidez titulable, 24.5% de azúcares no reductores y vitaminas B₁, B₂, y C (Montalvo-González *et al.*, 2018).

Los frutos de *A. muricata* se cosechan en punto de madurez fisiológica, lo cual coincide con su máximo tamaño, con la pérdida de rigidez de los rudimentos estilares y cambio en la tonalidad de la epidermis, pasando de un verde oscuro a un verde más claro (mate). El índice de cosecha se da 160 días después de la antesis cuando el fruto adquiere el color verde claro o amarillento. El corte del fruto se realiza manualmente con tijera de podar, dejando de 2 a 3 cm del pedúnculo adherido al fruto, se recomienda utilizar escaleras para recolectar los frutos de las partes altas del árbol, sin afectar las ramas. La guanábana presenta un ciclo largo (120-180 días) desde la floración hasta la formación del fruto en su índice de cosecha; por lo tanto, requiere una alta inversión de recursos para obtener un producto de calidad que debe conservarse en las prácticas de cosecha y pos cosecha (Jiménez-Zurita *et al.*, 2018).

1.1.1 Importancia del fruto de *A. muricata*

Annona muricata produce un fruto muy apreciado por su pulpa comestible de textura suave y fibrosa con un rico sabor agridulce y un aroma delicado; además de poseer un alto contenido de nutrientes, fitoquímicos y antioxidantes (Cardozo *et al.*, 2013). El fruto tiene un alto potencial para su uso tanto para consumo en fresco como para su procesamiento debido a las características antes mencionadas y el alto rendimiento del mismo, haciendo de la pulpa una materia prima atractiva para preparar bebidas, bases para helados, dulces, gelatinas y jaleas, entre otros (Janick y Paull, 2008). Los usos medicinales de la familia Annaceae se reportaron hace tiempo y desde entonces, esta especie ha atraído la atención debido a su bioactividad y toxicidad. Estudios etnobotánicos han indicado que *A. muricata* ha sido utilizado como insecticida (Leatemala y Isman, 2004) y parasiticida (Langenberger *et al.*, 2009). El zumo de frutas y las infusiones de hojas y ramas se han utilizado para tratar la fiebre (Betancur-Galvis *et al.*, 1999; Dagar y Dagar, 1991; Magaña *et al.*, 2010), sedante (Joyeux *et al.*, 1995), enfermedades respiratorias (Beyra, *et al.*, 2004; Kossouoh, *et al.*, 2007), malaria (Nguyen-Pouplin *et al.*, 2007), problemas gastrointestinales (Atawodi, 2011; Magaña *et al.*, 2010), afecciones hepáticas, cardíacas y renales (Badrie y Schauss, 2010). En los últimos años se ha utilizado ampliamente para la hipoglucemia (Desouza *et al.*, 2011), hipotensivo (Hajdu y Hohmann, 2012) cáncer (Monigatti *et al.*, 2013).

1.1.2 Producción del fruto de *A. muricata* en México

México es el principal productor de *A. muricata* en el mundo, con 23,715 toneladas al año y un valor comercial de 159 millones de pesos (SIAP, 2016). El cultivo de este frutal ha tenido un crecimiento constante en los últimos siete años al pasar de 1,949.9 ha en el 2007 a 2,975.9 ha en el 2016, con un incremento neto de 1,026 ha en total y 146.6 ha por año, lo que representa un incremento de 52.6% en la superficie plantada.

El aumento más importante se observa en el valor de la producción al pasar de \$82 a \$159.8 millones de pesos en ese mismo periodo (**Tabla 1.1**), lo cual representa un incremento de 94.8%, representando un importante aumento del precio medio rural. La producción de *A. muricata* en México se localiza en 11 estados y los principales son Nayarit, Colima, Veracruz, Michoacán y Guerrero. Siendo los más importantes Nayarit y Colima, con el 78 % de la producción nacional en una superficie de 2,353 ha, con un valor de producción de 83,163 miles de pesos y generan empleos directos e indirectos para 2600 familias (SIAP, 2015).

Tabla 1.1 Desarrollo del cultivo de *A. muricata* en México.

| Año | Superficie sembrada (ha) | Producción (t) | Rendimiento (kg/ha) | Valor producción (miles de pesos) |
|-------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|--|
| 2005 | 1301.5 | 6,672 | 6,890 | 15,178.4 |
| 2006 | 1,301.5 | 13,192.4 | 10,140 | 27,946.4 |
| 2007 | 2,029.8 | 14,365.2 | 7,080 | 59,401.2 |
| 2008 | 2,034.2 | 17,255.9 | 8,480 | 66,947.5 |
| 2009 | 1,269.7 | 13,021.3 | 10,260 | 59,611.3 |
| 2010 | 1,644.5 | 12,787.8 | 8,150 | 55,991.0 |
| 2011 | 1,631.8 | 14,960.1 | 9,220 | 57,314.3 |
| 2012 | 1,983.0 | 14,254.6 | 8,450 | 54,795.9 |
| 2013 | 1,978.6 | 15,259.0 | 9,050 | 78,830.4 |
| 2014 | 1,978.6 | 14,357.5 | 8,740 | 100,051.8 |
| 2015 | 1,985.1 | 10,695 | 6,250 | 66,559.9 |

Fuente: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp

1.1.3 Principales plagas y enfermedades

Las plagas y enfermedades que pueden presentarse en el cultivo y causar daños importantes son: barrenador de las semillas, chinche café, cochinilla rosada, gusano rayado, picudo rojinegro, antracnosis y pudrición blanda de frutos (Hernández, Gómez, & Orozco, 2014).

La plaga que causa el mayor daño del cultivo de la *A. muricata* es ocasionado por el barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* en el cultivo de anonáceas, el cual causó para el año 2016 el 100% de infestación de frutos de *A. muricata* en todos los estados mexicanos donde se produce (Hernández *et al.*, 2014).

1.2 *Bephratelloides cubensis* Ashmead

El género *Bephratelloides* (= *Bephrata*) (Eurytomudae: Eurytominae) es de origen Neotropical y se alimenta exclusivamente de semillas del género *Annona* (Hernández *et al.*, 2014).

1.2.1 Taxonomía y descripción morfológica

Bephratelloides es el único género de esta familia que se alimenta de las semillas de frutos *Annona*, en la **Tabla 1.2** se puede observar su clasificación taxonómica.

Tabla 1.2 Clasificación taxonómica de *Bephratelloide cubensis*.

| | |
|---------|---|
| Clase | Insecta |
| Orden | Hymenoptera |
| Familia | Eurytomidae |
| Genero | <i>Bephratelloides</i> (= <i>Bephrata</i>) |
| Especie | <i>Cubensis</i> Ashmead |

(Hernández *et al.*, 2014)

El barrenador de la semilla *B. cubensis* presenta dimorfismo sexual, incluso se pueden diferenciar con facilidad desde el estado de pupa, el macho es más pequeño que la hembra, mide

de 6 a 7 mm de longitud, café claro amarillento (**Fig. 1.1a**), flagelmeros cilíndricos y antenas más largas que en las hembras, extendiéndose hasta la punta del ala, el abdomen es corto, no se comprime lateralmente y se curva distalmente hacia abajo, los tarsos anteriores son elongados, *B. cubensis* presenta una alta variación en tamaño y color influenciada por la región geográfica y el hospedante (Hernández *et al.*, 2014).

La hembra mide de 4 a 9.5 mm de longitud, el cuerpo es café oscuro y amarillento, abdomen comprimido lateralmente curvado hacia su base (**Fig. 1.1b**) y peciolo corto, antenas son cilíndricas, más corta que la del macho y no se extiende hacia la punta del ala, tiene 10 segmentos, escapo pequeño amarillo claro, pedicelo triangular ensanchándose de la base hacia el ápice, son elevadas y proyectadas hacia delante, mandíbulas de forma cuadrangular. Palpos maxilares de cuatro segmentos y palpos labiales de tres. Tórax más largo que ancho de color café oscuro a café rojizo; alas hialinas usualmente con venación marcada transparentes y con una mancha oscura en la región estigma, entre la vena submarina y el ápice de la vena estigma (Hernández *et al.*, 2014).

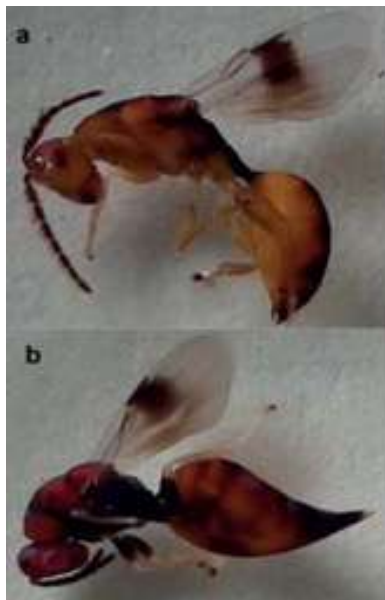


Figura 1.1 Barrenador de semilla *B. cubensis* (a) macho (b) hembra.

(Hernández *et al.*, 2014)

Expansión alar de 11 a 12 cm. Cabeza tipo hipognata, amarillo ocre y vertex de color negro brillante. Escutelo redondeado apicalmente, en vista lateral se observa arqueado y no tiene una marcada proyección dorsalmente (**Fig. 1.2a**), propodeo con una superficie lisa en la parte media (**Fig. 1.2b**), sin celdas setíferas, vena cubital con setas basales.

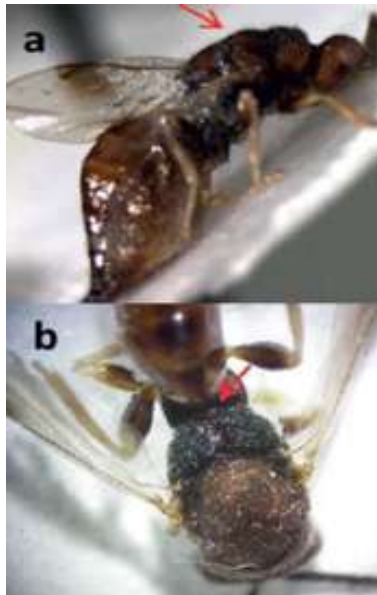


Figura 1.2 Características de *B. cubensis* (a) vista lateral del escutelo (b) el propodeo liso sin celdas setigera.

(Hernández *et al.*, 2014)

Patas largas, amarillentas, con las coxas y parte basal de los fémures oscuros, abdomen más largo que la cabeza y el tórax unidos, parte distintiva del género *Bephratelloides* es el ovopositor, mide de 8 a 8.5 mm de longitud, ligeramente más largo del abdomen, presenta placa subgenital con 2 prolongaciones caudales triangulares y anchas, primer valvífer alargado, segundo valvífer curvado con una canaleta en el borde extremo, segundas valvas alargadas, delgadas, unidas en su base a las primeras valvas, terceras valvas aplanadas, y cóncavas las cuales forman una cubierta de protección donde se aloja el ovopositor (Hernández *et al.*, 2014). El huevo es color blanco amarillento (**Fig. 1.3c**), ovalado, de 0.2 mm de largo y 0.1 mm de ancho con el polo posterior caudado. En el extremo anterior presenta un filamento delgado cuya longitud es varias veces el tamaño del huevo. El corion del huevo es blando al momento de ser depositado y el filamento es un conducto para verter el contenido y expandir el huevo dentro de la semilla.

La larva es de color blanco lechoso, ligeramente curvada, con la cabeza diferenciada del resto del cuerpo (**Fig. 1.3a**), completamente desarrollada alcanza los 7.5 mm de longitud y 2 mm en su parte más ancha (Hernández *et al.*, 2008). La pupa es de color blanco lechoso al inicio y se torna café posteriormente, en este estado es posible diferenciar los sexos (**Fig. 1.3b**), de tamaño es semejante al adulto.



Figura 1.3 Etapas de crecimiento de *B. cubensis*, (a) larva, (b) pupa (c) huevo.

(Hernández *et al.*, 2014)

1.2.2 Biología y hábitos

B. cubensis causa daños básicamente en estado de larva y al momento de la emergencia de los adultos. Se reproduce sexual y asexualmente, presenta reproducción partenogenética por telitoquia (emergencia de hembras en su mayoría). La hembra al emerger del fruto, si encuentra un hospedante cercano susceptible de ovipositar, puede reproducirse a los pocos minutos. Oviposita en los frutos pequeños conocidos comúnmente como “cepillos o erizos”, éstos miden de 3 a 7 centímetros de diámetro, inserta el huevo en la semilla donde emerge la larva para alimentarse del endospermo, pasa el estado de pupa dentro y emerge como adulto, cuando el fruto cae en los huertos se pudre la mayor parte quedando solo las semillas, dentro de las cuales es posible encontrar pupas meses después, es probable que sea una estrategia de supervivencia durante la época en que hay pocos o ningún fruto para ovipositar. El insecto emerge de frutos próximos a cosechar, perfora la semilla y realiza una galería con las mandíbulas en la pulpa hasta llegar a la superficie del fruto, esta perforación es de 1 a 2 mm de diámetro. *B. cubensis* tiene actividad diurna, en un estudio de comportamiento de las hembras realizado por Hernández *et al.*, (2010) quienes observaron que la actividad inicia alrededor de las 9 am, antes de esto se

oculta el follaje del estrato superior, entre las principales actividades que el insecto realiza están la ovoposición, la cual se acentúa alrededor del mediodía, el resto de las actividades consisten en el reposo y vuelo sobre el follaje. El insecto se alimenta de néctar de frutos maduros de guanábana, savia de frutos pequeños la cual brota al momento de ser picados para ovipositar y de agua de rocío durante las primeras horas de la mañana. *B. cubensis* tiene metamorfosis completa y la mayor parte de su ciclo biológico ocurre dentro de las semillas de su hospedante, el tiempo que el insecto tarda en cada etapa de su desarrollo está influenciado por la especie de hospedante como se indica en la **Tabla 1.3** (Hernández *et al.*, 2014).

Tabla 1.3 Duración de los estados biológicos de *B. cubensis*.

| Estado | Hospedante y tiempo de duración (días) |
|---------------|--|
| Huevo | 12 a 24 |
| Larva | 23 a 50 |
| Pupa | 13 a 34 |
| Adulto | 15 a 22 |

(Hernández *et al.*, 2014)

Las larvas, las cuales se desarrollan de forma individual dentro de la semilla, duran un periodo de 23 a 50 días y pasan por 5 instares. Las pupas duran de 13 a 34 días y los adultos hembras viven hasta 22 días y los machos 15 días. El ciclo de *B. cubensis* dura de 63 a 130 días, con un promedio de 95 días en el cultivo de *A. muricata* (**Fig. 1.4**)

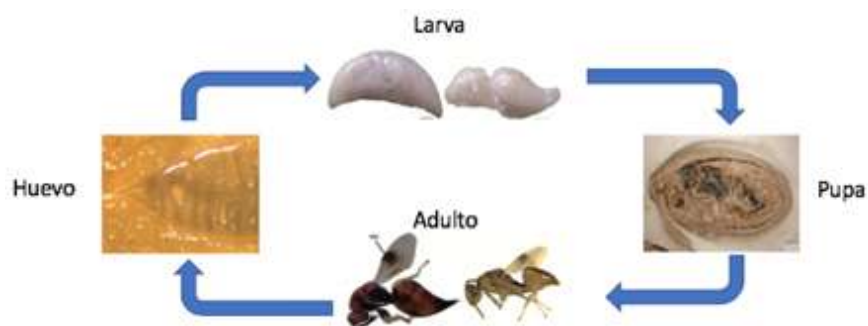


Figura 1.4 Ciclo de vida de *B. cubensis* utilizando como hospedante el fruto de *A. muricata*.

(Hernández *et al.*, 2014)

1.2.3 Daños ocasionados a *A. muricata*

El daño directo que *B. cubensis* provoca en los frutos hospedantes puede decirse que no repercute directamente en el rendimiento, ya que se alimenta básicamente del endospermo de las semillas y el daño físico no es significativo, el daño consiste en hacer hoyos desde la semilla a través de la pulpa hasta llegar al exterior del fruto para la emergencia de los adultos (Hernández *et al.*, 2014).

La importancia del *B. cubensis* radica en que estos hoyos posteriormente serán la entrada para hongos patógenos, además de hormigas y pequeños insectos coleópteros los cuales provocan una rápida descomposición del fruto (Hernández *et al.*, 2014).

Las perforaciones miden desde 0.1 a 0.15 cm de diámetro, el *B. cubensis* prefiere ovipositar en frutos de guanábana cuyo diámetro va desde 3.1 a 7.6 cm., con poca disponibilidad de frutos la hembra se ve forzada a ovipositar en frutos de cualquier tamaño, la dureza de la semilla y la distancia desde las cutículas hasta donde se ubica la semilla dentro del fruto juega un papel importante ya que la hembra deposita el huevo dentro de las semillas (Hernández *et al.*, 2014).

Cuando *B. cubensis* inserta el ovopositor en el fruto, este secreta compuestos azucarados de los cuales se alimenta la hembra y sirven asimismo de medio de cultivo para hongos fitopatógenos (Hernández *et al.*, 2014).

1.2.4 Métodos de control

1.2.4.1 Mecánico y cultural

Los métodos mecánicos y culturales pueden ser preventivos y correctivos, son medidas directas e indirectas que se aplican para el control de plagas de los insectos, estas pueden ser mediante la eliminación del insecto, perturbar la actividad fisiológica normal o modificar el medio ambiente a un nivel que sea insoportable para el insecto. El control de *B. cubensis* mediante métodos mecánicos puede realizarse al eliminar los frutos caídos y aquellos que permanecen

aún adheridos con síntomas de enfermedades poco antes de la maduración fisiológica, es decir, antes de que los adultos emerjan. Una práctica que puede ejercer el 100% de control es el embolsado de los frutos cuando éstos tienen menos de 3.1 cm de diámetro (Hernández *et al.*, 2008), se utiliza malla antiáfidos que se puede retirar y reutilizar cuando los frutos alcancen más de 7 cm de diámetro.

1.2.4.2 Biológico

El control biológico de *B. cubensis* ha sido poco explorado, hasta el momento no se ha encontrado parasitoide o depredador asociado. En *B. maculicollis*, especie muy cercana al BS, la cual también daña a las anonáceas, se evaluó el efecto del hongo *Paecilomyces lilacinus*, obtenido de un aislamiento de suelo con aplicación tópica a nivel laboratorio, con una concentración de 6.4×10^7 conidios/mL se observó 100% de mortalidad a los cuatro días después de la aplicación (Murcia y Salamanca, 2006). No obstante, se requieren productos formulados y su evaluación en el campo.

1.2.4.3 Químico

Los insecticidas son sustancias que matan a los insectos por medio de su acción química, física o biológica, en la mayoría de los casos, se hace referencia a productos químicos que matan a los insectos. Los insecticidas pueden clasificarse en naturales y sintéticos. En la **tabla 1.4** se presentan algunos ejemplos de ambos grupos de insecticida (Hernández *et al.*, 2008).

Tabla 1.4 Ejemplos de insecticidas naturales y sintéticos.

| Naturales | Sintético |
|------------|--------------|
| Nicotina | DDT |
| Piperina | Malation |
| Mentol | Cipermetrina |
| Piretrinas | Imidacloprid |
| Rotenona | Aldrin |

El principal método de control de *B. cubensis* es mediante el uso de insecticidas, se han evaluado diferentes productos, algunos de ellos con eficacia cercana al 100%. Fuentes *et al.*, (2008) aplicaron en dos ocasiones metoato y cipermetrina 40 g de ingrediente activo en 100 L de agua al observar frutos menores a 3 cm de diámetro, con el dimetoato se obtuvo 0.75% de semillas infestadas en la primera evaluación y 5.9% en la segunda y con cipermetrina 0.8% y 17.83%, respectivamente, mientras que el testigo sin aplicación se observó una infestación de 20 y 35%, respectivamente. Estos mismos autores reportan toxicidad (caída de flor y frutos pequeños) del malation en guanábano al aplicar 1 g de ingrediente activo/L de agua.

Los tratamientos químicos y biológicos se utilizan generalmente para el control de insectos, sin embargo, en los últimos años, la concientización sobre la toxicidad de los tratamientos químicos (uso de pesticidas), el resurgimiento, la resistencia de las plagas y la contaminación ambiental ha llevado a la investigación hacia aplicaciones verdes, seguras y no tóxicas en el control de plagas por esta razón se cree que una nanoemulsión con efecto insecticida dirigida al fruto puede tener los siguientes beneficios: menor cantidad de plaguicida aplicado al ambiente, efecto disuasivo de la ovoposición, menor efecto contra depredadores y parasitoides de otras plagas entre otros, además es necesario elaborar nuevas formulaciones con ingredientes de menor impacto ambiental utilizando insecticidas naturales como lo es el mentol (Kamatou, *et al.*,2013) piperina (Scott *et al.*, 2008) y citronela (Maia y Moore, 2011).

1.3 Insecticidas a base de nanotecnología con aplicación en el sector agrícola

El término “nanomaterial” generalmente se refiere a materiales con dimensiones externas o estructuras internas que están en el orden de nanómetros (máximo 100-200 nm) de acuerdo con el European Standardization Comité, International Organization for Standardization (ISO) y la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE). Esta definición incluye a los líquidos y sus formulaciones, como micelas en una emulsión (norma ISO 14644-6:2007). Materiales utilizados como acarreadores de sustancias activas se denominan nanoacarreadores aun cuando sus dimensiones puedan ser de hasta 1,000 nm. Sin embargo, si la sustancia activa está en el orden de 100-200 nm o menos, el sistema completo se considera como un nanomaterial. Los nanoplaguicidas caen dentro la clasificación anterior si se formulan dentro del intervalo de hasta 100-200 nm aun cuando el sistema completo pueda tener un tamaño de

hasta 1,000 nm. Algunos plaguicidas que se han reportado en la literatura se han nombrado “nanoplaguicidas” por intereses comerciales aun sin serlo. Es importante el desarrollo de productos que sean económicamente viables mediante métodos de preparación y estabilización apropiados sigue siendo motivo de investigación y desarrollo por empresas como Bayer, Syngenta, FMC, entre otros. El objetivo de los nanoplaguicidas, a diferencia de las formulaciones comunes es incrementar la solubilidad baja de los ingredientes activos, liberar el ingrediente activo de forma lenta y controlada, además, protege el ingrediente activo de la degradación prematura.

1.3.1 Nanoemulsión

Una nanoemulsión consiste en una fase dispersa de naturaleza lipídica en una fase continua de naturaleza acuosa, en la cual, cada una de las gotas de aceite se encuentra rodeada por una capa interfacial delgada constituida por un emulgente. A pesar de que la mayoría de los autores mencionan que las nanoemulsiones solamente pueden ser producidas del tipo aceite en agua (O/W), (Zuidam y Nedović, 2010) reportaron la producción de emulsiones del tipo agua en aceite (W/O). En ambos casos, el tamaño de gota formado en las emulsiones debe estar dentro del rango de la escala nano (100 a 500 nm).

Por lo general, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional debido a su pequeño tamaño de partícula, asimismo, muestran alta resistencia a la agregación, ya que el rango de fuerzas de atracción entre las gotas disminuye a medida que disminuye el tamaño de gota (Silva *et al.*, 2012). Las nanoemulsiones generalmente contienen de 5 a 20% de gotas de aceite / lípidos en el caso de emulsiones O / W, aunque a veces puede ser significativamente más grande (hasta 70%).

Debido a que las nanoemulsiones son sistemas que no pueden formarse espontáneamente y por lo tanto requieren de la aplicación de energía para su formación, esta energía puede suministrarse por métodos de dispersión (alta energía) o por métodos fisicoquímicos (baja energía).

1.3.1.1 Métodos de preparación

Debido a que la unión de un compuesto lipídico y uno acuoso no puede presentarse de manera natural o espontánea, la formación de nanoemulsiones necesita la aplicación de energía. Respecto a la cantidad de energía empleada para su formación, los procesos han sido clasificados en dos grandes grupos: aquellos que emplean una baja cantidad de energía y los que utilizan una cantidad de energía alta (Ezhilarasi *et al.*, 2013). Como su nombre lo indica, la diferencia entre ellos radica en la cantidad de energía suministrada al sistema. La secuencia de excipiente y la adición de compuestos influyen en el resultado final.

1.3.1.1.1 Procesos de alta energía

La formación de nanoemulsiones mediante procesos de alta energía se caracteriza por someter al sistema a la aplicación de una alta cantidad de energía previamente determinada; dicha energía brinda al sistema una predisposición para mantener su estabilidad a pesar de que se lleven a cabo modificaciones en su composición. Estos procesos se basan en el empleo de dispositivos mecánicos que generan las fuerzas disruptivas necesarias para lograr el rompimiento de las fases macroscópicas. De manera general, estos procesos han mostrado mayor eficiencia tanto en tiempo de formación de las nanoemulsiones como en reducción de tamaño de las gotas de la fase dispersa, sin embargo, su aplicación a nivel industrial aún es escasa (Qian & McClements, 2011). Los principales procesos de alta energía son:

- Homogenización altas presiones: De acuerdo a Donsì y colaboradores en 2010, el método más eficiente y de mayor rendimiento para la producción de nanoemulsiones, es la homogeneización por altas presiones (hap), también denominado microfluidización. Debido al alto nivel de presión que se le aplica al fluido, el cual está por encima de los 300 MPa en sistemas comerciales, se ejercen elevadas tensiones de fluido mecánico al hacerlo pasar por una pequeña válvula, lo que contribuye a la reducción del tamaño de gota de la emulsión por debajo de la escala micrométrica.
- Ultrasonido: El fenómeno principal que se presenta durante este proceso y permite la formación de las nanoemulsiones es denominado cavitación (Mahdi Jafari *et al.*, 2006). Las

ondas de ultrasonido en el rango de 20 a 100 kHz, tienen la habilidad de llevar a cabo cambios físicos y químicos al entrar en contacto con la materia.

Cuando una superficie plana vibra con cierta frecuencia y amplitud, se generan ondas longitudinales y se propagan en el medio líquido o gaseoso circundante. Estas ondas inducen un movimiento en las partículas del medio a través de una serie de compresiones y rarefacciones bajo presión fluctuante, provocando el fenómeno de cavitación acústica.

La cavitación es la formación y colapso de cavidades de vapor dentro de un líquido fluido; el colapso de estas cavidades provoca poderosas ondas de choque que se irradian a lo largo de la solución, rompiendo así el líquido disperso.

El efecto intenso de las ondas al colapsar explica el porqué de la obtención de gotas de tan pequeño tamaño que permiten la formación de emulsiones dentro de la escala nano (Abbas *et al.*, 2013; Mahdi Jafari *et al.*, 2006). Los principales parámetros que se evalúan y tienen impacto en la formación de nanoemulsiones, son la frecuencia, potencia y tiempo de tratamiento.

- **Agitación a altas velocidades:** La velocidad de la agitación de alto cizallamiento puede disminuir el tamaño de la gota de la fase interna, pero la preparación de la emulsión con el tamaño promedio de la gota de menos de 200 - 300 nm es bastante difícil (Koroleva y Yurtov, 2012). Cuando se agrega una fase viscosa al sistema como una alta viscosidad del aceite, la eficiencia de la agitación de alto cizallamiento disminuirá y dará como resultado la formación de tamaño de gota. La inversión de fase es el método de emulsificación de baja energía que proporciona el pequeño rango de gotas que tiene un tamaño inferior a 50 nm (Bernardi *et al.*, 2011). Los métodos combinados incluyen agitación de alta cizalla para obtener una macroemulsión que contiene sustancias especiales como primer paso. La difusión posterior de nanoemulsionantes a través del límite de la interfase da como resultado la formación de gotitas de nanoemulsión.

1.3.1.1.2 Método de baja energía

Cuando en un sistema en equilibrio termodinámico cambian las variables del sistema como la temperatura y la composición (salinidad, relación O/W, etc), éste pasa a una condición de desequilibrio con una energía libre mayor. En estas condiciones se producen transiciones de

fases que, en sistemas conteniendo surfactante, producen emulsiones con tamaño de gota pequeño (Ostertag *et al.*, 2012). Entre los métodos fisicoquímicos utilizados para obtener nanoemulsiones se encuentra:

- Inversión de fases por temperatura, de sus siglas en inglés PIT (phase inversion temperature) se basa en los cambios de la curvatura óptima (geometría molecular) o en la solubilidad de los surfactantes no iónicos donde se produce la inversión de una emulsión O/W a W/O (o viceversa) por disminución o incremento de temperatura, la fuerza impulsora para este tipo de inversión de fase son los cambios en las propiedades fisicoquímicas del surfactante con la temperatura (Shinoda y Saito, 1968).
- Punto de inversión de la emulsión, de sus siglas en inglés EIP (emulsion inversion point) se produce una inversión de fases W/O a O/W usando un surfactante en particular, luego se va agregando agua o aceite en un sistema de agitación continua hasta que la concentración de gotas de agua o aceite es tan alta que se empaquetan muy juntas y la emulsión alcanza un punto de inversión de fases (Ostertag *et al.*, 2012).

1.3.1.2 Estabilidad de las nanoemulsiones

Debido a que la mayoría de los estudios describe la alta estabilidad cinética de las nanoemulsiones, a continuación se consideran los factores que influyen en este hecho. Teniendo en cuenta que la agitación térmica en gotas menores a 0.5 μm de diámetro (movimiento Browniano) es mayor que la velocidad de sedimentación producida por la fuerza de gravedad puede decirse que las nanoemulsiones son estables respecto al mecanismo de sedimentación. La floculación, no está claro si las gotas pueden adherirse por deformación y formar una película plana. Por una parte, la presión de Laplace es muy grande en las gotas pequeñas y podría oponerse a la deformación de las gotas, pero la agitación térmica de las gotas incrementa los choques, facilitando la deformación de las mismas. Estudios efectuados sobre la estabilidad de las nanoemulsiones describen su estabilidad respecto a la coalescencia, se considera que las moléculas de surfactante que estabilizan las gotas de las nanoemulsiones son adsorbidas en la interfase agua/componente oleoso en forma de monocapas, aunque se ha descrito que otras estructuras como bicapas y multicapas de surfactante podrían tener importancia en la estabilización de nanoemulsiones. Otros estudios reportan que las gotas de las nanoemulsiones

se comportan como esferas rígidas, bajo estas condiciones las gotas no se deforman lo suficiente para formar una película plana entre gotas flocladas evitándose la coalescencia (Nor Bainun *et al.*, 2015) el principal mecanismo de desestabilización de las nanoemulsiones es la maduración de Ostwald, el cual consiste en el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. Este mecanismo es altamente dependiente de las condiciones iniciales de las nanoemulsiones, es decir del grado de polidispersión de las gotas y de las interacciones entre éstas. La velocidad de maduración de Ostwald puede ser reducida formando emulsiones con baja polidispersión en el tamaño de gota, o añadiendo un segundo componente a la fase dispersa que sea insoluble en la fase continua. También se ha sugerido que el uso de surfactantes fuertemente adsorbidos en la interfase agua/componente oleoso (surfactantes poliméricos), que no puedan desorberse fácilmente, consiguen disminuir la velocidad del proceso (Silva *et al.*, 2012).

1.3.1.3 Caracterización de las nanoemulsiones

La caracterización es la identificación de un material mediante el estudio de sus propiedades físicas, químicas o estructurales; en la caracterización de una nanoemulsión interesa conocer el tamaño de gota de la fase dispersa, el signo o tipo de la emulsión (O/W o W/O) y la dispersión de tamaños de gota (Çınar, 2017). Las técnicas de caracterización más comunes son:

- **Dispersión Dinámica de la Luz, conocida como DLS (Dynamic Light Scattering):** Es una técnica experimental basada en la interacción radiación-materia. Cuando un haz de luz atraviesa un medio donde el índice de refracción es uniforme en la totalidad del medio, la luz no será desviada. La presencia de partículas variará el índice de refracción lo que hará que parte de la luz sea dispersada en todas direcciones. Al ser tocados por el haz de luz, los átomos y moléculas se polarizan y re-emiten luz débil de la misma longitud de onda que la del haz incidente. La DLS, a la cual también se le conoce como espectroscopia de correlación de fotones, está basada en que la luz dispersada por partículas con movimiento browniano presentan un desplazamiento minúsculo de su longitud de onda debido a el efecto Doppler, dicho desplazamiento solo puede ser medido mediante un rayo láser monocromático y muy intenso. El diámetro medido mediante DLS es el diámetro hidrodinámico, que incluye la doble capa eléctrica y capa de solvatación adherida a su

superficie que se desplaza junto con la partícula o gota, por tanto el tamaño obtenido por esta técnica suele ser mayor al que se mediría en un microscopio electrónico de transmisión (Cuadros-Moreno, *et al.*, 2014).

- El Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM): es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unos lentes para formar una imagen final sobre una CCD que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. La imagen del TEM tal como se ha descrito ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina. Se utiliza para determinar el tamaño, el peso y la estructura (características morfológicas), una vez que la nanoemulsión se tiñe con acetato de uranilo y se coloca en una rejilla, se recubre con un polímero de monocapa y el agua se evapora y se realiza la observación (Silva *et al.*, 2012).
- Potencial Z: es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión. Cuando partículas con carga se aproximan entre ellas, el que se repelen depende del equilibrio entre las fuerzas de atracción experimentadas en todos los cuerpos, y de las fuerzas de repulsión determinadas por la magnitud del potencial en la capa de deslizamiento. Este es el potencial a una corta distancia de la superficie en dónde las moléculas del dispersante se mueven con respecto a las moléculas en el límite de la superficie. El potencial zeta es el potencial en la capa de deslizamiento. Las partículas interactúan de acuerdo al potencial en esta capa (Silva *et al.*, 2012).

1.3.1.4 Surfactantes

Un surfactante es una sustancia química que posee una estructura molecular constituida por una parte hidrofílica (polar) y una lipofílica (apolar), lo que le confiere doble afinidad. Tiene actividad interfacial y se adsorbe a la interfase agua/aceite en forma orientada, disminuyendo la

tensión interfacial entre estos dos líquidos. La parte apolar de los surfactantes está constituida, generalmente, por cadenas carbonadas lineales (usualmente en el rango C8-C18), en ocasiones asociados a anillos aromáticos. La parte polar en la estructura de estos compuestos la conforman grupos con carga eléctrica neta, tales como los radicales carboxilo ($-\text{COO}^-$) y amonio primario ($-\text{NH}_3^+$) o cadenas de condensación de polióxido de etileno $[-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}]$ entre otros, de acuerdo a la forma de disociación en el agua se clasifican de la siguiente manera:

- Surfactantes aniónicos: se disocian en un anión anfífilo y un catión, el cual es en general un metal alcalino o un amonio cuaternario. A este grupo pertenecen los detergentes sintéticos como los alquil benceno sulfonatos, los jabones (sales de ácidos grasos), los agentes espumantes como el lauril sulfato, los humectantes del tipo sulfosuccinato y los dispersantes del tipo lignosulfonatos, entre otros (Sierra, 2015).
- Surfactantes no iónicos: no se ionizan en solución acuosa, debido a que poseen grupos hidrófilos del tipo alcohol, fenol, éter o amida. El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura natural como un ácido graso (Sierra, 2015).
- Surfactantes catiónicos: se disocian en solución acuosa en un catión orgánico anfífilo y un anión generalmente del tipo halogenuro. La gran mayoría de estos surfactantes son compuestos nitrogenados, del tipo sal de amina grasa o amonio cuaternario (Sierra, 2015).
- Otros surfactantes: existe gran variedad de surfactantes adicionales a los ya mencionados, como los anfóteros, poliméricos, siliconados y fluorados, entre otros (Sierra, 2015).

JUSTIFICACIÓN

Se han buscado diferentes alternativas para el control de *B. cubensis*, pero el método principal de control son los insecticidas; sin embargo, algunos de ellos (malation, dimetoato, cipermetrina, azadiractina y imidacloprid) inducen la caída de flor y frutos pequeños, deben aplicarse en altas concentraciones y en repetidas ocasiones para disminuir la infestación o simplemente no hay control de la plaga. El control biológico del *B.cubensis* ha sido poco explorado y hasta el momento no se ha encontrado un parasitoide o depredador asociado. El desarrollo de una formulación de un repelente e insecticida a base de nanoemulsiones utilizando aceite de citronela como repelente, y dos compuestos bioactivos para el efecto insecticida, tiene como propósito potenciar la actividad repelente y/o insecticida, incrementar la solubilidad baja de los ingredientes activos, liberar el ingrediente activo de forma lenta y controlada, proteger el ingrediente activo de la degradación prematura y disminuir el impacto ambiental, por lo cuál se podrá obtener un producto alternativo e innovador con un control eficiente sobre *B. cubensis*, con alta biocompatibilidad y baja toxicidad sobre el fruto, todo esto con el uso de novedosas tecnologías, como lo es la nanotecnología.

HIPÓTESIS

Se obtiene una nanoemulsión aceite en agua estable durante dos meses, elaborada a base de fitoquímicos con actividad repelente e insecticida, utilizando métodos de alta energía.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nanoemulsiones estables elaboradas con citronela para el efecto repelente, y dos compuestos bioactivos para el efecto insecticida sobre *Bephratelloides cubensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar formulaciones de nanoemulsiones aceite en agua que sean estables por lo menos 2 meses, utilizando aceite de citronela y dos compuestos bioactivos mediante el uso de dos métodos de alta energía.
- Caracterizar fisicoquímicamente las nanoemulsiones desarrolladas por diversos métodos analíticos (DLS, potencial Z).
- Evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones a temperatura ambiente.
- Evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones en condiciones de estrés como la temperatura y velocidad de centrifugación.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Aceite natural de citronela $\geq 85\%$, compuesto bioactivo a $\geq 97\%$, compuesto bioactivo b $\geq 98\%$, surfactante, cosurfactante $\geq 99.5\%$, todos los reactivos anteriores fueron comprados de Sigma Aldrich. El agua desionizada fue suministrada por Tecnología y Control Ambiental S.A. de C.V.

2.2 Metodología

Se realizaron cuatro etapas de experimentos tomando como referencia el realizado por Sakulku *et al.* (2009) con algunas modificaciones, para evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones a diferentes concentración de surfactante, cosurfactante y compuestos bioactivos.

2.2.1 Primera etapa de experimentos

La preparación de la fase dispersa consistió en agregar el surfactante (11, 20 y 31% p/p) al aceite de citronela, se dejó en agitación a 600 rpm durante 24 horas, en una parrilla de agitación magnética a temperatura ambiente (25 °C).


La preparación de la fase continua consistió en agregar el cosurfactante (25, 50 y 75%) en agua, se dejó en agitación a 600 rpm durante 24 horas, en una parrilla de agitación magnética a temperatura ambiente (25 °C).


El proceso de elaboración de las nanoemulsiones consistió en mezclar los componentes de la fase continua y la fase dispersa de las diferentes etapas, como se muestra en la **Tabla 2.1**.

Se emplearon 2 métodos de alta energía, como premezclado se empleó un homogeneizador de alta velocidad (Ultra-Turrax T25, IKA-WERKE, Alemania) a 15,000 rpm durante 3 minutos, subsecuentemene esta pre-emulsión paso por un procesador ultrasónico (Vibra-Cell VC 505 / VC750, US) a 20 kHz, 50% de amplitud durante 5 minutos (**Figura 2.1**).

Tabla 2.1 Diseño de experimentos con cosurfactante y agua en la fase continúa al 90% en combinación con aceite de citronela y surfactante al 10% a diferentes concentraciones. Se muestran los porcentajes por etapas y el total de la nanoemulsión.

| Nomenclatura | Cosurfactante | | Agua | | Citronela | | Surfactante | |
|--------------|---------------|-----|--------|-----|-----------|-----|-------------|-----|
| | 90% | | | | 10% | | | |
| 25/75 GA Ca | 22.50% | 25% | 67.50% | 75% | 8.89% | 89% | 1.11% | 11% |
| 25/75 GA Cb | 22.50% | | 67.50% | | 8.00% | 80% | 2.00% | 20% |
| 25/75 GA Cc | 22.50% | | 67.50% | | 6.87% | 69% | 3.13% | 31% |
| | 90% | | | | 10% | | | |
| 50/50 GA Ca | 45% | 50% | 45% | 50% | 8.89% | 89% | 1.11% | 11% |
| 50/50 GA Cb | 45% | | 45% | | 8.00% | 80% | 2.00% | 20% |
| 50/50 GA Cc | 45% | | 45% | | 6.87% | 69% | 3.13% | 31% |
| | 90% | | | | 10% | | | |
| 75/25 GA Ca | 67.50% | 75% | 22.53% | 25% | 8.89% | 89% | 1.11% | 11% |
| 75/25 GA Cb | 67.50% | | 22.53% | | 8.00% | 80% | 2.00% | 20% |
| 75/25 GA Cc | 67.50% | | 22.53% | | 6.87% | 69% | 3.13% | 31% |

 Porcentaje por etapa.

 Porcentaje en nanoemulsión.

- *Primer número es el porcentaje por etapa de cosurfactante.
- *Segundo número es el porcentaje por etapa del agua desionizada.
- *G es el cosurfactante
- *A es de agua
- *Ca corresponde al 1.11% de surfactante total en la emulsión.
- *Cb corresponde al 2.00% de surfactante total en la emulsión.
- *Cc corresponde al 3.13% de surfactante total en la emulsión.

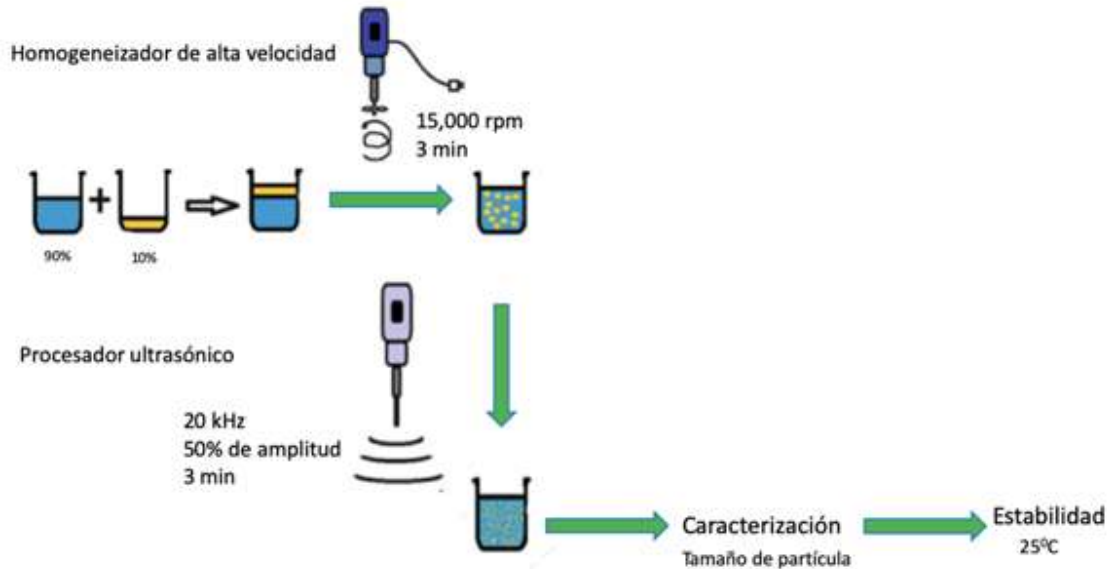


Figura 2.1 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando dos métodos de alta energía, a) homogeneizador de alta energía, b) procesador ultrasónico.

2.2.2 Segunda etapa de experimentos

La preparación de la fase dispersa y continua se realizó de forma similar al primer diseño de experimentos. El proceso de elaboración de las nanoemulsiones consistió en mezclar los componentes de la fase continua y la fase dispersa de las diferentes etapas como se muestra en la **Tabla 2.1**.

La mitad de las nanoemulsiones se elaboraron como el primer diseño de experimentos, la otra mitad se sometieron a un solo proceso de alta energía, homogeneizador de alta velocidad (**Fig. 2.2**), con la finalidad de evaluar y comparar su estabilidad.

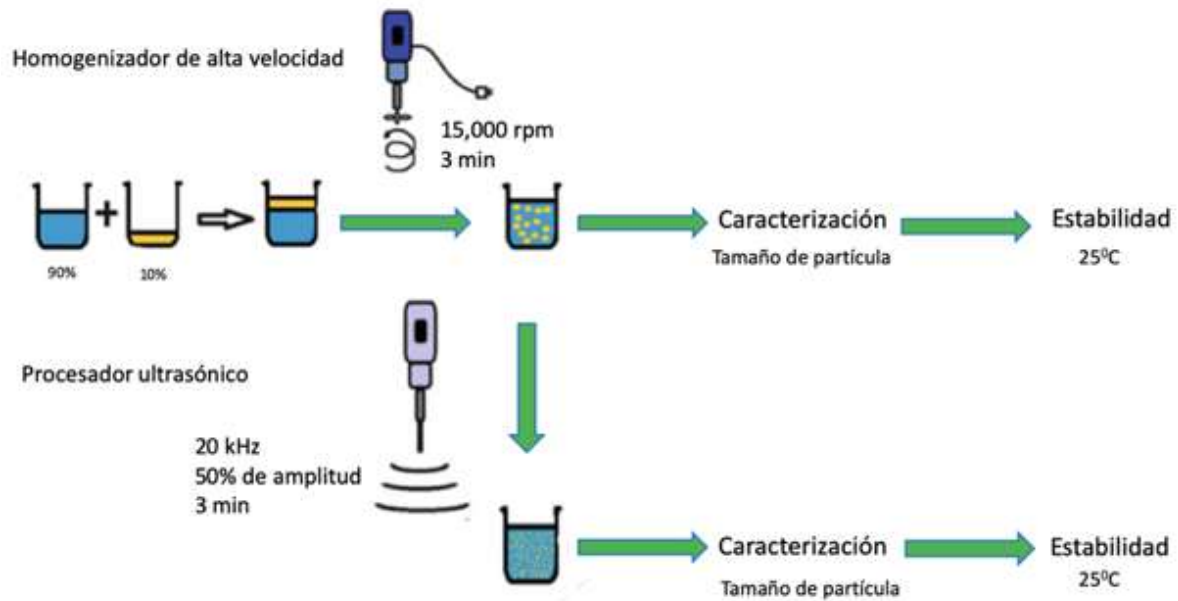


Figura 2.2 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando uno y dos métodos de alta energía.

2.2.3 Tercera etapa de experimentos

En este diseño se realizaron modificaciones a la fase continua de las nanoemulsiones desarrolladas, se aumentó la concentración de cosurfactante a 87.5% p/p para observar su impacto en la estabilidad de los sistemas desarrolladas, se comparó con las nanoemulsiones que contenían una concentración de 75% de cosurfactante. A la fase dispersa se le adicionaron los compuestos bioactivos en concentraciones de 0.5 y 1%. Adicional, también se modificó la relación de la fase continua de 90 a 80% respecto a la fase dispersa.

El diseño de experimentos se puede observar en la **Tabla 2.2**. La elaboración de nanoemulsiones se realizó mediante la metodología descrita en la sección 2.2.1, en este diseño de experimentos también se elaboraron nanoemulsiones que sólo pasaron por un método de alta energía (homogeneizador de alta velocidad) con la finalidad de evaluar el impacto del procesador ultrasónico en la disminución del tamaño de partícula, evaluando su estabilidad física y coloidal en almacenamiento a temperatura ambiente, como se ha mencionado con anterioridad.

Tabla 2.2 Diseño de experimentos adicionando los compuestos bioactivos a diferentes concentraciones, cosurfactante al 75 y 87.5%, relación fase continua al 80 y 90% en fase dispersa en un 10 y 20%. Se muestran los porcentajes por etapas y en el total de la nanoemulsión.

| Nomenclatura | Cosurfactante | | Agua | | Citronela | | Surfactante | | A | | B | |
|------------------|---------------|--------|-------|--------|-----------|-----|-------------|-----|-------|------|------|------|
| | 90% | | | | 10% | | | | | | | |
| A90 CT10 | 67.5% | 75% | 22.5% | 25% | 8.9% | 89% | 1.1% | 11% | | | | |
| A90CTA10 | 67.5% | | 22.5% | | 8.8% | 88% | 1.1% | 11% | 0.10% | 1% | | |
| A90CTB10 | 67.5% | | 22.5% | | 8.8% | | 1.1% | | | | 0.1 | 1% |
| A90CTAB10 | 67.5% | | 22.5% | | 8.8% | | 1.1% | | 0.05% | 0.5% | 0.05 | 0.5% |
| 80% | | | | 20% | | | | | | | | |
| A80CT20 | 60.0% | 75% | 20.0% | 25% | 17.8% | 89% | 2.2% | 11% | | | | |
| A80CTA20 | 60.0% | | 20.0% | | 17.6% | 88% | 2.2% | 11% | 0.10% | 1% | | |
| A80CTB20 | 60.0% | | 20.0% | | 17.6% | | 2.2% | | | | 0.1 | 1% |
| A80CTAB20 | 60.0% | | 20.0% | | 17.6% | | 2.2% | | 0.05% | 0.5% | 0.05 | 0.5% |
| 90% | | | | 10% | | | | | | | | |
| B90CT10 | 78.8% | 87.50% | 11.2% | 12.50% | 8.9% | 89% | 1.1% | 11% | | | | |
| B90CTA10 | 78.8% | | 11.2% | | 8.8% | 88% | 1.1% | 11% | 0.10% | 1% | | |
| B90CTB10 | 78.8% | | 11.2% | | 8.8% | | 1.1% | | | | 0.1 | 1% |
| B90CTAB10 | 78.8% | | 11.2% | | 8.8% | | 1.1% | | 0.05% | 0.5% | 0.05 | 0.5% |
| 80% | | | | 20% | | | | | | | | |
| B80CT20 | 70.0% | 87.50% | 10.0% | 12.50% | 17.8% | 89% | 2.2% | 11% | | | | |
| B80CTA20 | 70.0% | | 10.0% | | 17.6% | 88% | 2.2% | 11% | 0.10% | 1% | | |
| B80CTB20 | 70.0% | | 10.0% | | 17.6% | | 2.2% | | | | 0.1 | 1% |
| B80CTAB20 | 70.0% | | 10.0% | | 17.6% | | 2.2% | | 0.05% | 0.5% | 0.05 | 0.5% |



Porcentaje por etapa.



Porcentaje en nanoemulsión.

*La letra A son las emulsiones con 75% de cosurfactante.

*La letra B con 87.5% de cosurfactante en la fase continua.

*El número después de estas letras es el porcentaje al que está la fase continua en la emulsión,

*C es de citronela.

*T es el surfactante.

*A de compuesto bioactivo A.

*B de compuesto bioactivo B.

*AB la combinación de los compuestos bioactivos A y B

*El número que sigue es el porcentaje al que se encuentra la fase dispersa en la emulsión.

2.2.4 Cuarta etapa de experimentos

Para la elaboración de este diseño de experimentos (**Tabla 2.3**), se tomó en cuenta los resultados de las nanoemulsiones anteriores, basándose en la formulación que presentó el menor tamaño de partícula, se elaboraron nuevamente aquellas que tenían 25% de cosurfactante en la fase continua. A la fase dispersa se le adicionaron los compuestos bioactivos en concentraciones de 0.5 y 1%. La preparación de las nanoemulsiones se elaboraron de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2.1 en una relación 90% de la fase continua y 10% de la fase dispersa variando los tiempos de tratamiento (**Fig. 2.3**).

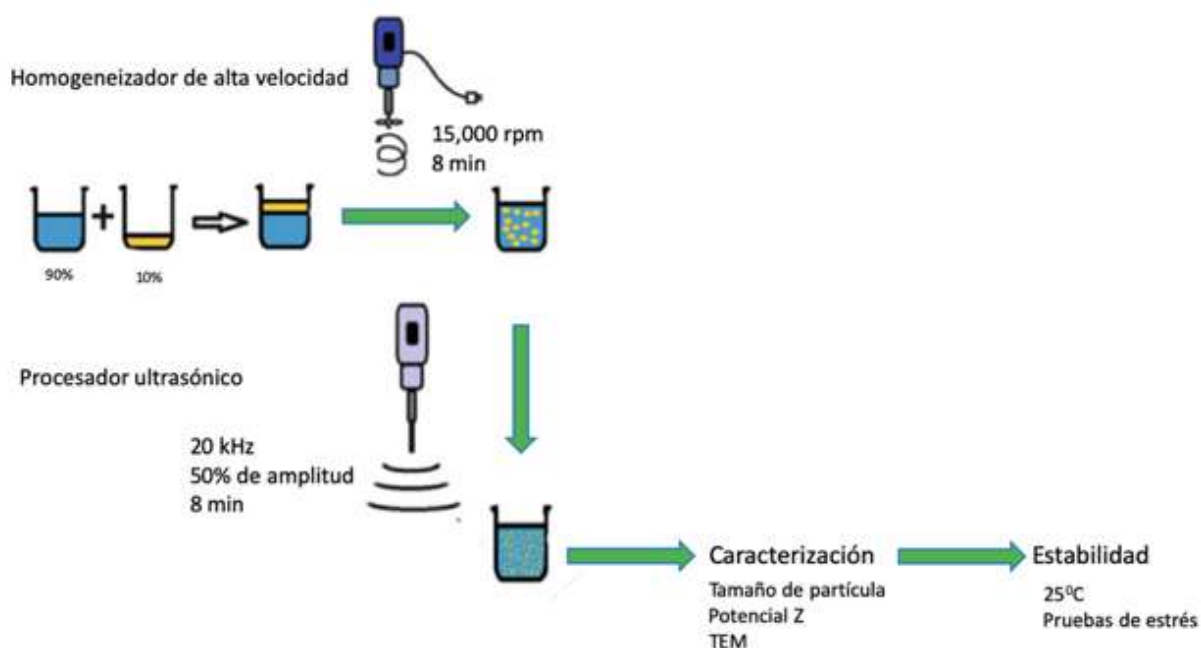


Figura 2.3 Diagrama del proceso de elaboración de nanoemulsiones utilizando dos métodos de alta energía, aumentando el tiempo de tratamiento.

Para este estudio se prepararon 1.2 Kg de cada nanoemulsión, 1 Kg se envió al INIFAP de Tepic para la aplicación en campo y 200 g se emplearon para realizar dos pruebas de estrés. Esta metodología se basó en la establecida por Sethuraman *et al.* (2013) con modificaciones. La primera prueba de estrés consistió en colocar 7 g de la formulación en el equipo HERMLE Z323 y centrifugar a 1000 rpm durante 20 min, medir pH y mV (Orion pH meter model 420), se repitió el procedimiento anterior incrementando las rpm a 2000 y 3000 posteriormente se determinó el tamaño de partícula y potencial Z, este procedimiento se realizó 4 veces en diferentes tiempos durante el almacenamiento.

La segunda prueba de estrés que se realizó fue incrementar la temperatura de 5 mL de muestra a 70 °C, se midió el tamaño de partícula y potencial Z fue determinada con el equipo Dynamic Light Scattering (Nano ZS, Malvern Instruments, US), de igual manera este procedimiento se realizó 4 veces en diferentes tiempos durante el almacenamiento.

Tabla 2.3 Diseño de experimentos con 25% cosurfactante, 75% agua en la fase continua al 90% en combinación de citronela, surfactante y compuestos bioactivos.

| Nomenclatura | Cosurfactante | | Agua | | Citronela | | Surfactante | | A | | B | | | | | |
|--------------|---------------|-----|--------|-----|-----------|-----|-------------|-----|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-------|------|
| | 90% | | | | 10% | | | | | | | | | | | |
| 25/75 Ca | 22.50% | 25% | 67.50% | 75% | 8.90% | 89% | 1.10% | 11% | | | | | | | | |
| A | 22.50% | | 67.50% | | 8.80% | | 1.10% | | 11% | 0.10% | 1% | | | | | |
| B | 22.50% | | 67.50% | | 8.80% | | | | | 88% | 1.10% | 11% | | | 0.1 | 1% |
| AB | 22.50% | | 67.50% | | 8.80% | | | | | | | | 1.10% | 0.05% | 0.50% | 0.05 |



Porcentaje por etapa.



Porcentaje en nanoemulsión.

*La formulación 25/75 Ca contiene 25% de cosurfactante en la fase continua y 89% de citronela, sin compuestos bioactivos.

*La formulación A tiene como base la composición de 25/75 Ca mas la adición del compuesto bioactivo A.

*La formulación B tiene como base la composición de 25/75 Ca mas la adición del compuesto bioactivo B.

*La formulación AB tiene como base la composición de 25/75 Ca mas la adición de los compuestos bioactivos A y B.

2.2.5 Caracterización fisicoquímica

2.2.5.1 Tamaño de partícula y carga eléctrica superficial

La distribución del tamaño de partícula y el diámetro medio de partícula se midieron utilizando un equipo Dynamic Light Scattering (Nano S, Malvern Instruments, US), estos experimentos se llevaron a cabo por varios días durante el almacenamiento, utilizando una celda de vidrio y diluyendo 1 gota de la muestra en 10 mL de agua desionizada, los resultados se expresan como media \pm error estándar (SE).

La carga eléctrica superficial (potencial ζ) de las muestras se midió utilizando un equipo Dynamic Light Scattering (Nano ZS, Malvern Instruments, US), estos experimentos se llevaron

a cabo varios días durante el almacenamiento, utilizando una celda con electrodos y diluyendo 1 gota de la muestra en 10 mL de agua desionizada, los resultados se muestran como media \pm error estándar (SE).

2.2.5.2 Morfología

Los estudios morfológicos se realizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEOL JEM-1010, EE. UU.) Bajo 80–100 kV de aceleración de tensión. Las muestras se colocaron en una rejilla de cobre de malla 300 para observación. La forma y el tamaño se determinaron analizando al menos 200 partículas en diferentes campos al azar con el software J-image.

2.2.6 Análisis estadístico

Para evaluar si hay cambios significativos durante el almacenamiento se llevaron a cabo los análisis estadísticos mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey, $p < 0.05$) minitab 17.

3 Resultados y Discusión

3.1 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la primera etapa de experimentos

Una nanoemulsión se obtiene cuando el tamaño de gota está entre los 20 y 200 nm, la importancia de obtener un tamaño de gota dentro del rango mencionado es que puede resistir la desestabilización física causada por la separación gravitacional, la floculación y/o coalescencia, también evita la formación de “creaming” debido a que el movimiento browniano de la gota es suficiente para superar la fuerza de separación gravitacional (Forgiarini *et al.*, 2001; Tadros *et al.*, 2004).

El tamaño y la polidispersidad de las nanoemulsiones pueden afectar las propiedades como la estabilidad de las partículas, la reología, aspecto, color, textura, y vida útil. En las nanoemulsiones, el fenómeno de inestabilidad más frecuente es la maduración de Ostwald (Weiss y McClements, 2000). Debido a esto, se evaluó diariamente la estabilidad de las muestras, empezando por el día 0 (**Fig. 3.1**), al día 30 (**Fig. 3.2**) las nanoemulsiones continúan estables. Al día 44 se observa la separación de fases de las muestras elaboradas con 50% de cosurfactante en la fase continua (**Fig. 3.3**). A los 60 días no se observaron cambios (**Fig. 3.4**), pero a los 90 días las muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y un 20 % y 31% de surfactante en la fase dispersa presentan separación de fases (**Fig. 3.5**).

Siendo indicativo, de que estas formulaciones no cumplieron con lo establecido por otros autores, en la que indican que nanoemulsiones con alta estabilidad no presentan rompimiento de fases, la maduración de Oswald durante al menos 60 días (Weiss y McClements, 2000).

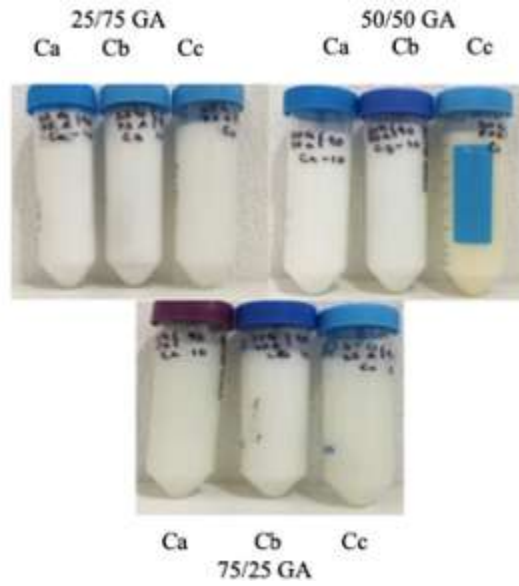


Figura 3.1 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 0.



Figura 3.2 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 30, se mantienen estables las formulaciones.



Figura 3.3 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 44, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con el 50% de cosurfactante en la fase continua.

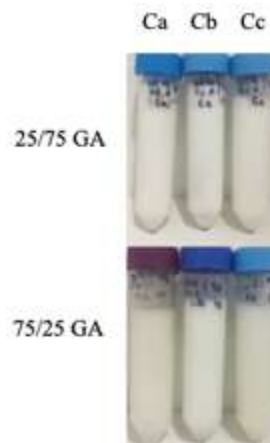


Figura 3.4 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 60, no se observan nuevos cambios.

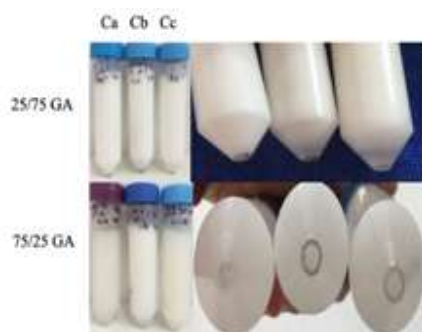


Figura 3.5 Nanoemulsiones de la primera etapa al día 90, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y con 20% y 31% de surfactante en la fase dispersa.

La técnica de caracterización del tamaño de gota de una nanoemulsión se realizó mediante Dispersión Dinámica de la Luz, conocida por sus siglas en inglés como DLS (Dynamic Light Scattering). La importancia de medir el tamaño de partícula se debe a que es un indicador de estabilidad la cual se puede ver afectada por fenómenos como índice de flotabilidad, floculación, coalescencia y sedimentación (Bernal y Rodríguez, 2019), por esta razón es que se realizó la medición del tamaño de partícula de las diferentes formulaciones. En la **Tabla 3.1**, se observa que las emulsiones elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua, citronela y surfactante a diferentes concentraciones en la fase dispersa, son las que presentaron el menor tamaño de partícula, siendo 25/75 GA Ca, la formulación con tamaño de partícula entre 200 y 230 nm reflejó la mayor estabilidad de las nanoemulsiones analizadas de este diseño de experimentos, los estudios estadísticos se realizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$).

En la **Tabla 3.1** se comparó el cambio del tamaño de partícula de cada una de las formulaciones con respecto al tiempo (letras minúsculas), el cual señala que no hay diferencia significativa entre las mediciones, al igual que las emulsiones elaboradas con 75% cosurfactante en la fase continua, citronela y surfactante a diferentes concentraciones en la fase dispersa, mientras que las emulsiones realizadas con 50% de cosurfactante en la fase continua, presentaron tamaños de partícula mayor a 200 nm y al día 44 presentaron separación de fases. De igual manera se comparó el cambio del tamaño de partícula entre tratamientos (letras mayúsculas), donde se observa que no existen diferencia significativa entre las formulaciones.

Tabla 3.1 Mediciones de tamaños de partícula de las diferentes formulaciones y análisis estadístico.

| Formulación | Tamaño de partícula (nm) | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------|--------|----------------|-----|----------------|------|----------------|------|----------------|-------|
| | Días | | | | | | | | | |
| | 51 | | 66 | | 96 | | 103 | | 110 | |
| 25/75 GA Ca | 201.60 ± 17.95 | BCD a | 227.75 ± 23.56 | A a | 220.77 ± 21.47 | B a | 209.38 ± 20.98 | B a | 208.42 ± 22.14 | C a |
| 25/75 GA Cb | 156.13 ± 16.66 | D b | 202.57 ± 20.29 | A a | - | - | - | - | - | - |
| 25/75 GA Cc | 158.57 ± 16 | CD b | 209.37 ± 19.13 | A a | - | - | - | - | - | - |
| 50/50 GA Ca | 372.58 ± 68.8 | A a | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 50/50 GA Cb | 349.28 ± 65.5 | A a | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 50/50 GA Cc | 236.73 ± 30 | BC b | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 75/25 GA Ca | 110.23 ± 6.67 | D c | - | - | 354.00 ± 76.1 | A ab | 245.00 ± 62 | B bc | 435.00 ± 124.3 | A a |
| 75/25 GA Cb | 285.33 ± 7.82 | AB a | - | - | 325.00 ± 42.2 | A a | 304.60 ± 41.7 | A a | 297.90 ± 48.6 | B a |
| 75/25 GA Cc | 199.32 ± 23.75 | BCD bc | - | - | 200.49 ± 27.36 | B c | 252.80 ± 252.8 | AB a | 235.14 ± 33.25 | BC ab |

*Las letras mayúsculas corresponden al comparativo entre tratamientos.

*Las letras minúsculas corresponden al comparativo de cada una de las formulaciones con respecto al tiempo.

Es necesario indicar que las formulaciones que no cuentan con mediciones continuas, es porque presentaron separación de fases luego de un determinado tiempo de almacenamiento, y debido a esta inestabilidad en el sistema, dejan de ser funcionales, por lo cual fueron descartadas para continuar su estudio y futura aplicación en campo.

La estabilidad de las formulaciones 75/25 GA Ca, 75/25 GA Cb y 75/25 GA Cc, fue el doble de tiempo comparada con lo obtenido por Sakulku *et al.* (2009), quienes también realizaron nanoemulsiones utilizando el aceite de citronela en la fase dispersa, reportaron solo 60 días de estabilidad y no proporcionaron información en cuanto a los tamaños de partícula en el transcurso del tiempo, adicional a la investigación que realizaron Sakulku *et al.* (2009), en este trabajo se incorporó una formulación que incluía 25% de cosurfactante en la fase continua, la cual presentó mejores resultados a los reportados por estos autores y en comparación con las demás formulaciones elaboradas en este trabajo.

3.2 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la segunda etapa de experimentos

Al igual que el primer diseño de experimentos, se evaluó diariamente la estabilidad de las muestras que pasaron tanto por el homogeneizador de alta velocidad como el ultrasonido, empezando en el día 0 (**Fig. 3.6**), las formulaciones se mantienen estables (**Fig. 3.7**). Al día 38 se observó la separación de fases de las muestras elaboradas con 50% de cosurfactante en la fase continua (**Fig. 3.8**). A los 60 días no se observaron cambios (**Fig. 3.9**), pero a los 81 días las

muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y un 20 % y 31% de surfactante en la fase dispersa presentaron separación de fases (**Fig. 3.10**). En comparación con el primer diseño de experimentos, se obtuvieron resultados muy similares, lo que indica que el procedimiento es reproducible.

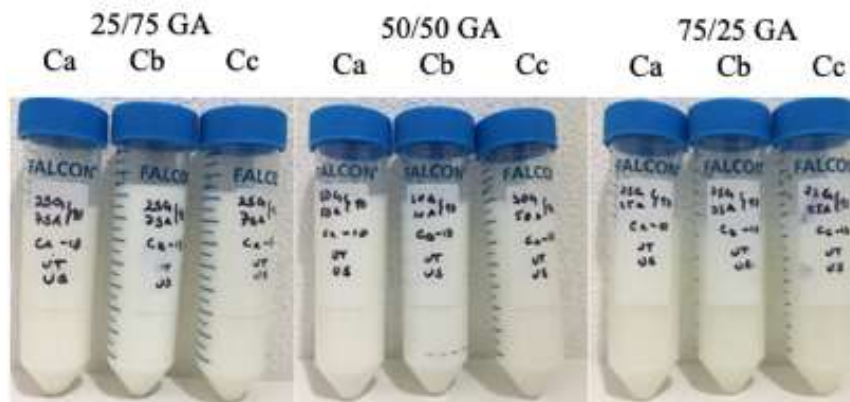


Figura 3.6 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 0.

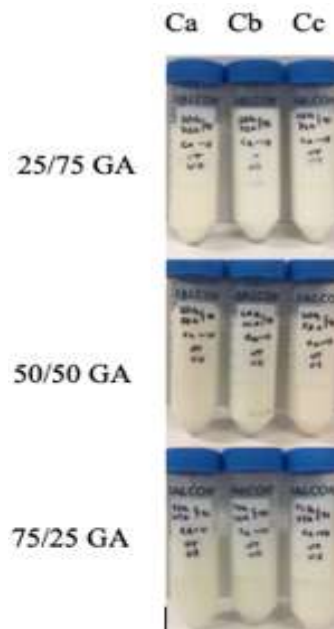


Figura 3.7 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 30, se mantienen estables las formulaciones.



Figura 3.8 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 36, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con el 50% cosurfactante en la fase continua.

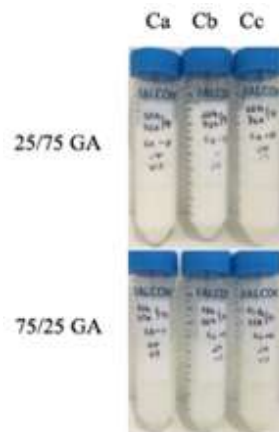


Figura 3.9 Nanoemulsiones al día 60, no se observan nuevos cambios.

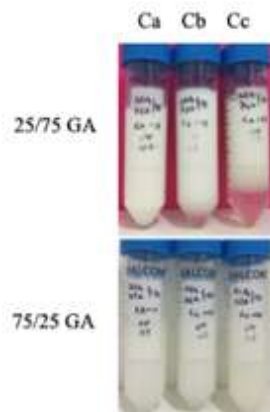


Figura 3.10 Nanoemulsiones de la segunda etapa al día 88, se observa separación de fases en las muestras elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua y con 20% y 31% de surfactante en la fase dispersa.

Al igual que las formulaciones de la primera etapa se determinó el tamaño de partícula en el equipo Dynamic Light Scattering (Nano S, Malvern, US) obteniendo los resultados que se muestra en la **Tabla 3.2**, se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$) para comparar y saber si existe o no diferencia significativa entre las diferentes emulsiones en el transcurso de los días (letras minúsculas), y entre tratamientos por cada día de medición (letras mayúsculas), donde se observa que no existen diferencia significativa entre las formulaciones.

Se observó que las emulsiones elaboradas con 25% de cosurfactante en la fase continua, citronela y surfactante a diferentes concentraciones en la fase dispersa fueron las que presentaron el menor tamaño de partícula, mientras que las emulsiones realizadas con 50% de cosurfactante en la fase continua, tuvieron tamaños de partícula mayor a 200 nm y al día 38 presentaron separación de fases.

Tabla 3.2 Mediciones de tamaños de partícula de las diferentes formulaciones de la segunda etapa y análisis estadístico.

| Formulación | Tamaño de partícula (nm) | | | | | |
|-------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Días | | | | | |
| | 36 | 44 | 59 | 91 | 98 | 105 |
| 25/75 GA Ca | 234.23 ± 22.75 ABC ^a | - | 232.87 ± 15.8 A ^a | 219.30 ± 19.2 B ^a | 228.75 ± 24.1 BC ^a | 211.43 ± 24.1 B ^a |
| 25/75 GA Cb | - | 188.60 ± 25.4 B ^a | 236.77 ± 22.05 A ^a | - | - | - |
| 25/75 GA Cc | - | 201.02 ± 18 B ^b | 240.79 ± 31.22 A ^a | - | - | - |
| 50/50 GA Ca | 369.90 ± 94.7 ABC ^a | - | - | - | - | - |
| 50/50 GA Cb | 310.30 ± 42.9 ABCD ^a | - | - | - | - | - |
| 50/50 GA Cc | 218.50 ± 19.14 D ^b | - | - | - | - | - |
| 75/25 GA Ca | 332.70 ± 49.3 ABCD ^a | 335.40 ± 108 A ^a | - | 276.70 ± 74 AB ^{ab} | 173.68 ± 27.3 C ^a | 368.10 ± 109 A ^a |
| 75/25 GA Cb | 352.70 ± 130.1 A ^a | - | - | 356.20 ± 112 AB ^a | 316.90 ± 53.6 A ^a | 311.90 ± 92.7 AB ^a |
| 75/25 GA Cc | 234.30 ± 41 CD ^a | - | - | 239.30 ± 35 B ^a | 273.30 ± 35.9 AB ^a | 237.80 ± 37.9 B ^a |

*Las letras mayúsculas corresponden al comparativo entre tratamientos.

*Las letras minúsculas corresponden al comparativo de cada una de las formulaciones con respecto al tiempo.

De igual manera se evaluó diariamente la estabilidad de las nanoemulsiones que se elaboraron empleando un solo método de alta energía (homogeneizador de alta velocidad), empezando en el día 0 (**Fig. 3.11**). Al día 30 se observó la separación de fases en todas las nanoemulsiones (**Fig. 3.12**), lo cual indica que la combinación de dos métodos de alta energía proporciona tamaños de partícula menores a 200 nm y se incrementa la estabilidad.

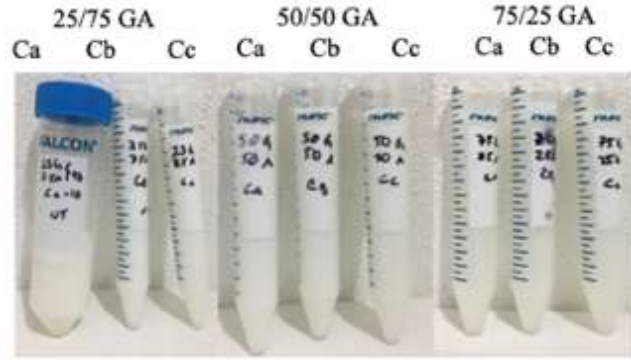


Figura 3.11 Nanoemulsiones de la segunda etapa procesadas únicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 0.



Figura 3.12 Nanoemulsiones de la segunda etapa procesadas únicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 30, se observa separación de fases en todas las muestras.

Con la finalidad de tener más información y poder realizar un análisis comparativo de las emulsiones, se midió tamaño de partícula en el equipo Dynamic Light Scattering (Nano S, Malvern, US) obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 3.3**, se realizó el estudio estadístico de análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey $p \leq 0.05$) para saber si existe o no diferencia significativa entre las formulaciones (letras minúsculas) que tuvieron como variable los métodos de alta energía a los que fueron sometidos, dando como resultado que al utilizar solamente el homogeneizador de alta velocidad se obtuvieron tamaños de partículas hasta de 555.8 nm y menos días de estabilidad, por esta razón es que se recomienda

utilizar la combinación de métodos de alta energía para lograr un tamaño de partícula menor a 200 nm y mayor estabilidad de la nanoemulsión. También se realizó el análisis estadístico entre las diferentes formulaciones y los procesos de elaboración, donde se observa que no hay una diferencia significativa entre los tratamientos (letras mayúsculas).

Tabla 3.3 Tamaño de partícula de las emulsiones dependiendo del o los métodos de alta energía al que fueron sometidos y análisis estadístico de la comparación de los procesos de elaboración en cada formulación.

| Formulación | Tamaño de partícula (nm) | |
|-------------|--|-----------------------------------|
| | Homogenizador alta velocidad y ultrasonido | Homogenizador alta velocidad |
| 25/75 GA Ca | 234.23 ± 22.75 DEFG ^b | 385.20 ± 71.24 BC ^a |
| 25/75 GA Cb | 188.60 ± 25.38 G ^b | 555.80 ± 49.91 A ^a |
| 25/75 GA Cc | 201.00 ± 18.06 FG ^b | 284.60 ± 35.98 CDEFG ^a |
| 50/50 GA Ca | 369.90 ± 94.68 BCD ^b | 329.60 ± 41.3 BCDE ^a |
| 50/50 GA Cb | 231.20 ± 5.76 EFG ^b | 310.30 ± 42.94 BCDEF ^a |
| 50/50 GA Cc | 218.50 ± 19.14 EFG ^a | 252.40 ± 35.24 CDEFG ^a |
| 75/25 GA Ca | 332.70 ± 49.27 BCDEF ^b | 422.20 ± 64.98 AB ^a |
| 75/25 GA Cb | 315.30 ± 127.1 BCDEFG ^a | 345.90 ± 96.48 BCD ^a |
| 75/25 GA Cc | 234.30 ± 41.01 DEFG ^a | 221.30 ± 23 EFG ^a |

*Las letras mayúsculas corresponden al comparativo entre tratamientos.

*Las letras minúsculas corresponden al comparativo de cada una de las formulaciones con respecto al tiempo.

3.3. Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones de la tercera etapa de experimentos

Al igual que las etapas anteriores se evaluó diariamente la estabilidad de las muestras que pasaron tanto por el homogeneizador de alta velocidad como el ultrasonido, empezando en el día 0 (**Fig. 3.13**), al día 26 se observó la separación de fases en las muestras elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80% (**Fig. 3.14**), al día 30 se observó separación de fases en las muestras con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 80% (**Fig. 3.15**), al día 33 hubo separación de fases en las nanoemulsiones con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 90% (**Fig. 3.16**), al día 38 en todas las nanoemulsiones se observó separación de fases (**Fig. 3.17**).

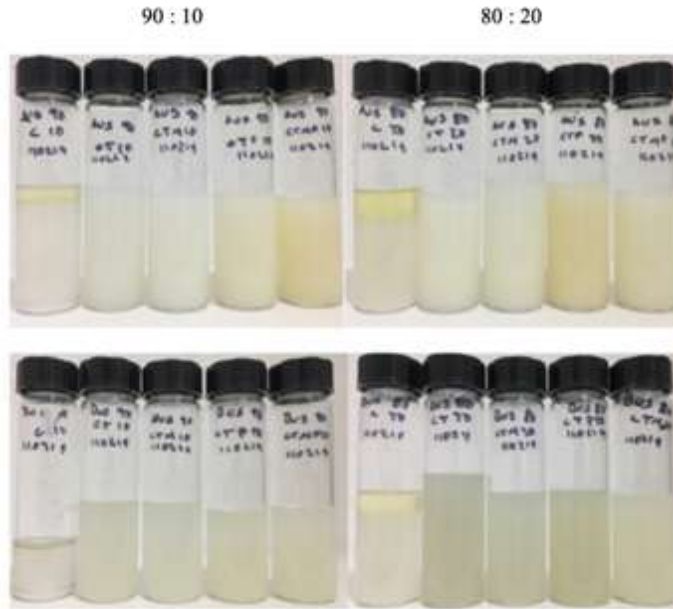


Figura 3.13 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 0.

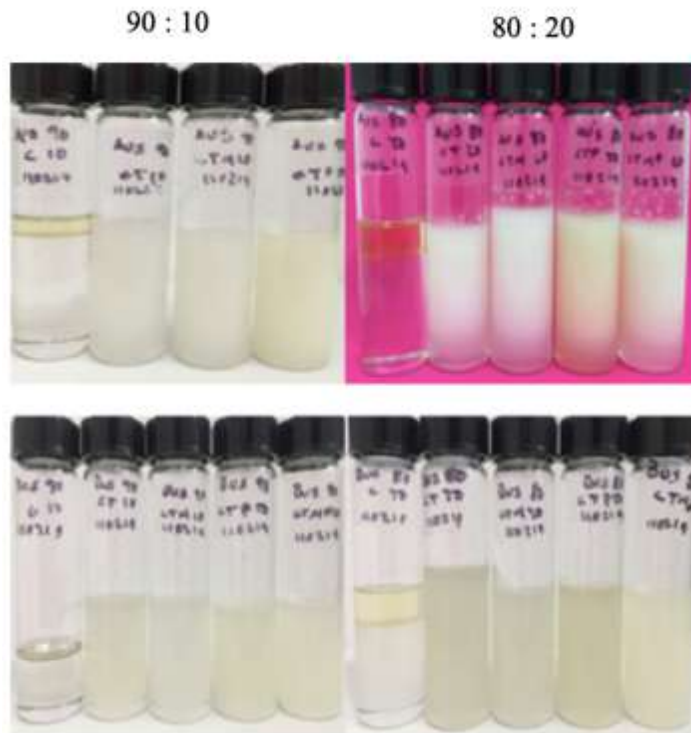


Figura 3.14 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 26, se observa separación de fases en las elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80%.

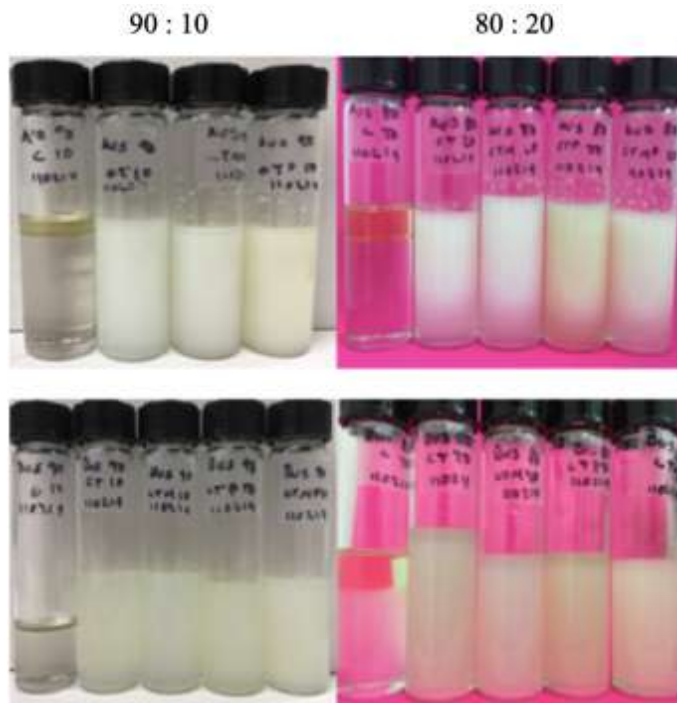


Figura 3.15 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 30, se observa separacion de fases en las muestras elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80% y en las nanoemulsiones con 87.5% cosurfactante en la fase continúa al 80%.

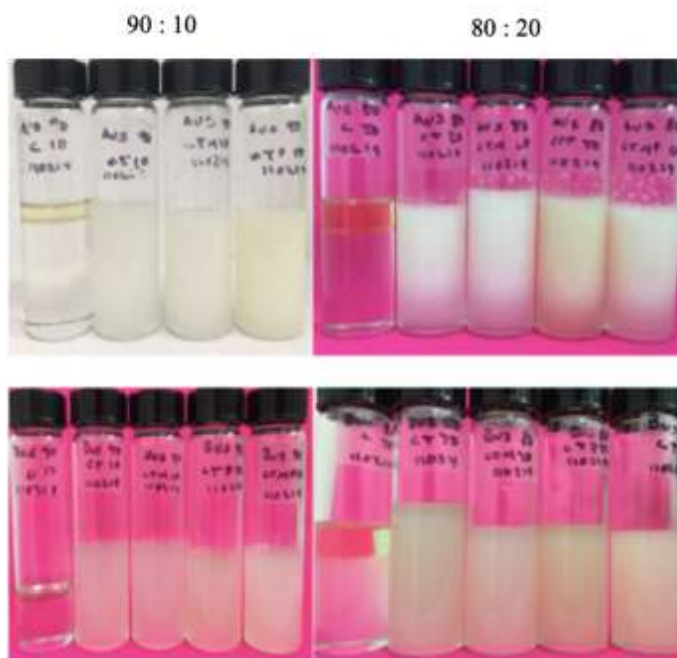


Figura 3.16 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 33, se observa separacion de fases en las muetstras elaboradas con 75% de cosurfactante en la fase continua al 80%, en las muestras con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 80% y en las formulas con 87.5% de cosurfactante en la fase continua al 90%.

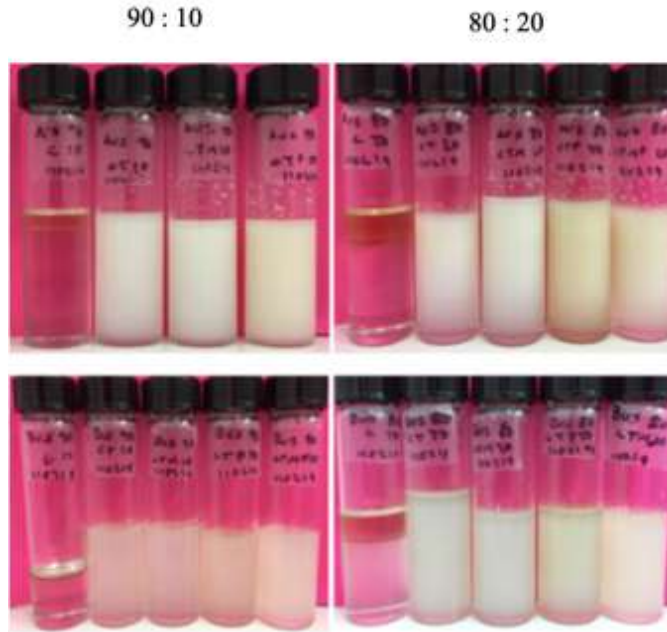


Figura 3.17 Nanoemulsiones de la tercera etapa al día 38, se observó separación de fases en todas las muestras. Al igual que en el segundo diseño de experimentos, se evaluó diariamente la estabilidad de las nanoemulsiones que se elaboraron empleando un solo método de alta energía, mediante el homogeneizador de alta velocidad, empezando en el día 0 (**Fig. 3.18**), al día 16 se observó separación de fases en todas las muestras (**Fig. 3.19**).

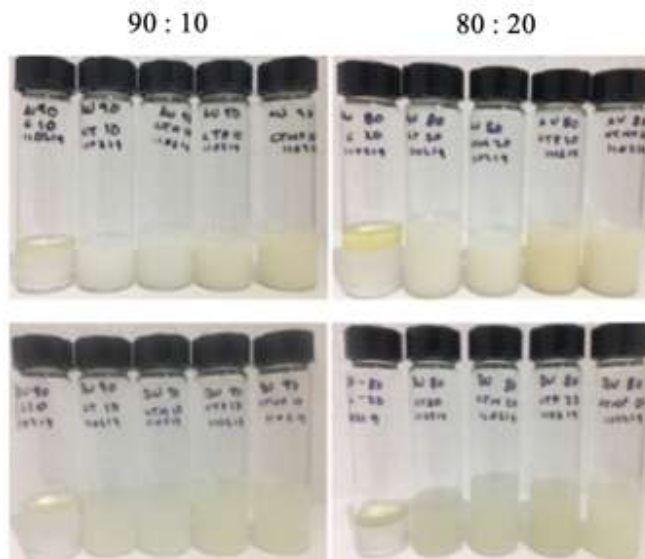


Figura 3.18 Nanoemulsiones de la tercera etapa procesadas unicamente por el homogeneizador de alta velocidad al día 0.

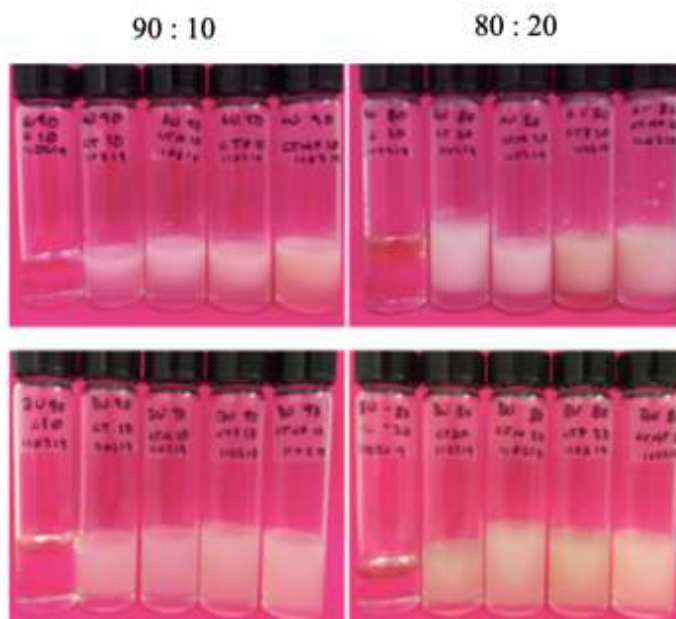


Figura 3.19 Nanoemulsiones de la tercera etapa procesadas unicamente por el homogenizador de alta velocidad al día 16, se observa separación de fases en todas las muestras.

Con la finalidad de tener más información sobre como interfiere la adición de los compuestos bioactivos en la nanoemulsión y poder realizar un análisis comparativo de tamaño de partícula en función de los métodos de alta energía a los que fueron sometidos, se midió tamaño de partícula en el equipo Dynamic Light Scattering (Nano S, Malvern, US) obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 3.4**, se realizó el estudio estadístico de análisis de varianza unidireccional (ANOVA, con la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$) para saber si existe o no diferencia significativa entre las nanoemulsiones (letras minúsculas), dando como resultado que al utilizar solamente el homogeneizador de alta velocidad se obtuvieron tamaños de partículas hasta de 535.8 nm y menor estabilidad, por esta razón es que se reafirmó que al utilizar la combinación de métodos de alta energía se logró una nanoemulsión estable por más tiempo y en una composición 90% de fase continua.

Tabla 3.4 Tamaño de partícula de las nanoemulsiones en función del o los métodos de alta energía al que fueron sometidos.

| Formulación | Tamaño de partícula (nm) | | | | | |
|--------------|--|---|--------|------------------------------|---|----------------------|
| | Homogenizador alta velocidad y ultrasonido | | | Homogenizador alta velocidad | | |
| A 90 CT 10 | 230.10 | ± | 31.3 | B | a | 240.15 ± 45.33 AB a |
| A 90 CTA 10 | 209.10 | ± | 78.5 | B | a | 311.10 ± 35.36 AB a |
| A 90 CTB 10 | 166.70 | ± | 41 | B | a | 200.90 ± 75.47 B a |
| A 90 CTAB 10 | 217.40 | ± | 56.7 | B | a | 249.30 ± 73.29 B a |
| A 80 CT 20 | 171.10 | ± | 94.91 | B | b | 262.90 ± 191.7 AB a |
| A 80 CTA 20 | 218.60 | ± | 8.86 | B | a | 243.00 ± 189.1 AB a |
| A 80 CTB 20 | 185.60 | ± | 19.5 | AB | a | 215.10 ± 45.76 B a |
| A 80 CTAB 20 | 153.30 | ± | 43.24 | B | b | 535.00 ± 78.27 A a |
| B 90 CT 10 | 117.90 | ± | 2.86 | B | b | 281.30 ± 154.4 AB a |
| B 90 CTA 10 | 286.80 | ± | 176.6 | AB | b | 287.00 ± 176.6 AB a |
| B 90 CTB 10 | 222.60 | ± | 118.2 | AB | a | 325.60 ± 154.2 AB a |
| B 90 CTAB 10 | 325.60 | ± | 154.18 | AB | a | 307.20 ± 171.34 AB a |
| B 80 CT 20 | 286.80 | ± | 144.9 | AB | a | 269.40 ± 42.54 AB a |
| B 80 CTA 20 | 248.10 | ± | 107.9 | B | a | 254.50 ± 106.1 AB a |
| B 80 CTB 20 | 260.50 | ± | 60.15 | AB | a | 278.10 ± 52.49 AB a |
| B 80 CTAB 20 | 191.20 | ± | 48.94 | B | a | 264.90 ± 89.63 AB a |

*Las letras mayúsculas corresponden al comparativo entre tratamientos.

*Las letras minúsculas corresponden al comparativo de cada una de las formulaciones con respecto al tiempo.

También se realizó el análisis estadístico entre los tratamientos, donde se observa que no hay una diferencia significativa entre los tratamientos (letras mayúsculas).

3.4 Determinación de la estabilidad de las nanoemulsiones del cuarto diseño de experimentos

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión sin compuestos bioactivos, es decir, elaborada únicamente con el aceite de citronela con la finalidad de evaluar en campo el efecto repelente, indican que las emulsiones formuladas han dado como resultado la formación de sistemas nanométricos estables (**Fig. 3.20**) durante el almacenamiento a temperatura ambiente presentó una separación de fases al día 42, debido a que esta formulación ya se había elaborado en pequeña escala (50 g) y presentó una estabilidad de mas de 90 días; pero cuando se preparó la cantidad de 1.2 kg de nanoemulsión, se obtuvo una estabilidad por 42 días, indicando que es necesario modificar los parámetros de tiempo de tratamiento tanto en el homogeneizador como en el ultrasonido para obtener una estabilidad por más de 90 días, también se observó que la distribución de tamaño fue homogénea, con cargas superficiales eléctricas negativas, lo cuál se puede observar en la **Tabla 3.5** y **Fig. 3.21**, la imagen TEM (**Fig.**

3.22) de la nanoemulsión reveló la forma esférica de la nanogota y corroboró el tamaño de partícula obtenido en el equipo DLS.

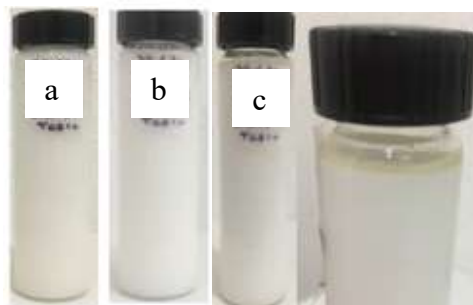


Figura 3.20 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela a) día 0 b) día 30 c) día 42 presenta separación de fases.

Tabla 3.5 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

| | | 25/75 CA | |
|-----|------------------------------|-----------------------------|--|
| Día | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) | |
| 6 | 190.45 ± 58.8 ^{bc} | -25.70 ± 1.31 ^d | |
| 13 | 154.22 ± 12.76 ^{cd} | -24.67 ± 3.12 ^{cd} | |
| 20 | 135.08 ± 13.81 ^d | -18.87 ± 0.46 ^b | |
| 27 | 152.27 ± 13.68 ^{cd} | -16.20 ± 0.83 ^{ab} | |
| 34 | 126.27 ± 9.84 ^d | -19.77 ± 3.55 ^{bc} | |
| 41 | 178.01 ± 18.07 ^{bc} | -16.28 ± 2 ^{ab} | |
| 49 | 155.22 ± 6.5 ^{cd} | -16.87 ± 0.4 ^{ab} | |
| 55 | 172.39 ± 16.86 ^{bc} | -19.60 ± 1.73 ^{bc} | |
| 77 | 195.43 ± 15.63 ^b | -11.90 ± 0.2 ^a | |
| 92 | 253.97 ± 26.37 ^a | -14.83 ± 0.93 ^{ab} | |

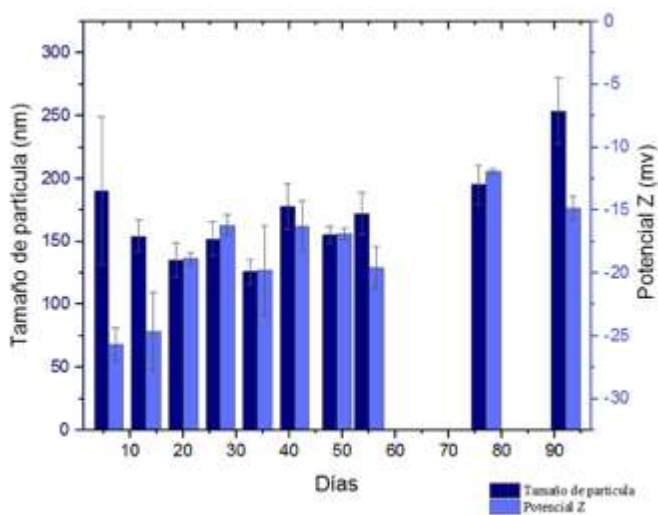


Figura 3.21 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

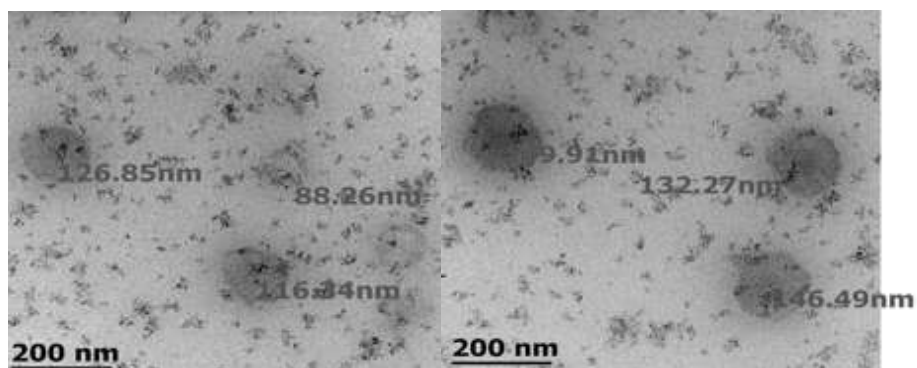


Figura 3.22 Nanogotas de forma esférica observadas a través de TEM.

Las pruebas de estrés que se realizaron tomando como base la metodología de Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al elevar la temperatura a 70°C (**Tabla 3.6**) el tamaño de partícula incrementó en promedio 49%, la carga superficial negativa aumentó 15% en promedio con respecto a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.23**) que a pesar de que el tamaño de partícula y potencial Z incrementaron sus valores el sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.6 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

| Día | 70°C | |
|-----|-----------------------------|----------------------------|
| | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 6 | 265.33 ± 21.14 ^a | -21.69 ± 2.17 ^b |
| 13 | 246.72 ± 13.16 ^a | -17.71 ± 1.42 ^a |
| 20 | 182.78 ± 9.96 ^b | -16.81 ± 1.45 ^a |
| 27 | 245.30 ± 14.02 ^a | -15.83 ± 0.31 ^a |

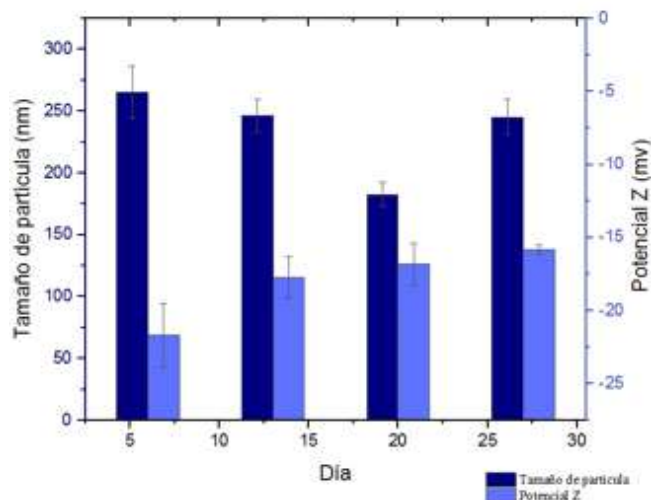


Figura 3.23 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

La segunda prueba de estrés que se realizó tomando como base la metodología de Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al centrifugar la muestra a 1000, 2000 y 3000 rpm (**Tabla 3.7**) durante 20 min la medición de pH y mV no reveló un cambio significativo al incrementar las rpm, el tamaño de partícula y la carga superficial negativa no tuvieron un cambio significativo con respecto a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.24**) que el tamaño de partícula y potencial Z del sistema se mantuvo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.7 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

| Dia | 1000rpm | | 2000rpm | | 3000rpm | | | |
|-----|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | pH | mV | pH | mV | pH | mV | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 6 | 4.02 ^a | 176.6 ^a | 4.12 ^a | 172.5 ^a | 4.11 ^a | 172.7 ^a | 157.63 ± 7.51 ^{ab} | -25.67 ± 1.12 ^a |
| 13 | 3.89 ^a | 175.5 ^a | 4.02 ^a | 168.7 ^a | 4.12 ^a | 163.3 ^a | 133.92 ± 12.27 ^b | -21.04 ± 2.77 ^a |
| 20 | 4.02 ^a | 177.4 ^a | 4.1 ^a | 173.6 ^a | 4.07 ^a | 175.6 ^a | 154.30 ± 16.18 ^a | -20.87 ± 1.29 ^a |
| 27 | 3.79 ^a | 181.4 ^a | 3.97 ^a | 169.5 ^a | 4.07 ^a | 165.1 ^a | 135.82 ± 8.11 ^{ab} | -18.77 ± 6.45 ^a |

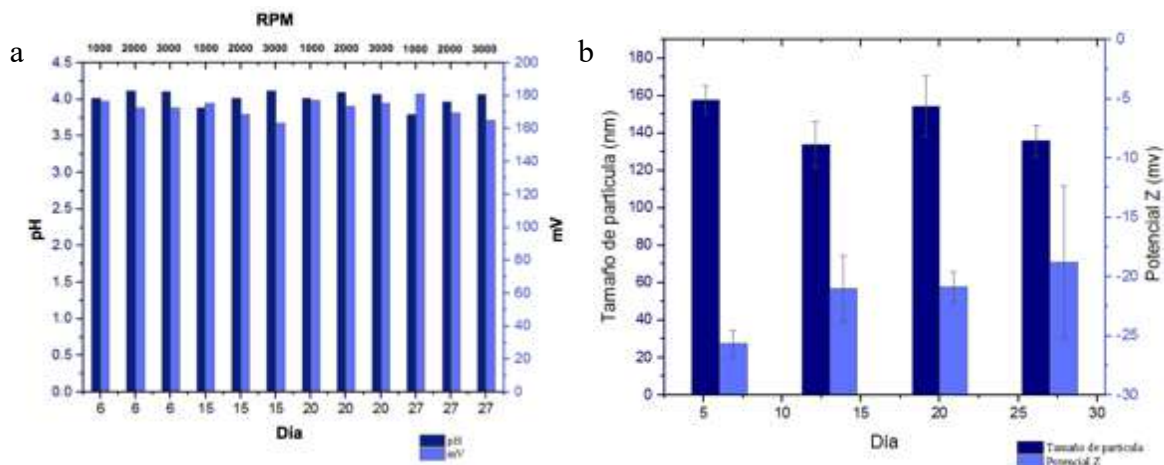


Figura 3.24 Conductividad y pH y de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión con el compuesto bioactivo A (insecticida), en el aceite de citronela (repelente) en la fase dispersa con la finalidad de evaluar en campo el efecto repelente y/o insecticida de esta nanoemulsión, indicó la formación de sistemas nanométricos estables (**Fig. 3.25**) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se observó una separación de fases al día 60, debido a que esta formulación ya se había elaborado en pequeña escala (50 g) y presentó una estabilidad de más de 90 días; en este diseño de experimentos se preparó un volumen de 1.2 kg de nanoemulsión, se concluyó que para ese volumen es necesario incrementar el tiempo de proceso tanto en el homogeneizador de alta velocidad como en el ultrasonido para obtener una estabilidad por más de 90 días, también se pudo observar que la distribución de tamaño fue homogénea, con cargas superficiales eléctricas negativas, lo cual se puede observar en la **Tabla 3.8** y **Fig. 3.26**.



Figura 3.25 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A a) día 0 b) día 30 c) día 60 presenta separación de fases.

Tabla 3.8 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

| Día | Compuesto bioactivo A | | Potencial Z (mV) |
|-----|--------------------------|------------------|------------------|
| | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) | |
| 1 | 165.20 ± 11.3 | bc | -20.53 ± 1.29 |
| 8 | 162.90 ± 12 | bc | -21.27 ± 0.25 |
| 15 | 150.12 ± 11.94 | c | -18.63 ± 0.81 |
| 22 | 181.98 ± 12.86 | ab | -21.20 ± 2.11 |
| 29 | 147.48 ± 10.29 | c | -23.23 ± 1.7 |
| 36 | 185.35 ± 12.23 | ab | -20.37 ± 1.01 |
| 44 | 154.78 ± 11.46 | c | -20.07 ± 1.12 |
| 50 | 188.62 ± 10.57 | ab | -20.00 ± 0.33 |
| 72 | 181.63 ± 20.09 | ab | -17.77 ± 0.4 |
| 87 | 207.45 ± 20.4 | a | -18.03 ± 0.31 |

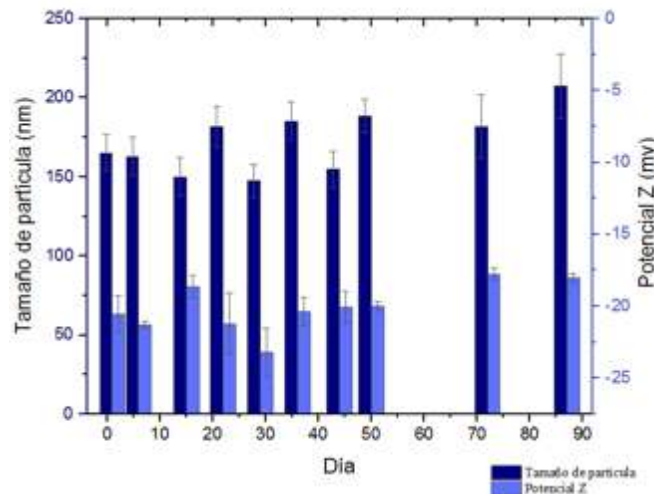


Figura 3.26 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Las pruebas de estrés que se realizaron tomando como base el protocolo establecido por Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al elevar la temperatura a 70°C (**Tabla 3.9**) el tamaño de partícula incrementó en promedio 46.7%, la carga superficial negativa aumentó 4.17% en promedio con respecto a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.27**) que a pesar de que el tamaño de partícula y potencial Z incrementaron sus valores, el sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.9 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

| Día | 70°C | | | |
|-----|--------------------------|---------|------------------|----------------------------|
| | Tamaño de Partícula (nm) | | Potencial Z (mV) | |
| 1 | 210.30 | ± 1.04 | b | -23.34 ± 2.77 ^a |
| 8 | 261.45 | ± 26.56 | a | -20.87 ± 2.35 ^a |
| 15 | 229.48 | ± 14.73 | b | -19.69 ± 2.71 ^a |
| 22 | 266.20 | ± 19.01 | a | -21.03 ± 1.06 ^a |

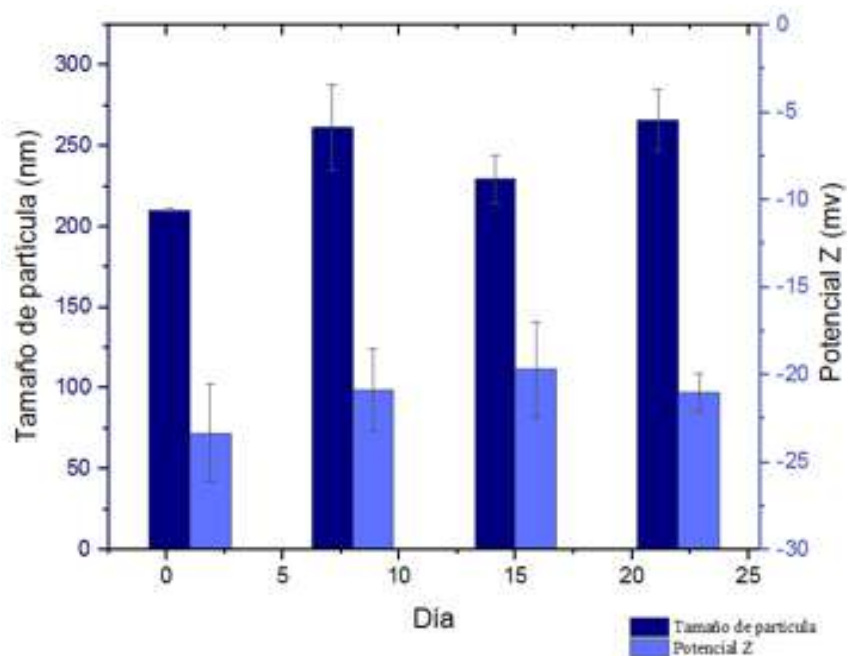


Figura 3.27 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

La segunda prueba de estrés que se realizó tomando como base el protocolo establecido por Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al centrifugar la muestra a 1000, 2000 y 3000 rpm (**Tabla 3.10**) la medición de pH y mV no reveló un cambio significativo al incrementar las rpm, el tamaño de partícula y la carga superficial negativa no tienen un cambio significativo con respecto a las muestras sin centrifugar, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.28**) que el tamaño de partícula y potencial Z del sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.10 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A, al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

| Día | 1000rpm | | 2000rpm | | 3000rpm | | | |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------------|------------------|
| | pH | mV | pH | mV | pH | mV | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 3.82 a | 188.4 a | 3.88 a | 186.2 a | 3.92 a | 184.2 a | 162.63 ± 17.14 a | -20.69 ± 0.4 b |
| 8 | 3.84 a | 179.4 a | 3.94 a | 172.3 a | 4.07 a | 167.2 a | 135.92 ± 10.35 c | -19.60 ± 0.92 ab |
| 15 | 3.89 a | 186.3 a | 4.01 a | 178.5 a | 4.06 a | 174.8 a | 158.77 ± 9.38 ab | -19.17 ± 0.25 ab |
| 22 | 3.77 a | 181.2 a | 3.95 a | 174.6 a | 3.99 a | 169.5 a | 143.30 ± 8.1 bc | -18.87 ± 0.67 a |

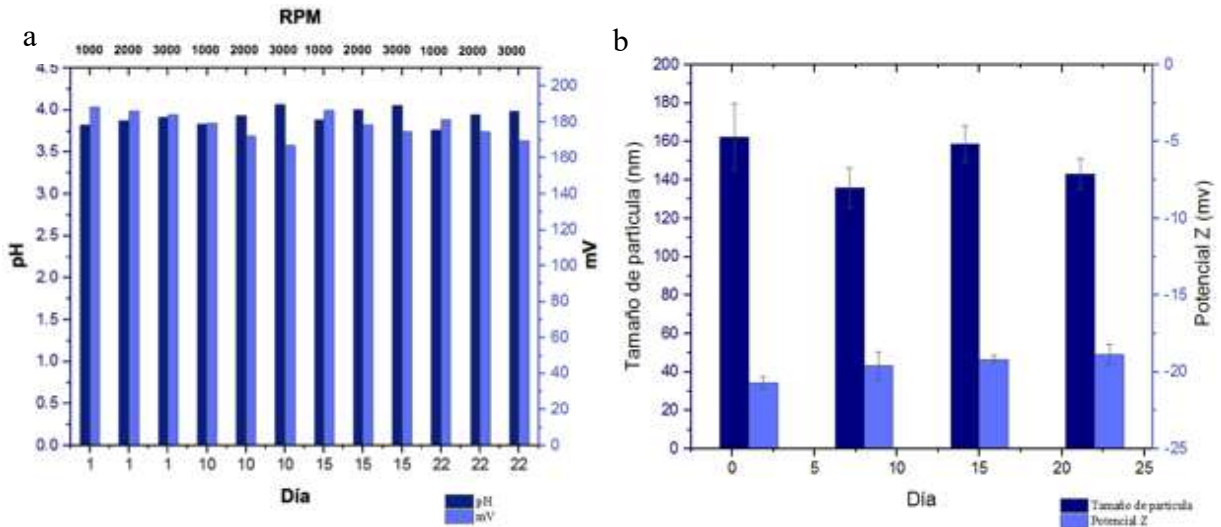


Figura 3.28 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo A al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión con compuesto bioactivo B (insecticida), en el aceite de citronela (repelente), indicaron que las emulsiones formuladas han dado como resultado la formación de sistemas nanométricos estables (**Fig. 3.29**) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se presentó una separación de fases al día 105, también se observó que la distribución de tamaño fue homogénea, con cargas superficiales eléctricas negativas, lo cuál se puede observar en la **Tabla 3.11** y **Fig. 3.30**.

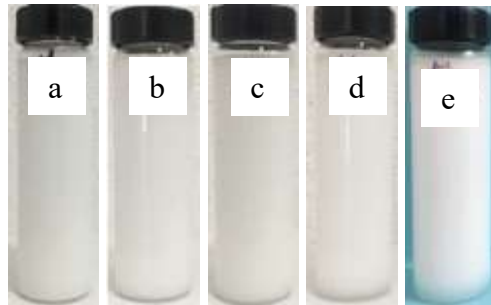


Figura 3.29 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B a) día 0 b) día 30 c) día 60 d) día 90 e) día 105 presenta separación de fases.

Tabla 3.11 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

| Día | Compuesto bioactivo B | |
|-----|------------------------------|-----------------------------|
| | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 205.60 ± 12.95 ^{ab} | -24.47 ± 2.35 ^d |
| 8 | 161.68 ± 13.95 ^{cd} | -23.77 ± 2.83 ^{cd} |
| 15 | 142.57 ± 13.09 ^d | -19.90 ± 0.85 ^{bc} |
| 22 | 180.97 ± 18.24 ^{bc} | -18.93 ± 2.44 ^{ab} |
| 29 | 144.70 ± 8.95 ^d | -21.87 ± 0.4 ^{bcd} |
| 36 | 177.15 ± 13.93 ^{bc} | -19.07 ± 0.32 ^{ab} |
| 44 | 159.69 ± 12.29 ^c | -25.43 ± 1.74 ^d |
| 50 | 191.36 ± 14.12 ^b | -19.63 ± 0.84 ^{bc} |
| 72 | 193.87 ± 16.1 ^b | -14.67 ± 0.31 ^a |
| 87 | 224.67 ± 24.33 ^a | -17.33 ± 0.6 ^{ab} |

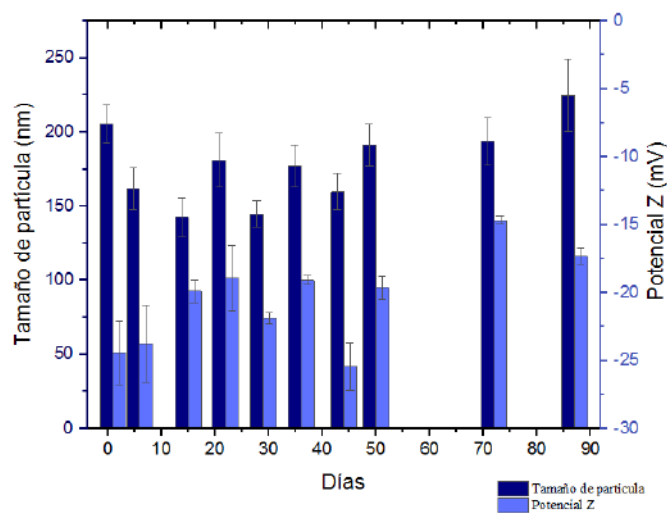


Figura 3.30 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

Las pruebas de estrés que se realizaron de acuerdo a Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al elevar la temperatura a 70°C (**Tabla 3.12**) el tamaño de partícula incrementó en promedio 46.5%, la carga superficial negativa aumentó 21.8% en promedio con respecto a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.31**) que a pesar de que el tamaño de partícula y potencial Z se incrementaron, el sistema siguió siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.12 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

| Día | 70°C | |
|-----|------------------------------|----------------------------|
| | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 285.17 ± 40.68 ^a | -27.77 ± 2.33 ^a |
| 8 | 234.73 ± 14.4 ^b | -27.34 ± 0.7 ^a |
| 15 | 222.53 ± 21.26 ^b | -27.16 ± 1.82 ^a |
| 22 | 264.25 ± 20.49 ^{ab} | -26.87 ± 1.86 ^a |

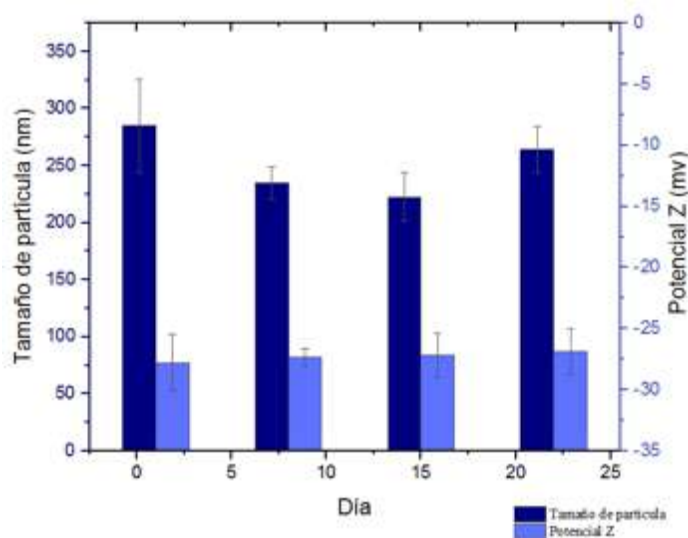


Figura 3.31 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y mentol como ingrediente bioactivo elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

La segunda prueba de estrés se realizó de acuerdo con Sethuraman *et al.*, 2013, mostraron que al centrifugar la nanoemulsión a 1000, 2000 y 3000 rpm (**Tabla 3.13**) la medición de pH y mV no reveló un cambio significativo al incrementar las rpm, el tamaño de partícula y la carga superficial negativa no tienen un cambio significativo con respecto a las muestras sin

centrifugar, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.32**) que el tamaño de partícula y potencial Z del sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.13 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

| Día | 1000rpm | | 2000rpm | | 3000rpm | | | |
|-----|---------|---------|---------|----------|---------|----------|--------------------------|------------------|
| | pH | mV | pH | mV | pH | mV | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 3.83 | a 190 | a 3.88 | a 186.5 | a 3.86 | a 186.4 | 176.25 ± 16.42 | -22.54 ± 1.61 |
| 8 | 3.85 | a 180.6 | a 3.93 | b 176 | a 4.03 | b 170.8 | 151.17 ± 13.2 | -19.58 ± 0.83 |
| 15 | 3.88 | a 187.6 | a 4 | ab 180.6 | a 4.03 | ab 178.8 | 167.64 ± 14.36 | -17.43 ± 0.85 |
| 22 | 3.74 | a 184.6 | a 3.93 | ab 180.3 | a 3.94 | ab 173.6 | 211.70 ± 4.66 | -23.17 ± 4.29 |

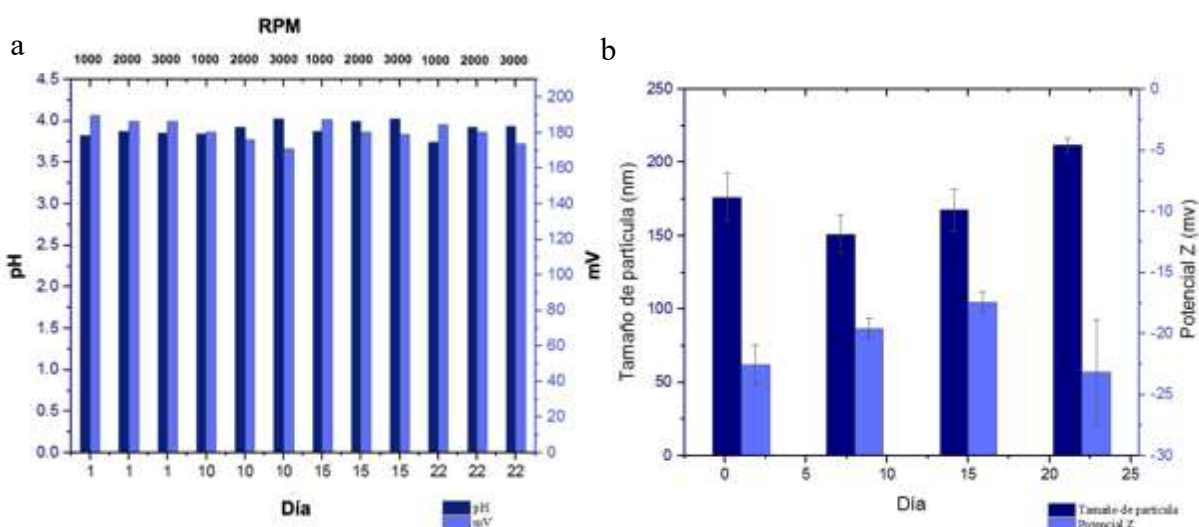


Figura 3.32 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela y compuesto bioactivo B al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la nanoemulsión con la combinación de los dos compuestos bioactivos, A y B (insecticidas) en el aceite de citronela (repelente), con la finalidad de evaluar en campo el efecto repelente y/o insecticida, indicaron que las emulsiones formuladas dieron como resultado la formación de sistemas nanométricos estables (**Fig. 3.33**) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se observó una separación de fases al día 83, debido a que esta formulación ya se había elaborado en pequeña escala (50 g) con una estabilidad de mas de 90 días y en este diseño de experimento se preparó un volumen de 1.2 Kg de muestra, se observó que es necesario modificar el tiempo de tratamiento tanto en el homogeneizador de alta velocidad como en el procesador ultrasónico, para obtener una

estabilidad por mas de 90 días, también se observó que la distribución de tamaño fue homogénea, con cargas superficiales eléctricas negativas lo cual se ve reflejado en la **Tabla 3.14** y **Fig. 3.34**, la imagen TEM (**Fig. 3.35**) de la nanoemulsión reveló la forma esférica de la nanogota y corroboró el tamaño de partícula obtenido en el equipo DLS.

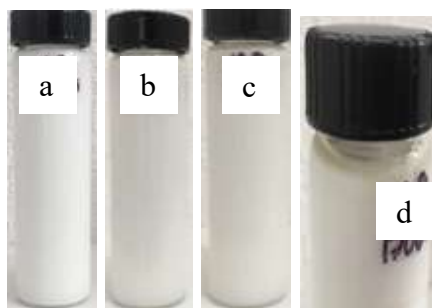


Figura 3.33 Nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B a) día 0 b) día 30 c) día 60 d) día 83 presentó separación de fases.

Tabla 3.14 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

| Día | Compuestos bioactivos A y B | | | | | |
|-----|-----------------------------|---------|----|------------------|--------|-----|
| | Tamaño de partícula (nm) | | | Potencial Z (mV) | | |
| 1 | 165.18 | ± 17.54 | bc | -26.10 | ± 3.1 | d |
| 8 | 165.47 | ± 11.35 | bc | -20.23 | ± 0.55 | abc |
| 15 | 141.38 | ± 14.19 | c | -17.37 | ± 0.49 | ab |
| 22 | 166.45 | ± 14.37 | bc | -18.00 | ± 1.31 | ab |
| 29 | 144.50 | ± 12.56 | c | -27.57 | ± 3.9 | d |
| 36 | 174.57 | ± 11.66 | b | -25.03 | ± 0.78 | cd |
| 44 | 163.43 | ± 10.02 | bc | -15.67 | ± 1.15 | a |
| 50 | 177.33 | ± 14.25 | b | -21.80 | ± 1.28 | bcd |
| 72 | 170.32 | ± 11.79 | b | -17.53 | ± 2.22 | ab |
| 87 | 211.23 | ± 14.53 | a | -18.77 | ± 2.08 | ab |

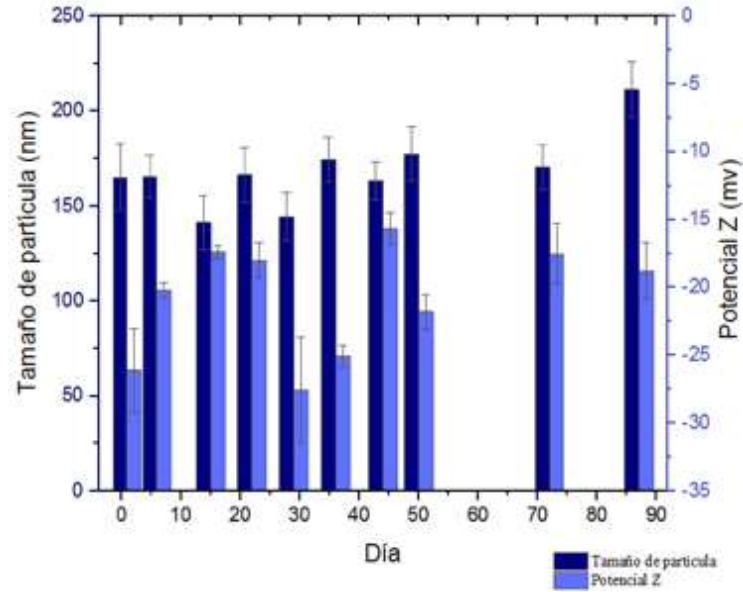


Figura 3.34 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

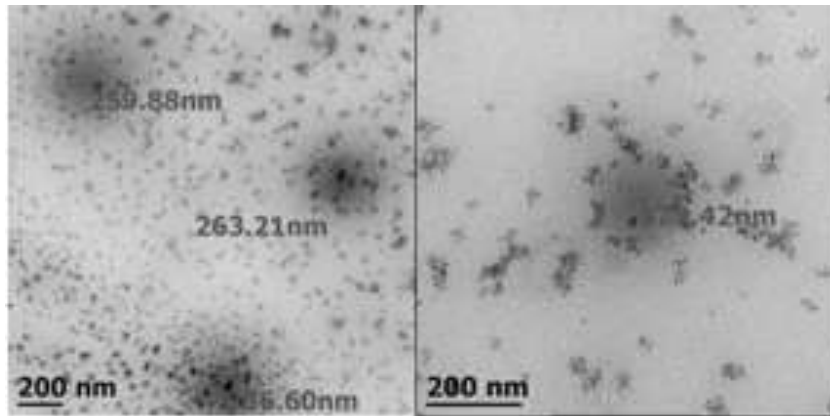


Figura 3.35 Nanogotas de forma esférica observadas a través de TEM.

Las pruebas de estrés que se realizaron tomando como base el protocolo establecido por Sethuraman *et al.* (2013), mostraron que al elevar la temperatura a 70°C (**Tabla 3.15**) el tamaño de partícula se incrementó en promedio 63.6 %, la carga superficial negativa aumentó 5.6 % en promedio con respecto a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.36**) que a pesar de que el tamaño de partícula y potencial Z incrementaron sus valores, el sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.15 Tamaños de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

| Día | 70°C | |
|-----|-----------------------------|----------------------------|
| | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 197.77 ± 0.75 ^c | -23.10 ± 2.62 ^a |
| 8 | 342.92 ± 40.07 ^a | -21.77 ± 1.51 ^a |
| 15 | 212.35 ± 13.53 ^c | -20.97 ± 1.21 ^a |
| 22 | 294.92 ± 36.16 ^b | -19.00 ± 0.36 ^a |

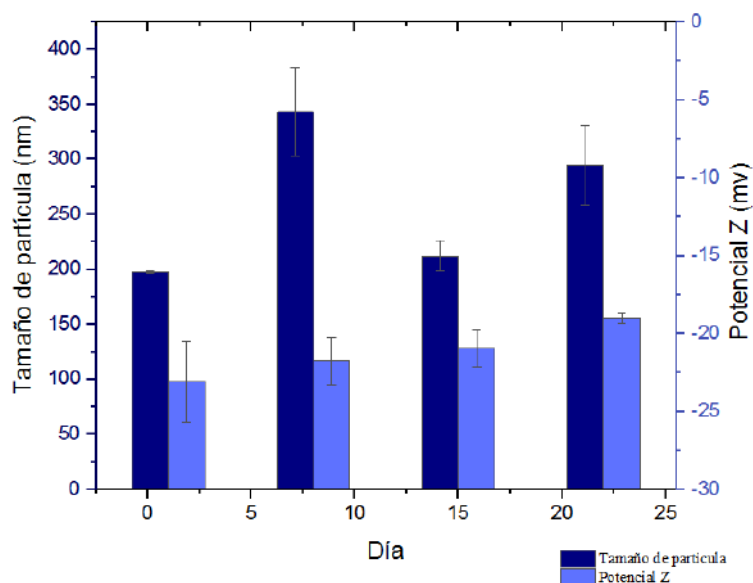


Figura 3.36 Tamaño de partícula y potencial Z de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B elevando la temperatura a 70°C antes de la medición.

La segunda prueba de estrés mostró que al centrifugar la muestra a 1000, 2000 y 3000 rpm (**Tabla 3.16**) la medición de pH y mV no reveló un cambio significativo al incrementar la velocidad de centrifugación, el tamaño de partícula y la carga superficial negativa no tienen un cambio significativo con respecto a las muestras que no se sometieron a estas pruebas de estrés, al graficar los valores se observó (**Fig. 3.37**) que el tamaño de partícula y potencial Z del sistema sigue siendo nanométrico, estable y homogéneo.

Tabla 3.16 Medición de pH y mV de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B al centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, el tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

| Día | 1000rpm | | 2000rpm | | 3000rpm | | | |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------------|------------------|
| | pH | mV | pH | mV | pH | mV | Tamaño de Partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
| 1 | 3.83 | a 188.5 | a 188.5 | a 187.4 | a 188 | a 188 | 165.14 ± 16.22 | -21.97 ± 0.74 |
| 8 | 3.86 | a 178 | b 178 | b 174 | a 170.1 | b 170.1 | 138.12 ± 12.65 | -18.73 ± 0.32 |
| 15 | 3.89 | a 186.8 | a 186.8 | a 183.3 | a 181.5 | a 181.5 | 156.80 ± 8.58 | -16.73 ± 0.15 |
| 22 | 3.88 | a 175.4 | b 175.4 | b 170.5 | b 166.7 | b 166.7 | 140.60 ± 10.36 | -14.10 ± 1.04 |

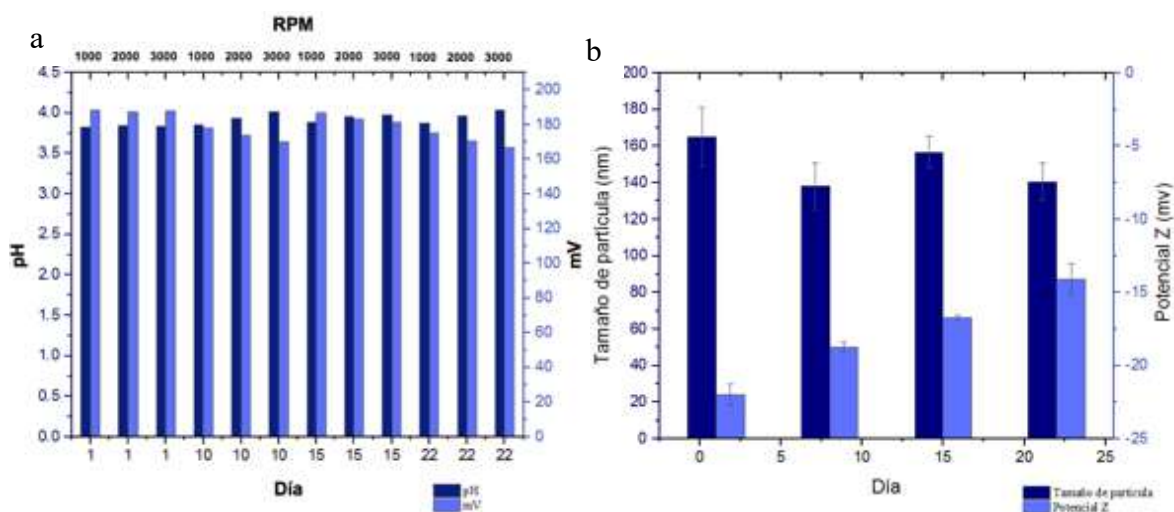


Figura 3.37 Conductividad y pH de la nanoemulsión elaborada con aceite de citronela, compuestos bioactivos A y B al a) centrifugar a 1000, 2000 y 3000 rpm, b) tamaño de partícula y potencial Z se midió después de las 3000 rpm.

De acuerdo a las dos pruebas de estrés realizadas por Zeng *et al.* (2019) en las formulaciones de nanoemulsiones, que consistieron en centrifugar a 5000 rpm durante 30 minutos y sometiéndolas a temperaturas entre 4 y 75°C, con la finalidad de evaluar la estabilidad, observaron que no ocurrió la formación de “creaming”, floculación ni separación de fases en ambas pruebas de estrés, lo cual indicó que se formaron sistemas nanométricos estables.

Las formulaciones de este trabajo: 25/75 Ca, A, B y AB, fueron sometidas a condiciones de estrés, la primera prueba consistió en centrifugar a 1000 rpm durante 20 min, se repitió el procedimiento anterior incrementando las rpm a 2000 y 3000 posteriormente se determinó el tamaño de partícula y potencial Z, este procedimiento se realizó 4 veces en diferentes tiempos, sin mostrar cambios físicos como la formación de “creaming”, floculación ni separación de fases. La segunda prueba consistió en elevar la temperatura a 70°C y medir tamaño de partícula y potencial Z, resultados que revelaron un incremento de hasta el 63% del tamaño de partícula

en comparación con las nanoemulsiones que no fueron sometidas a esta condición de estrés, sin embargo, no se presentó la formación de “creaming”, floculación ni separación de fases. Estos resultados nos indican que al igual que el trabajo reportado por Zeng *et al.* (2019) se formaron sistemas nanométricos estables.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanoemulsiones estables por más de 90 días utilizando dos métodos de alta energía, lo cual es mayor al tiempo reportado por algunos trabajos similares que indican 60 días.

La nanoemulsión 25/75 GA Ca, presentó estabilidad física durante más tiempo (120 días), tamaños de partículas desde 126.27 ± 9.84 hasta 253.97 ± 26.37 nm, con carga superficial negativa desde -25.7 ± 1.31 hasta -14.83 ± 0.93 mV, la micrografía TEM reveló la forma esférica de las nanogotas.

La nanoemulsión 75/25 GA Ca mantuvo su estabilidad física durante 113 días, los tamaños de partícula que se obtuvieron fueron desde 110.23 ± 6.67 hasta 435.0 ± 124.3 nm, lo cual nos indica un sistema menos estable en comparación con la formulación 25/75 GA Ca.

Cuando se emplearon dos métodos de alta energía para la elaboración de nanoemulsiones, se obtuvieron tamaños de partículas desde 117.9 ± 2.86 hasta 369.9 ± 94.68 nm y estabilidad física por 120 días, mientras tanto, las formulaciones que sólo pasaron por el homogeneizador de alta velocidad, tuvieron tamaños de partícula 200.9 ± 75.47 hasta 555.8 ± 49.91 nm y estabilidad física por 30 días, razón por la cual es conveniente utilizar dos métodos de alta energía para la obtención de sistemas nanométricos estables por más tiempo.

Las formulaciones elaboradas en una relación 90% fase continua, 10% fase dispersa presentaron tamaños de partícula desde 117.9 ± 2.86 hasta 286.8 ± 149.9 nm y mayor tiempo de estabilidad (38 días) que aquellas formuladas en una relación 80% fase continua, 20% fase dispersa, tuvieron tamaños de partícula desde 153.3 ± 43.24 hasta 325.6 ± 154.18 nm y menor tiempo de estabilidad (16 días).

Las nanoemulsiones de la cuarta etapa fueron sometidas a pruebas de estrés que consistieron en elevar la temperatura a 70°C lo cual incrementó significativamente el tamaño de partícula (hasta un 63.6%) y la carga eléctrica superficial (hasta 21.8%), con respecto a las formulaciones que se almacenaron a temperatura ambiente. Sin embargo, cuando las muestras fueron centrifugadas

no se observó un cambio significativo en el tamaño de partícula ni en la carga eléctrica superficial, con respecto a las nanoemulsiones que no fueron sometidas a esta prueba, de igual manera, las mediciones de pH y mV se mantuvieron constantes conforme se elevaba la velocidad de centrifugación.

El trabajo experimental realizado hasta el momento, indica que se han encontrado los parámetros adecuados para formular sistemas nanométricos estables, que puedan servir como base para la formulación de nanoemulsiones elaboradas con ingredientes naturales, que tenga la capacidad de ser amigable con el ambiente, que no genere efectos tóxicos en el fruto, suelos, aguas u otros insectos polinizadores y que al mismo tiempo ayuden a mejorar el rendimiento de la cosecha del fruto *A. muricata* u otros cultivos, lo cual impacta directamente en el costo de los mismos, por lo que tendría alto potencial de aplicación en el sector agrícola, como posibles estrategias alternativas para el control de plagas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*, 5(3), 139–157. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>
- Atawodi, S. (2011). Nigerian foodstuffs with prostate cancer chemopreventive polyphenols. *Infectious Agents and Cancer*, 6(SUPPL. 2), 2–5. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-6-S2-S9>
- Badrie, N., & Schauss, A. G. (2010). Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In *Bioactive Foods in Promoting Health*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00039-6>
- Bernal, C., & Rodríguez, K. (2019). Estudio de dispersiones de un sistema de parafina-agua-surfactante. *Revista de Ingeniería*, 29(1), 99–111. Retrieved from <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria>
- 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>
- Betancur-Galvis, L. A., Saez, J., Granados, H., Salazar, A., & Ossa, J. E. (1999). Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(4), 531–535. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000400019>
- Beyra, Á., León, M. del C., & Iglesias, E. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España y Portugal*, 61(2), 185–203.
- Cardozo-Márquez, C. J., Cartagena-Valenzuela, J. R., & Correa-Londoño, G. A. (2013). Determination of Soursop (*Annona muricata* L. cv. Elita) fruit volatiles during ripening by electronic nose and gas chromatography coupled to mass spectroscopy. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 66(2), 7117–7128.
- Çınar, K. (2017). A review on nanoemulsion: Preparation methods and stability. *Trakya Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 18(1), 73–83. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/tujes%0Ahttp://dergipark.gov.tr/tujes/issue/27499/369773>
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-González, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018, July 1). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martín-Martínez, E. S., & Yañez Fernández, J. (2014). Light scattering dynamics in determining size of polymeric nanoparticles. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8(4), 4314-1-4314–4315.
- Dagar, H. S., & Dagar, J. C. (1991). Plant folk medicines among the nicobarese of Katchal Island, India. *Economic Botany*, 45(1), 114–119. <https://doi.org/10.1007/BF02860056>

- Desouza, C. V., Hamel, F. G., Bidasee, K., & O'Connell, K. (2011). Role of inflammation and insulin resistance in endothelial progenitor cell dysfunction. *Diabetes*, *60*(4), 1286–1294. <https://doi.org/10.2337/db10-0875>
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(3), 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C., & Solans, C. (2001). Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*, *17*, 2076–2083. <https://doi.org/10.1021/la001362n>
- Hajdu, Z., & Hohmann, J. (2012). An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, *139*(3), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.029>
- Hernández Fuentes, Luis M., Martínez Bautista, N., Carrillo Sánchez, J. L., Sánchez Arroyo, H., Urías López, M. A., & Salas Araiza, M. D. (2008). Control del barrenador de las semillas, *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) en guanábana, *Annona muricata* L. (Annonales: Annonaceae). *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*, *24*, 199–206. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57524110>
- Hernández Fuentes, Luis Martin, Nolasco González, Y., & Cruz Gutiérrez, E. J. (2017). *Selección y caracterización de guanábana y recomendaciones para su manejo agronómico* (Primera ed). Folleto técnico Núm. 34. INIFAP-Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. 57 p.
- Hernández, L., Gómez, R., & Orozco, M. (2014). *El barrenador de las semillas Bephratelloides cubensis y su manejo en el cultivo de la guanábana* (1st ed.). Libro científico Núm. 1. Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. 73pp.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Jiménez-Ruiz, E. I., Sumaya-Martínez, M. T., & Bello-Lara, J. E. (2018). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *8*(5), 1155. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.115>
- Joyeux, M., Mortier, F., & Fleurentin, J. (1995). Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plant extracts used in Caribbean folk medicine. *Phytotherapy Research*, *9*(3), 228–230. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090316>
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Phytochemistry Menthol : A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, *96*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>
- Koroleva, M. Y., & Yurtov, E. V. (2012). Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, *81*(1), 21–43. <https://doi.org/10.1070/rc2012v081n01abeh004219>
- Kossouh, C., Moudachirou, M., Adjakidje, V., Chalchat, J. C., & Figuéredo, G. (2007). Essential oil chemical composition of *annona muricata* l. leaves from Benin. *Journal of Essential Oil Research*, *19*(4), 307–309. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699288>

- Langenberger, G., Prigge, V., Martin, K., Belonias, B., & Sauerborn, J. (2009). Ethnobotanical knowledge of Philippine lowland farmers and its application in agroforestry. *Agroforestry Systems*, 76(1), 173–194. <https://doi.org/10.1007/s10457-008-9189-3>
- Leatemala, J. A., & Isman, M. B. (2004). Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran Larvae. *Phytoparasitica*, 32(1), 30–37. <https://doi.org/10.1007/BF02980856>
- Magaña-Alejandro, M. A., Gama-Campillo, L. M., & Mariaca-Méndez, R. (2010). El uso de plantas medicinales en las comunidades Mayas chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*, (29), 213–262. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62112471011>
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 475–485. <https://doi.org/10.1080/10942910600596464>
- Maia, M. F., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents : a review of their efficacy , development and testing PMD from lemon eucalyptus (*Corymbia citriodora*) extract. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1), 1–15.
- Monigatti, M., Bussmann, R. W., & Weckerle, C. S. (2013). Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.066>
- Murcia, D. A., & Salamanca, M. F. (2006). *Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de B.maculicollis, plaga de A. muricata*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Nguyen-Pouplin, J., Tran, H., Tran, H., Phan, T. A., Dolecek, C., Farrar, J., ... Grellier, P. (2007). Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.011>
- Nor Bainun, I., Alias, N. H., & Syed-Hassan, S. S. A. (2015). Nanoemulsion: formation, characterization, properties and applications - A Review. *Advanced Materials Research*, 1113, 147–152. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1113.147>
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Journal of Colloid and Interface Science Low-energy formation of edible nanoemulsions : Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid And Interface Science*, 388(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>
- Pereira, M. J., dos Anjos, N., & Eiras, A. (1997). Cortejo y cópula en la broca de la semilla de la guanábana, *I*, 105–108.
- Pinto, A. C. de Q., & Williams, J. T. (2005). *Annona species*. (J. T. Williams, R. W. Smith, A. Hughes, N. Haq, & C. R. Clement, Eds.) (1st ed.). International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton.

- Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>
- Sakulku, U., Nuchuchua, O., Uawongyart, N., & Puttipipatkachorn, S. (2009). Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion, 372, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.029>
- Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R., & Arnason, J. T. (2008). A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Sethuraman Sarojini, K. S., & C.H. Anjali, A. R. (2013). Formation and stability of oil-in-water nano emulsion containing turmeric oil. *Trade Science Inc. Bio Thecnology An Indian Journal*, 9(4), 171–175. <https://doi.org/10.1167/6.11.8>
- Shinoda, K., & Saito, H. (1968). The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Journal of Colloid And Interface Science*, 26(1), 70–74. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90273-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90273-7)
- Sierra, M. (2015). Consideraciones sobre surfactantes. In *Repositorio digital UNS* (pp. 1–19). Retrieved from http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/1992/5/CAPITULO_1.pdf
- 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>
- 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>
- Weiss, J., & McClements, D. J. (2000). Influence of Ostwald ripening on rheology of oil-in-water emulsions containing electrostatically stabilized droplets. *Langmuir*, 16(5), 2145–2150. <https://doi.org/10.1021/la9909392>
- Zeng, L., Liu, Y., Pan, J., & Liu, X. (2019). Formulation and evaluation of norcanthridin nanoemulsions against the *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *BMC Biotechnology*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0508-8>
- Zuidam, N. J., & Nedović, V. A. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. (N. J. Zuidam & V. A. Nedović, Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0>