

## Formulación y evaluación de la estabilidad de una serie de vehículos, para el desarrollo de un biopesticida a base de aceite esencial de *Acantholippia deserticola*

### Formulation and evaluation of the stability of a series of vehicles for the development of a biopesticide based on *Acantholippia deserticola* essential oil

Karina Zarría Torres <sup>1</sup>, Sandra Gajardo Solari <sup>1,2</sup>, Julio Benites Vilchez <sup>1,2</sup>, José López Vivar <sup>1,2</sup>, Mauricio Rojas Arredondo <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad Arturo Prat. Iquique, Chile.

<sup>2</sup>Instituto de Etnofarmacología, Universidad Arturo Prat. Iquique, Chile.

Dirección para correspondencia: Sandra Gajardo Solari. Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Instituto de Etnofarmacología, Universidad Arturo Prat. Av. Arturo Prat N° 2120, Iquique, Chile.

Tel: 56-57-394635

Email: sandra.gajardo@unap.cl

Recibido para publicación en 11/08/10

Aceptado en 20/12/10

#### RESUMEN

Los pesticidas derivados de las plantas están adquiriendo un nuevo uso como alternativa a los plaguicidas de uso convencional, los que hoy en día resultan perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. Un ejemplo de este tipo de plantas es *Acantholippia deserticola*, un arbusto que crece en la zona altoandina del norte de Chile, popularmente conocida con el nombre de "rika-rika". Su aceite esencial posee en su mayoría  $\alpha$  y  $\beta$  tujonas, monoterpenos sobre los cuales se ha comprobado su actividad como pesticidas naturales. El propósito del presente estudio fue realizar una serie de formulaciones como posibles vehículos para el aceite esencial de *Acantholippia deserticola*, el criterio de selección de la formulación definitiva fue por medio de estabilidad preliminar y estabilidad centrífuga. Dadas sus propiedades se eligió una microemulsión como vehículo definitivo para el aceite esencial de "rika-rika". Se realizó la formulación de una microemulsión tipo O/W por medio de un diagrama de fases pseudoternario. Pruebas de control de calidad como: transparencia óptica, centrifugación, pH, estrés térmico y estabilidad acelerada, fueron realizadas para determinar la estabilidad del vehículo, y además se caracterizó en relación con su comportamiento electroconductor. Estas pruebas demostraron la eficacia de la microemulsión pesticida como un posible vehículo para el aceite esencial. Por medio de cromatografía de capa fina se comprobó que durante 120 días no se produjo

degradación del aceite esencial encapsulado en la microemulsión formulada, y por medio de GC-FID, se comprobó la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$  tujonas en este periodo de tiempo.

**Palabras Clave:** *Acantholippia deserticola*, biopesticida, microemulsión, tujonas.

#### ABSTRACT

Pesticides derived from plants are gaining a new use as an alternative to the conventional pesticides used today which are harmful to the environment and human health, an example of such plants is *Acantholippia deserticola* a bush that grows in Andean zone of northern Chile, popularly known as "rika-rika", they essential oil has mostly  $\alpha$  and  $\beta$  thujone, monoterpenes which has proven its activity as natural pesticides. The purpose of this study was to conduct a series of formulations as potential vehicles for *Acantholippia deserticola* essential oil, the selection criteria for the final design was by means of centrifugal stability and preliminary stability. Due to its properties a microemulsion was chosen as the final vehicle for *Acantholippia deserticola* essential oil. We performed an O/W microemulsion by means of a pseudoternary phase diagram. Quality control tests such as optical transparency, centrifugation, pH, heat stress and accelerated stability were conducted to determine the stability of the vehicle, and also characterized with regard to its electroconductive behavior. These tests demonstrated the effectiveness of pesticide

microemulsion as a possible vehicle for the essential oil. Using thin layer chromatography it was found that for 120 days there was no degradation of the essential oil encapsulated in microemulsion formulated, and by GC-FID, as the presence of  $\alpha$  and  $\beta$  thujone in this period of time.

**Key Words:** *Acantholippia deserticola*, biopesticide, microemulsion, thujones.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día la producción agrícola utiliza pesticidas de síntesis química para combatir una gran variedad de plagas.<sup>1</sup> Los seres humanos están expuestos a los plaguicidas por diferentes vías de exposición, como inhalación, ingestión y contacto con la piel; esto da como resultado problemas de salud agudos y crónicos.<sup>2</sup> El uso excesivo de plaguicidas sintéticos en los campos de cultivo y en el medio ambiente urbano para deshacerse de las plagas nocivas se ha traducido en un mayor riesgo de resistencia a éstos, el aumento del resurgimiento de plagas, además de las consecuencias toxicológicas para la salud humana y el aumento de la contaminación del medio ambiente. En Chile, la situación no dista de lo contrario, la intoxicación aguda por plaguicidas corresponde a un problema emergente de salud pública, derivado del uso de éstos y asociado principalmente a la existencia de falencias en las medidas de prevención, así como al limitado control y fiscalización, en especial de los lugares de trabajo.<sup>3</sup> Es por esto, que se están realizando esfuerzos para reemplazar a estos productos químicos sintéticos por alternativas derivadas de productos naturales, que son más seguras y no causan efectos toxicológicos sobre el medio ambiente. Los biopesticidas son ciertos tipos de plaguicidas derivados de materiales naturales, las principales ventajas del desarrollo de éstos, es que afectan sólo a la plaga y a los organismos estrechamente relacionados, en contraste con los pesticidas convencionales de amplio espectro, que pueden afectar a organismos tan diferentes como aves, insectos y mamíferos.<sup>4</sup>

Teniendo en cuenta que las plantas sintetizan metabolitos para defenderse del ataque de herbívoros, se ha demostrado que la aplicación de extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de ellas tienen la capacidad de ocasionar algún efecto inhibitorio sobre una gran variedad de insectos.<sup>5</sup> Los componentes con actividad insecticida de los aceites esenciales de muchas plantas son monoterpenos. Los aceites esenciales constituyen una alternativa potencial como plaguicidas naturales biodegradables, éstos se obtienen de las partes aéreas de la planta, a través de vapor o hidrodestilación.<sup>6,7</sup> En el norte de Chile, una variedad de plantas son utilizadas como cura para diferentes afecciones y enfermedades, entre éstas *Acantholippia deserticola*

(Phil. ex F. Phil.) Moldenke conocida popularmente como "rika-rika", un arbusto que crece en la zona altoandina en la región de Tarapacá. La infusión de las partes aéreas de esta planta, se usa en la medicina tradicional para combatir las afecciones y desórdenes estomacales, problemas hepáticos, desórdenes cardiovasculares y como afrodisíaco. Mediante estudios por cromatografía gaseosa acoplada a masa (GC-MS) se ha determinado la composición del aceite esencial de esta planta, identificándose como mayores componentes los metabolitos secundarios,  $\alpha$  y  $\beta$ -tuyona,<sup>8</sup> terpenos a los cuales se les ha comprobado las propiedades biopesticidas.<sup>9</sup>

Por otra parte, la elección de la formulación de un plaguicida está influenciada por varios factores, tales como las propiedades físicas, químicas y biológicas; el modo de aplicación, el cultivo a tratar, y las prácticas agrícolas. Es por esas razones que estos productos se dividen en un número de diferentes tipos de formulaciones.<sup>10</sup> Dentro de ellas, los concentrados emulsionables han sido utilizados por un largo tiempo, sin embargo, éstos necesitan grandes cantidades de disolventes orgánicos que son perjudiciales para el hombre y su medio ambiente. Por lo tanto, hay una demanda de nuevas formulaciones de plaguicidas a base de agua, que sean limpios, seguros y que tengan un impacto mínimo sobre el medio ambiente. Entre ellos, la formulación en emulsión O/W y microemulsión de plaguicidas ha sido muy popular.<sup>11,12</sup>

Dado que los insecticidas de origen vegetal son considerados como una alternativa al uso de plaguicidas de origen sintético y debido a que *Acantholippia deserticola* posee dentro de sus metabolitos secundarios terpenos que han demostrado su actividad biopesticida, en el presente estudio se pretendió encontrar el vehículo más adecuado para el aceite esencial de esta planta para ser utilizado como pesticida natural. Al producto seleccionado se realizaron los estudios de control calidad pertinentes y se evaluó su estabilidad en el tiempo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Materia prima vegetal.** Aceite esencial de *Acantholippia deserticola* (Phil. ex F. Phil.) Moldenke "rika-rika", la cual fue colectada en la localidad de Colchane, región de Tarapacá, Chile, latitud S°1918194, longitud W68°41125', altura 3784 m.s.n.m. Identificada por el botánico Dr. Roberto Rodríguez de la Universidad de Concepción, Chile. Número de voucher CONC 158057.

**Reactivos.** Aceite de almendras, aceite de coco, aceite de ricino, aceite de oliva, ácido esteárico, alcohol cetílico, carbopol 940<sup>®</sup>, carboximetilcelulosa, lauril sulfato de sodio, monooleato de sorbitan (Span 80<sup>®</sup>),

polivinilpirrolidona, polisorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>), parafina líquida, propilenglicol, vaselina líquida.

**Solventes.** Acetato de etilo, éter de petróleo, etanol, hexano.

**Equipos e instrumentos.** Agitador mecánico Daihan Scientific EZ Stir HS50A, autoclave Vertical Phoenix AV-50 plus, balanza granataria Sartorius BL500, balanza analítica Sartorius MS 2105, baño termoregulado Julabo SW22, cromatógrafo gaseoso Varian 3800, centrífuga EBA-20 Hettich, conductímetro Benchop Orion 3 star, equipo tipo Clevenger, estufa BTW Binder, estufa de cultivo Memert modelo 600 D06062, manifold de vacío de SPE Novagen, microscopio Kyoto Optical modelo BL-1100, placa calefactora Fisatom modelo 735 A, pH-metro WTN pH 3301/set, termómetro mínima - máxima.

**Extracción aceite esencial de *Acantholippia deserticola*.** Se adquirieron las partes aéreas de *Acantholippia deserticola* de la localidad de Colchane, región de Tarapacá, Chile. Se realizó la extracción del aceite esencial a través de hidrodestilación usando un aparato tipo Clevenger por 3 horas.

**Preformulación de vehículos.** Se realizó la formulación de una gama de vehículos: concentrados emulsionables, emulsiones fluidas y microemulsiones. Luego se determinó entre éstos, aquel que presentó las mejores características en cuanto a estabilidad y propiedades fisicoquímicas.

Se siguió el siguiente procedimiento para su preparación:

- Concentrado emulsionable: en un vaso precipitado se agregó la fase oleosa (vaselina o parafina) y el tensioactivo (Tween 80<sup>®</sup> o Span 80<sup>®</sup>), luego se incorporó la fase acuosa (agua) y se agitó en un agitador mecánico, hasta lograr la dilución del concentrado emulsionable.
- Emulsiones fluidas O/W: en un vaso se pesaron los componentes correspondientes a la fase oleosa (ácido esteárico, parafina, aceite de coco) y se añadió Span 80<sup>®</sup>; en otro vaso se pesó la fase acuosa (agua) y se agregó Tween 80<sup>®</sup>, los vasos se llevaron a un baño termoregulado hasta alcanzar una temperatura de 70°C. Los vasos fueron retirados y se incorporó lentamente la fase acuosa sobre la oleosa y se sometió a un baño con agua fría.
- Microemulsión O/W: se realizó incorporando en un vaso precipitado la fase oleosa y Tween 80<sup>®</sup>. En otro vaso se incorporó el lauril sulfato de sodio y la fase acuosa.

#### **Preparación de una microemulsión con propiedad biopesticida**

**Elaboración diagrama de fases pseudoternario.** El diagrama de fases pseudoternario se elaboró utilizando un sistema con los siguientes componentes: Tween 80<sup>®</sup>

y lauril sulfato de sodio (5:1) como surfactantes, propilenglicol y etanol (1:1) como cosurfactantes, aceite esencial de "rika-rika" como fase oleosa y agua destilada como fase acuosa. El diagrama de fases se desarrolló mediante la titulación de las muestras con alícuotas de agua en incrementos de 10% en un intervalo comprendido entre 10% y 100%.

**Selección de una formulación de microemulsión para un estudio detallado.** A partir del diagrama de fases pseudoternario, se seleccionó una mezcla de surfactante/cosurfactante, con una concentración de aceite esencial al 5% v/v correspondiente a la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) en la que se observó mortalidad en la araña falsa de la vid, insecto plaga de la agricultura chilena.

#### **Caracterización de una microemulsión O/W con propiedad biopesticida**

**Medición de la conductividad eléctrica de la microemulsión.** Se midió la conductividad eléctrica de la muestra formulada con un conductímetro a 25°C.

**Medición de pH.** El pH de la microemulsión fue medido por medio de un pH-metro a 25°C. El pH fue medido durante 16 semanas.

**Centrifugación.** Para determinar la estabilidad de la microemulsión seleccionada como vehículo final, ésta fue centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos a 25°C.

#### **Estudios de estabilidad**

**Estrés térmico.** Se almacenó una muestra de 50 mL de microemulsión, siendo sometida a condiciones de temperaturas extremas de 5°C ± 2 y 40°C ± 2, durante 6 ciclos alternados de congelamiento y descongelamiento por un tiempo de 12 días.

**Estabilidad acelerada.** Se almacenaron muestras de 50 mL. Las condiciones de almacenaje fueron: temperatura ambiente (25°C ± 2), temperatura baja (5°C ± 2) y temperatura elevada (40°C ± 2), las muestras fueron almacenadas por un tiempo de 120 días.

Los intervalos de análisis fueron los días: 0, 3, 7, 15, 30, 60, 90 y 120, en donde tiempo cero correspondía a 24 horas luego de la formulación del producto. En cada tiempo predeterminado las muestras fueron removidas de las condiciones respectivas para realizar la evaluación de la estabilidad tanto química como física.

**Análisis cualitativo en el tiempo, del aceite esencial de *Acantholippia deserticola* por medio de cromatografía capa fina.** La identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial, se realizó por medio de cromatografía capa fina en placas de sílica gel de 2.5 x 5 cm. El eluyente utilizado fue una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (3,5 : 0,5), y las zonas separadas fueron reveladas utilizando yodo (I<sub>2</sub>). Por

medio de capilares se depositaron las muestras en las placas de sílica gel, se trazaron tres puntos que correspondían a las muestras de aceite esencial (AE), mezcla (M) de microemulsión y aceite esencial y microemulsión (ME). El estudio se realizó teniendo en cuenta tres temperaturas de almacenamiento: refrigeración ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) y elevada ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), durante un tiempo de 120 días. El análisis de cada muestra se realizó en los intervalos de tiempo: 0, 30, 60, 90 y 120 días.

**Estudio de la estabilidad de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas en el tiempo a diferentes temperaturas por cromatografía gaseosa con detección FID.** Se evaluó la estabilidad de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyona en la microemulsión, sometida a temperaturas de 5, 25 y  $40^{\circ}\text{C}$  en tiempo cero y en un tiempo de 120 días, por cromatografía gaseosa (GC) con detección FID, previamente se extrajeron las tuyonas de la microemulsión por extracción en fase sólida (SPE).

**Extracción en fase sólida SPE.** Las tuyonas fueron extraídas de la microemulsión usando SPE, sobre una columna Variant BOND ELUT con 200 mg de C18 y con una capacidad de 3 mL. El acondicionamiento del BOND ELUT se realizó con lavados de 1 mL de agua. Luego, se sembró 500  $\mu\text{L}$  de la microemulsión sometida a vacío controlado en un manifold de SPE, posteriormente se sometió a lavados con 2 mL de agua grado HPLC y llevado a vacío hasta total sequedad. Finalmente se eluyeron las tuyonas con 2 mL de mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (3,5 : 0,5, v/v). El extracto fue sometido hasta sequedad total con una corriente de nitrógeno. Luego fue reconstituido en 500  $\mu\text{L}$  de hexano grado cromatográfico.

**Cromatografía Gaseosa.** El perfil de la  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas se realizó en un cromatógrafo gaseoso Varian 3800GC, con detección FID y se utilizó para su integración un sistema de datos Star Toolbar. Se utilizó una columna Varian CP SIL 8CB (30 m x 0,25 mm., 1,0  $\mu$  film) y se

realizó una rampla de temperatura desde  $70^{\circ}\text{C}$  (se mantuvo por 5 min) hasta  $220^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; el detector FID y el inyector (splitless) se mantuvieron a  $250^{\circ}\text{C}$  y  $240^{\circ}\text{C}$  respectivamente; el gas carrier utilizado fue helio (He); a una presión constante 55 Kpa, se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de extracto orgánico con un tiempo de análisis de 80 minutos.

**Control microbiológico.** La muestra se inoculó por medio de estrías en placas de agar Müeller-Hinton. Las placas fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  en una estufa de cultivo por 24, 48, 72 y 96 horas, en donde en cada intervalo de tiempo se evaluó si existía algún tipo de crecimiento bacteriano y/o fúngico.

## RESULTADOS

**Extracción del aceite esencial de *Acantholippia deserticola*.** Se pesaron 150 g de partes aéreas de *Acantholippia deserticola* "rika-rika", de donde se obtuvo un rendimiento de 4 mL de aceite esencial.

**Preformulación de los vehículos.** Se elaboraron concentrados emulsionables (Tabla 1), los cuales una vez disueltos en agua, presentaron separación de fases. Por lo que se procedió a formular diferentes emulsiones (Tabla 2), como vehículos para el aceite esencial de "rika-rika". Para su formulación se utilizó el método de inversión de fases y se calculó el balance hidrófilo lipófilo (BHL) requerido, las emulsiones formuladas fueron de tipo O/W. En las formulaciones se utilizaron mezclas de tensioactivos no iónicos (Span<sup>®</sup> y Tween<sup>®</sup>), también se utilizó lauril sulfato de sodio, un surfactante del tipo iónico. Pero debido a que las emulsiones son inestables desde el punto de vista termodinámico, se presentó separación de fases. Dentro de los procesos de desestabilización de las emulsiones, algunas de las formulaciones presentaron coalescencia, cremado y floculación de las gotas.

Tabla 1. Composición porcentual de concentrados emulsionables.

| Componentes           | Porcentajes en la formulación |      |      |
|-----------------------|-------------------------------|------|------|
|                       | CE 1                          | CE 2 | CE 3 |
| Tween 80 <sup>®</sup> | 20                            | -    | 20   |
| Span 80 <sup>®</sup>  | -                             | 20   | -    |
| Parafina              | 30                            | 30   | -    |
| Vaselina              | -                             | -    | 30   |
| Agua c.s.p.           | 100                           | 100  | 100  |

CE: concentrado emulsionable

Tabla 2. Ejemplos de preformulaciones de emulsiones O/W.

| Componentes  | Porcentaje en la Formulación |      |      |      |      |      |
|--------------|------------------------------|------|------|------|------|------|
|              | PF 1                         | PF 2 | PF 3 | PF 4 | PF 5 | PF 6 |
| A. Esteárico | 1                            | -    | 0.4  | 0.4  | -    | -    |
| Parafina     | 10                           | 20   | 20   | 20   | 20   | -    |
| A. Coco      | -                            | -    | -    | -    | -    | 20   |
| LSS          | 30                           | 30   | -    | -    | -    | -    |
| CMC          | -                            | -    | 0.1  | -    | -    | -    |
| Emulgentes   | -                            | -    | 30   | 60   | 30   | 30   |
| Agua c.s.p.  | 100                          | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |

LSS: Lauril sulfato de sodio; CMC: Carboximetilcelulosa; PF: Preformulación

Posteriormente se procedió a la formulación de microemulsiones. Para la preformulación de éstas, se utilizó como fase oleosa vaselina y parafina. Al mezclar la fase oleosa de estas formulaciones con los componentes, no se pudo formar una microemulsión y hubo separación de fases, por lo que se optó por utilizar una concentración de aceite esencial como fase oleosa. Al formularla, ésta se formó de manera espontánea, fue transparente y no presentó separación de fases. A esta formulación se le realizó un seguimiento de estabilidad preliminar por un tiempo de 15 días, en donde la microemulsión no presentó signos de inestabilidad al final del estudio.

#### Preparación microemulsión O/W con propiedad biopesticida

**Elaboración de diagrama de fases pseudoternario.** Las mezclas fueron agitadas y observadas, en caso de ser turbias las mezclas se descartaron; en caso de ser transparentes fueron consideradas microemulsiones y marcadas por medio de puntos en el diagrama de fases. Durante la adición de agua hubo una transición continua de sistemas ricos en aceite (microemulsiones W/O), a un sistema rico en agua (microemulsiones O/W). En la Figura 1 se observa el diagrama de fases pseudoternario. La formación de sistemas microemulsionados, que corresponde al área trazada con puntos, se observó a temperatura ambiente.

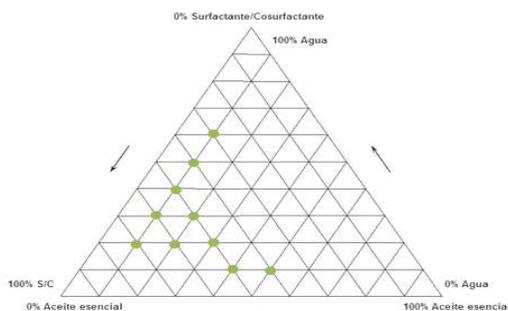


Figura 1. Diagrama de fases pseudoternario, en donde se presenta trazado con puntos las zonas donde se forman microemulsiones. S/C: surfactante/cosurfactante

**Selección de una formulación de microemulsión para estudios detallados.** Se seleccionó del diagrama de fases, una microemulsión tipo O/W la cual correspondió a un sistema compuesto por surfactantes: lauril sulfato de sodio y Tween 80<sup>®</sup>, cosurfactantes: propilenglicol y

etanol, como fase oleosa el aceite esencial de "rika-rika" a un 5%, y agua como fase acuosa.

### Caracterización de la microemulsión con propiedad biopesticida

**Medición de la conductividad eléctrica.** A partir del 10% de agua, el valor de la conductividad eléctrica aumentó considerablemente debido a la transición de una microemulsión con una fase continua oleosa a una microemulsión de una fase continua acuosa, llegando a un valor final de 1645  $\mu\text{s/cm}$  cuando se realizó el total aporte de agua para formar la microemulsión O/W.

**Medición de pH.** La muestra se encontraba a temperatura ambiente (25°C) y con exposición a la luz solar, al realizar la medición de pH en el tiempo, se observó una disminución de este parámetro desde la cuarta semana, en comparación a la muestra patrón sin exposición a la luz solar. En ésta los valores se mantuvieron a un pH cercano a 6,0 luego de un seguimiento de 16 semanas. La disminución de este parámetro fisicoquímico en la microemulsión expuesta a la luz, indica que existen algunos componentes de la muestra que tienden a degradarse o ser sensibles a la luz solar.

**Centrifugación.** Las muestras no presentaron signos de separación de fases, precipitación o coalescencia, demostrando ser una formulación estable por lo que no se necesitó reformular, esto permitió continuar con los estudios de estabilidad.

### Estudios de estabilidad

**Estrés térmico.** La muestra no presentó alteraciones durante los 6 ciclos, lo cual demostró que es un producto estable. En cuanto a sus características organolépticas como: color, olor y aspecto, ésta conservó sus características iniciales sin observarse algún cambio perceptible. El pH también fue medido, existiendo cierta variación de éste, pero dentro de un rango aceptable. Una vez cumplidos los 6 ciclos, la muestra fue centrifugada, no observándose separación de fases del producto.

**Estabilidad acelerada.** El aspecto, color y olor de las muestras de las microemulsiones sometidas a temperatura ambiente y baja, no demostró alteraciones perceptibles durante el periodo de estudio de 120 días. En cambio, la microemulsión almacenada a temperatura elevada, sufrió cambios en su aspecto, color y olor al cumplir el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, los valores de pH resultaron en variaciones aparentes a temperatura ambiente y temperatura elevada, pero en mayor magnitud en la temperatura de 40°C. En cuanto a las muestras sometidas a temperaturas bajas (5°C) y sin exposición a la luz solar, no se observaron variaciones en el pH, manteniéndose un valor promedio en el tiempo. (Tabla 3)

**Tabla 3. Características organolépticas de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas, una vez cumplido un tiempo de 120 días.**

| Microemulsión | Características organolépticas |           |                        |                |
|---------------|--------------------------------|-----------|------------------------|----------------|
|               | Muestra                        | Aspecto   | Color                  | Olor           |
| ME 5°C        | Normal                         | Homogéneo | Normal, sin alteración | Característico |
| ME 25°C       | Normal                         | Homogéneo | Normal, sin alteración | Característico |
| ME 40°C       | Anormal                        | Homogéneo | Alterado               | Alterado       |

ME: Microemulsión

### Análisis cualitativo en el tiempo de la presencia del aceite esencial por medio de cromatografía capa fina.

Se utilizó como patrón, el aceite esencial de "rika-rika" obtenido en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Arturo Prat, debido a su elevado contenido de tuyonas.<sup>13</sup> Al comparar el patrón con la muestra de microemulsión que contenía aceite esencial de "rika-rika" en tiempo cero, se observó un factor de retención (Rf) de 4 bandas características, tanto en la muestra con aceite esencial puro como en la muestra de microemulsión. Esto asegura la presencia de los mismos componentes. En los tiempos 30, 60, 90, 120 y a

diferentes condiciones de temperatura, se observaron los mismos tiempos de retención que en tiempo cero.

**Determinación de tuyonas en el tiempo, sometidas a diferentes temperaturas por medio de GC-FID.** Luego de someter previamente a extracción por fase sólida las muestras de blanco, microemulsiones en tiempo cero, microemulsiones a temperatura baja, ambiente y elevada por 120 días, se obtuvieron las proporciones de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas por medio de cromatografía gaseosa con detección FID. En la Tabla 4 se presentan los resultados de cada muestra analizada.

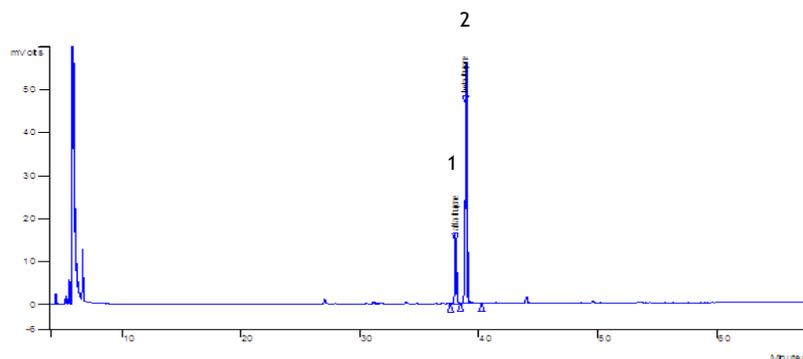
**Tabla 4. Porcentajes obtenidos por GC - FID de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas a diferentes tiempos y temperaturas.**

| Muestras*     | Temperatura | Tiempo   | % $\alpha$ - tuyona | % $\beta$ - tuyona |
|---------------|-------------|----------|---------------------|--------------------|
| Microemulsión | 25°C        | 0 días   | 22,42 $\pm$ 0,08    | 77,57 $\pm$ 0,08   |
| Microemulsión | 5°C         | 120 días | 64,6 $\pm$ 0,46     | 31,48 $\pm$ 0,24   |
| Microemulsión | 25°C        | 120 días | 65,6 $\pm$ 0,78     | 34,39 $\pm$ 0,78   |
| Microemulsión | 40°C        | 120 días | 73,96 $\pm$ 3,84    | 20,46 $\pm$ 0,93   |

\*Cada muestra fue realizada por triplicado

Se realizó la inyección directa al cromatógrafo del aceite esencial de “rika-rika” utilizado para la formulación de las microemulsiones, en donde aparecieron las señales correspondientes a la  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas en los tiempos de retención característicos para ellos, los cuales son 38,39

y 38,90 minutos respectivamente. En la microemulsión en tiempo cero, se observó que las señales de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas aparecieron en los tiempos de retención respectivos, con una proporción de 22,42%  $\pm$  0,08 para  $\alpha$ -tuyona y 77,57%  $\pm$  0,08 para  $\beta$ -tuyona. (Figura 2).



**Figura 2. Perfil cromatográfico de una microemulsión en tiempo cero sometida previamente a SPE. (1) Señal  $\alpha$  - tuyona (2) Señal  $\beta$ - tuyona.**

Luego de un tiempo de 120 días se obtuvieron los porcentajes de la proporción de la  $\alpha$  y  $\beta$  tuyona, detallados en la Tabla 4 para cada muestra sometida a temperatura baja, ambiente y elevada. En cuanto a estabilidad, se observa que luego de un tiempo de 120 días, todavía se pueden recuperar las  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas, por lo que se podría decir que el tiempo y diferentes rangos de temperatura no tienen influencia en la estabilidad de

las tuyonas. Al analizar la proporción tanto de  $\alpha$  y  $\beta$  tuyonas en cada muestra, luego de un tiempo de 120 días (Figura 3) se encontró que ésta cambiaba, lo que se comprobó por la inversión de las señales de las tres muestras expuestas a diferentes temperaturas, en comparación con la muestra en tiempo cero.

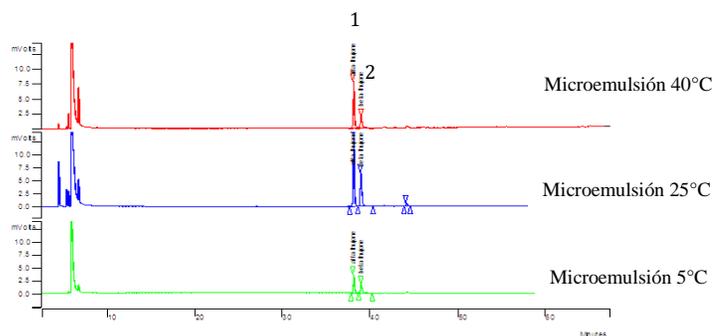


Figura 3. Perfil Cromatográfico de las microemulsiones sometidas a temperatura baja, ambiente y elevada por un tiempo de 120 días. (1) Señal  $\alpha$ -tuyona (2) Señal  $\beta$ -tuyona.

**Control microbiológico.** Al observar la muestra inoculada en las placas petri en cada intervalo de tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas, se descartó crecimiento bacteriano y fúngico.

## DISCUSIÓN

### Extracción del aceite esencial de *Acantholippia deserticola*.

Se utilizó *Acantholippia deserticola* porque se sabe que su aceite esencial es una compleja mezcla de una variedad de monoterpenos y sesquiterpenos. En un análisis del aceite esencial de esta planta por medio de cromatografía gaseosa acoplada a masa (GC/MS) se encontraron 22 compuestos, los cuales representan un 99,3% del total del aceite<sup>13</sup>. Los constituyentes que se encontraron en mayor cantidad fueron  $\alpha$ -tuyona (10,5%),  $\beta$ -tuyona (77,9%) y sabineno (4,9%).<sup>13</sup> De todos los componentes del aceite esencial, las tuyonas constituyen cerca del 88%, la  $\alpha$ -tuyona, un monoterpeno, es la más importante, a la cual se le ha atribuido la propiedad pesticida. Las tuyonas están presentes en diversos tipos de plantas en las que se ha comprobado su actividad insecticida frente a diferentes tipos de plagas. Dado que se ha comprobado la actividad insecticida en diferentes plantas que contienen tuyonas, es un hecho que *Acantholippia deserticola* es un potencial pesticida de origen natural, lo que es confirmado por la comprobación de la efectividad, en términos de mortalidad, del aceite esencial de *Acantholippia deserticola* sobre estados ninfales de *Aleurothrix floccosus* (mosquita blanca) con 98% de mortalidad al 10% v/v y adultos de *Tetranychus urticae* (arañita bimaclada) con 82% de mortalidad al 5% v/v y *Brevipalpus chilensis* (falsa arañita de la vid) con 70% de mortalidad al 5% v/v, insectos típicos de las plagas en la agricultura chilena.<sup>14</sup>

### Preformulación de vehículos.

Los concentrados emulsionables han sido muy populares por muchos años y representan el mayor volumen de todas las formulaciones de pesticidas.<sup>15</sup> En la mayoría de las formulaciones se utiliza un solvente orgánico como keroseno, tolueno, entre otros, los cuales resultan muy irritantes para la piel y tejidos mucosos, por lo que fueron reemplazados con parafina y vaselina debido a que son menos tóxicos para el ser humano y el medio ambiente; sin embargo, al realizar formulaciones con éstos, se presentó separación de fases y se necesitó una agitación constante para reconstituir el vehículo, esta agitación hace dificultosa la dispersión por parte del usuario y además no permite una buena mezcla del principio activo con los demás componentes de la formulación. Por ello, se procedió a la formulación de emulsiones de aceite en agua, las cuales están recibiendo una atención considerable debido a que no poseen disolventes orgánicos volátiles.<sup>16</sup> Sin embargo, las emulsiones formuladas presentaron separaciones de fases con fenómenos de inestabilidad como coalescencia, por el cual las gotas de una emulsión se unen para formar gotas mayores, proceso que finalmente da por resultado la separación de las fases oleosa y acuosa, produciendo la ruptura de la emulsión. En otras formulaciones se presentó cremado, si la densidad de las gotas en la fase dispersa es mayor que la de la fase continua, aquellas se hundirán en la emulsión, mientras que si su densidad es menor tenderán a concentrarse en la parte superior de ésta y se formaran zonas más o menos concentradas en la emulsión.<sup>17</sup> Pese a ello, el fenómeno es reversible ya que una simple agitación permitió reconstituir fácilmente las emulsiones formuladas.

En las formulaciones de microemulsiones preparadas con vaselina y parafina como fase oleosa se presentó separación de fases, esto se puede deber a que la parafina y la vaselina poseen una densidad menor que la del agua, y la mezcla de cosurfactantes/surfactantes no

permite disminuir la tensión interfacial lo suficiente para dispersar la fase oleosa en la acuosa. Al utilizar el aceite esencial de "rika- rika" como fase oleosa, en reemplazo de parafina y vaselina se formó una microemulsión de manera espontánea y de aspecto transparente. Esto se debe a la disminución de la tensión interfacial entre el aceite y el agua; al disminuir la tensión se obtiene la solubilización de todos los componentes y por ende una microemulsión de aspecto transparente. Es así, que dentro de las preformulaciones que se realizaron, y al evaluar la estabilidad de los diferentes vehículos, se eligió como formulación final para el aceite esencial de "rika-rika," una microemulsión tipo O/W.

#### **Preparación de una microemulsión con propiedad biopesticida**

**Elaboración de un diagrama de fases pseudoternario.** Los resultados obtenidos mostraron que la solubilización máxima de aceite esencial para formar microemulsiones tipo O/W se alcanzó cuando la fase oleosa correspondía a un 10%, la mezcla de surfactantes/cosurfactantes de un 30% y la de fase acuosa 60%, al igual que el máximo de agua que puede ser solubilizada es de un 60%. Además se confirma que es en este punto del diagrama, donde se puede agregar el máximo de fase acuosa y lo mínimo de mezcla de surfactantes/cosurfactantes. Un valor menor al 30% de mezcla de surfactantes/cosurfactantes no permite dispersar la fase oleosa en la fase acuosa, y da sistemas turbios o bifásicos.

**Selección de una formulación de microemulsión para estudios detallados.** La elección de los componentes en la microemulsión formulada estuvo basada en que éstos no fueran tóxicos y que cumplieran con los requerimientos de un buen vehículo para una óptima acción, en este caso como biopesticida. En la formulación se utilizó una combinación de surfactante iónico y no iónico. Esta combinación de dos tipos de surfactantes puede ser muy efectiva para incrementar el área de la región en que se forma la microemulsión y así permitir la solubilización del aceite esencial, en comparación con las microemulsiones preparadas con un solo surfactante. Los emulsificantes además contribuyen a disminuir la tensión superficial de las gotas de la dispersión, éstos aumentan el área de volumen de la dispersión mejorando el contacto entre el pesticida y la superficie de la planta. Generalmente se adicionan cosurfactantes a las microemulsiones, los cuales poseen diferentes funciones como: disminuir la viscosidad del sistema, reducir la tensión interfacial, aumentar la movilidad de la cola hidrocarbonada del surfactante y otorgar una mejor penetración del aceite en ésta.<sup>18</sup> Normalmente se añaden alcoholes de cadena corta, media y algunos glicoles (etanol y propilenglicol), proporcionando una reducción máxima del tamaño de gota en la fase interna, alterando la hidrofilia/lipofilia

del sistema y ampliando la región de la microemulsión.<sup>19,20</sup>

Se formuló una microemulsión O/W, la cual es más ventajosa debido a que el tamaño de gota mucho más fina conduce a una mayor penetrabilidad, un área de contacto más grande de la sustancia activa a la superficie tratada y una distribución mucho más equilibrada durante la aplicación.<sup>12</sup>

#### **Caracterización de la microemulsión con propiedad biopesticida.**

A pesar que existió una disminución del pH de la microemulsión a temperatura ambiente, cabe destacar que el vehículo formulado continuó conservando sus propiedades físicas, al no presentar separación de fases luego de la centrifugación.

En cuanto a la conductividad eléctrica, se observa que cuando no hay adición de agua la conductividad eléctrica es igual a cero, pero a medida que se fue adicionando agua la conductividad eléctrica empezó a aumentar, debido a que esta adición generó el movimiento de los cationes y aniones que estaban presentes en los componentes de la formulación, hasta alcanzar un valor máximo que confirma que la microemulsión es de tipo O/W.

#### **Estudios de estabilidad**

**Estrés térmico.** Este estudio permitió comprobar que la formulación no sufre alteraciones al ser expuesta a rangos de temperatura extremos, lo que confirma que la microemulsión es un vehículo estable.

**Estabilidad acelerada.** La muestra expuesta a temperatura elevada fue la que presentó más cambios en relación a su aspecto físico y químico, esto es debido a que la temperatura, además de acelerar la degradación de algunos de los componentes en las formulaciones, también tiene un efecto en la formación de las microemulsiones y en el balance hidrófilo/lipófilo de los surfactantes, el cual puede cambiar con la temperatura y desestabilizar la interfaz del surfactante, lo cual por consecuencia favorecerá la separación de fases del producto formulado.<sup>21,22</sup> Debido a que la elevación de la temperatura posee una directa influencia en la estabilidad de las formulaciones, así como en el compuesto activo, las alteraciones del pH en las formulaciones son esperadas. Éstas se pueden deber a diferentes factores como la proliferación bacteriana, la inestabilidad o incompatibilidad de algunos componentes o a la degradación en el tiempo del componente activo, en este último caso es atribuido a un componente de la formulación.

**Análisis cualitativo en el tiempo de la presencia del aceite esencial por medio de cromatografía capa fina.** Se demostró que el aceite esencial de la muestra al ser

sometida a diferentes temperaturas y tiempos, presentó los mismos factores de retención al compararlas con la muestra patrón y la placa cromatográfica en tiempo cero. A temperatura elevada, desde los 90 días se registraron colas en las microemulsiones en las placas cromatográficas, atribuidas a posibles productos de degradación. Este resultado es de gran importancia, ya que demuestra la necesidad de proteger el producto de elevadas temperaturas de almacenamiento. Las microemulsiones son capaces de encapsular el aceite esencial, lo que da la posibilidad de retardar la volatilización, oxidación y degradación de los aceites esenciales durante el proceso de almacenamiento.<sup>23</sup>

**Determinación de tuyonas en el tiempo, sometidas a diferentes temperaturas por medio de GC-FID.** Al observar el perfil cromatográfico correspondiente a la muestra en tiempo cero y la tabla con los valores obtenidos, se observa que se obtuvieron las proporciones adecuadas para  $\alpha$  y  $\beta$ -tuyonas y los tiempos de retención característicos de estos terpenos, por lo que la extracción en fase sólida podría corresponder a una técnica adecuada para la extracción de este tipo de terpenos, ya que se obtiene una respuesta de las tuyonas y se pueden observar sus señales en el cromatograma. Luego de un tiempo de 120 días, en las muestras sometidas a temperatura ambiente y elevada, se observa que éstas permanecen estables a pesar de la disminución de pH que presentaron en el tiempo.<sup>24</sup> En cuanto a la muestra sometida a temperatura elevada (40°C), ésta no sufrió un cambio en su proporción. Un cambio en la temperatura, en especial a temperaturas extremadamente elevadas (sobre 50°C), no tiene influencia en las tuyonas.<sup>25</sup>

Al analizar la inversión de valores y de las señales en los perfiles cromatográficos tanto para tiempo cero como luego de 120 días, se podría decir que existe una tendencia de epimerización de las tuyonas en el tiempo. Ésta interconversión se corrobora con un estudio<sup>13</sup> realizado en el año 2006, en donde se encontró que luego de someter la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ -tuyonas a una columna con sílica gel, la proporción de éstas cambiaba y se invertía, lo que se atribuye a una posible interconversión estereoquímica a través del equilibrio ceto- enólico.

**Control microbiológico.** Este análisis es necesario ya que la contaminación microbiana es una de las razones por las que un producto formulado puede presentar inestabilidad. Muchos hongos y bacterias pueden contaminar la fase acuosa especialmente en formulaciones cuyo componente mayoritario es el agua, y además pueden proliferar a temperatura ambiente en intervalos amplios de pH. En la formulación se aprovecharon las propiedades antimicrobianas que tienen los componentes como etanol y propilenglicol, ya que éstos poseen actividad como preservantes. Otro punto importante es que el aceite esencial de "rika-rika",

presenta actividad bactericida frente a cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae*.<sup>8</sup> Aquello es una ventaja para evitar agregar conservantes a la formulación que puedan desactivar e interactuar con algún componente. Dadas las propiedades tanto del compuesto activo como de sus componentes se podría decir que la microemulsión corresponde a una formulación autoconservada.

Antes del descubrimiento de los pesticidas sintéticos como el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), los biopesticidas derivados de plantas eran de utilización masiva. A pesar de su potencia contra las plagas los productos de síntesis química tienen desventajas debido a sus altos costos, su residualidad tóxica, la contaminación de alimentos y la generación de resistencia a las plagas. Estos inconvenientes han llevado a que se retome el interés por la utilización de pesticidas derivados de plantas, en donde una microemulsión en base a aceite esencial de *Acantholippia deserticola* sería una buena alternativa, al demostrar ser un vehículo seguro y estable a condiciones de almacenamiento normales y con protección a la luz solar.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad Arturo Prat.

#### REFERENCIAS

1. Cavieres M. Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos. Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. Rev Med Chile. 2004; 132: 873-879.
2. Abhilash P, Singh N. Pesticide use and application: An Indian scenario. J Hazard Mater. 2009; 165: 1-12.
3. Vallebuena C. Vigilancia de Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas en Chile, Actualización. El Vigía. 2007; 26(9):152-157.
4. Ranasingh N. Biopesticides: an Economic Approach for Pest Management. Orissa Rev 2007; 77-79.
5. Lizarazo K, Mendoza C, Carrero R. Efecto de extractos vegetales de *Polygonum hydropiperoides*, *Solanum nigrum* y *Calliandra pittieri* sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Agron. colomb. 2008; 26(3): 427-434.
6. Batish D, Harminder P, Ravinder K, Shalinder K. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol Manag. 2008; 256: 2166-2174.
7. Isman M. Botanical insecticides, detergents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu Rev Entomol. 2006; 51: 45-66.
8. Benites J, López J, Rojo L, Díaz P, Rojas M, Leyton D, Gajardo S. Capacidad atrapadora de radicales libres y actividad antibacteriana de extractos de *Acantholippia deserticola*. En: Congreso de Ciencias Farmacéuticas de

- la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia. Cajamarca; 2009.
9. Höld K, Sirisoma N, Ikeda T, Narahashi T, Casida J.  $\alpha$ -thujone (the active component of absinthe):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97(8): 3826-3831.
  10. Cordiner J. Challenges for the PSE community in formulations. *Comput. Chem. Eng.* 2004; 29: 83-92.
  11. Zhao F, Xia H., He J. Formulation design of cyhalothrin pesticide microemulsión. *Curr sci.* 2009; 97(10): 1458-1461.
  12. Bidyut K, Satya P. Uses and applications of microemulsions. *Curr sci.* 2001; 80(8): 990-1001.
  13. Rojo L, Benites J, Rodrigues A, Venâncio F, Ramalho L, Teixeira A, Feio S, Costa M. Composition and Antimicrobial Screening of the Essential Oil of *Acantholippia deserticola* (Phil.ex F. Phil.) Moldenke. *J. Essent. Oil Res.* 2006; 8: 1-3.
  14. Flores N, Tapia D. Obtención del aceite esencial de *Acantholippia deserticola* (Phil.ex F. Phil.) Moldenke y evaluación del efecto insecticida/acaricida sobre cinco plagas primarias para la agricultura de Chile. [Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo]. Iquique: Departamento de Agricultura del Desierto, Universidad Arturo Prat; 2007.
  15. Knowles A. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist.* 2008; 28: 35-44.
  16. Mulqueen P. Recent advances in agrochemical formulation. *Adv Colloid Interface Sci.* 2003; 106: 83-107.
  17. Vila J. Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2001.
  18. Mitra R, Bidyut P. Physicochemical investigations of microemulsification of eucalyptus oil and water using mixed surfactants (AOT +Brij-35) and butanol. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 283: 565-577.
  19. Formariz T, Urban M, Junior A, Daflon M, Gomes A. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005; 41(3): 301-313.
  20. Resende K, Corrêa M, Oliveira A, Scarpa M. Effect of cosurfactant on the supramolecular structure and physicochemical properties of non-ionic biocompatible microemulsions. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008; 4(1): 37-42.
  21. Lawrence M Rees G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.* 2000; 45: 89-121.
  22. Mads K. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 2002; 54(1): 577-598.
  23. Zhong F, Yu M, Luo C, Shoemaker C, Li Y, Xia S, Ma J. Formation and characterisation of mint oil/S and CS/water microemulsions. *Food Chem.* 2009; 115: 539-544.
  24. Lanckenmeier D, Maister D, Breaux T, Kuballa T. Long-Term Stability of Thujone, Fenchone, and Pinocampnone in Vintage Preban Absinthe. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 2782-2785.
  25. Fröhlich O, Shibamoto T. Stability of Pulegone and Thujone in Ethanolic Solution. *J. Agric. Food Chem.* 1990; 38: 2057-206.