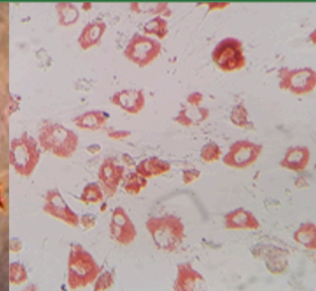
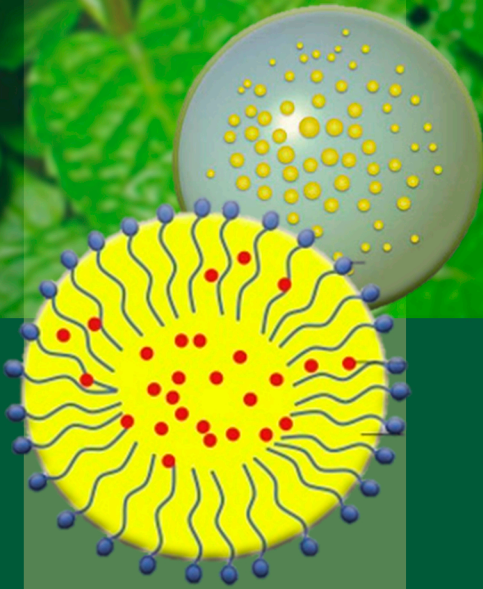


Tesis Doctoral en Biología

2020

**Nanobioinsecticidas:**  
nuevas estrategias  
de manejo integrado de  
*Plodia interpunctella*  
(Lepidoptera, Pyralidae).  
Desarrollo, aplicaciones y  
estudios ecotoxicológicos



Lic. Emiliano Nicolás Jesser  
Tesista

Universidad Nacional del Sur  
Depto. Biología, Bioquímica y Farmacia  
Bahía Blanca - Argentina 2020





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR.

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**Nanobioinsecticidas: Nuevas estrategias  
para el manejo biorracional de *Plodia  
interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae).  
Desarrollo, aplicaciones y estudios  
ecotoxicológicos**

**Lic. Emiliano Nicolás Jesser**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2020

# Prefacio

---

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados II, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, durante el periodo comprendido entre Abril de 2015 y Diciembre de 2020, actuando como directores de tesis la Dr. Jorge Omar Werdín González y la Dra. Ana Paula Murray. El Dr. Werdin González es Profesor Adjunto con dedicación exclusiva de la asignatura “Zoología de Invertebrados II”, del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur e Investigador Adjunto de CONICET. La Dra. Murray es Profesora Asociada con dedicación exclusiva de la asignatura “Química Orgánica II” del Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur e Investigadora Independiente de Conicet



UNIVERSAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaria General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 18/03/2021, mereciendo la calificación de 10 (Sobresaliente)

*En memoria de mis tíos  
Oscar y Reinaldo, mis  
abuelos, Juan y Miguel,  
mi abuela Elisa, mi  
primo Andrés y Roberto.*



# Agradecimientos

---

*“Remember how it all begins  
A little smile from your friends  
I gave you my spark  
Hope when things get dark  
The world is different now  
We feel more of us  
This place is such a mess  
But we always pass the test”*  
Tom DeLong

***“I felt this thing, I can't replace, where everyone was working for this goal”:***

*Al Dr. Jorge Werdín González, por aconsejarme y guiarme en estos 5 años de desarrollo de esta tesis, siempre con paciencia y una sonrisa. Por hacer de las mañanas, tardes y feriados de trabajo un buen momento del día. Por prestar siempre un oído y por estar atento a todo lo que yo necesité*

*A la Dra. Paula Murray y su equipo por haber realizado la determinación de los componentes de los aceites usados y aportar todo su apoyo y conocimientos para el desarrollo de esta tesis.*

*A mis compañeros del laboratorio, muchos de ellos hoy ya son amigos, los que están y los que ya han buscado nuevos rumbos, quienes me hicieron sentir cómodo desde el primer día que llegué. Por contarme sus experiencias, por darme una mano siempre que la necesité y por compartir almuerzos, cenas o simplemente una charla. Especialmente, agradezco a la Dra. Adriana Ferrero, por abrirme las puertas del laboratorio y hacerme sentir parte de su grupo de trabajo y por permitirme conocer a estas increíbles personas*

*A las Dras Claudia Domini y Anabella Lorenzetti, por permitirme trabajar en su laboratorio y por ayudarme en el desarrollo de las nanoemulsiones.*

*A la Dra Valeria Gili por su colaboración desinteresada para el desarrollo de los estudios sobre los efectos de las nanoformulaciones en la viabilidad celular.*

*A Silvina Santos, por desarrollar el arte de tapa de esta tesis*

*A la Universidad Nacional del Sur, por formarme como biólogo y darme la oportunidad de manera gratuita de continuar mis estudios y mi desarrollo personal.*

*A CONICET y al INBIOSUR, por brindarme la beca y el lugar de trabajo para llevar adelante esta investigación.*

***“La música nunca paro de sonar”:*** *Esta tesis no podría estar completa sin la MÚSICA, soy agradecido a ella porque me acompañó también a lo largo de mi vida. Desde aquel primer tema de A77aque que escuche, a mis inicios en el punk hasta esta actualidad, que me ha llevado a descubrir nuevos sonidos y estilos que me llenan como ser humano. Disfruto mucho de los recitales y más si son de mis amigos. La música me ayuda a transitar mis días y por eso no puedo dejar de nombrarla.*

**“Como la vida cambio, Con cada viaje cambio, Me convierto en algo distinto cada vez”:** Si de algo sé que soy un privilegiado es de los VIAJES, la gente y los lugares que conocí. Nunca en mi vida imagine los caminos que iba a transitar en estos años de tesis. La biología me llevo a salir de mi zona de confort para descubrir que existe otro mundo, otra cultura, otra REALIDAD.

**“A partir de este domingo volveré, a alentarte como por primera vez”.** A lo largo de estos años de tesis tuve el privilegio de vivir uno de los ciclos más exitosos del equipo del cual soy hincha desde que nació. Simplemente agradecer a River Plate por tantas alegrías que me ha dado en este tiempo y también aquellas amargas que nos hacen recordar que esto es un juego y una pasión. Apartado especial para mi CIUDAD, mi Villa Mitre querido, mi club de barrio que como sabemos más que barrio es una ciudad. Villa Mitre es familia, es amistad, es nostalgia. Es crecer a 6 cuerdas de la cancha y salir unos minutos antes para ir a ver el partido con tu familia y cruzarte con amigos. Es un domingo de sobremesa con la radio prendida escuchando como un árbitro a 600 km de distancia te “bombea”. Es un clásico de ciudad y una discusión nocturna entre birras con amigos acerca de los equipos locales. Tampoco he de olvidar a la Selección Nacional, que también me llena de alegrías y tristezas, pero cada vez que MESSI sale a la cancha, digo: qué lindo volver a verte Selección. En fin gracias Fútbol, ese deporte que para quienes lo vivimos como una pasión, y a pesar de todas sus imperfecciones, nos hace sentir vivos.

**“Sigue teniendo fe y esperanza en que el mañana va a cambiar”:** Les chiques del Profesorado de la UCALP y les CAAI, grupos de los cuales me llevé también nuevos amigos. Con estos grupos aprendí mucho, ya que me rodé de gente que estaba fuera del circuito de la biología y que desde sus profesiones y vivencias de vida me ayudaron a abrir más mi cabeza, que es algo que últimamente me he planteado para mi vida.

**“Amigo mío, a pesar de que el silencio es el idioma que aprendimos mejor, hoy necesito hablarte así, así”.** Tengo el privilegio de poder presumir que tengo amigos desde hace 23 años y que también tengo otros de la Universidad (mis PSEUDOBIOLOGUES, mis PAQUETERES, mis NANU’s y aquellos que no pertenecen a un grupo determinado, pero siempre están ahí en cada juntada y asado compartido). Les agradezco a todos ellos por haber estado en cada instante de la vida en los buenos y en los malos momentos que pude haber pasado (porque incluso los malos ya son partes de nuestras risas, “-hay que traer a Emi de Europa... otra vez”). Soy un agradecido porque a pesar de haber crecido y cambiado hemos decidido seguir compartiendo momentos, no por obligación, sino por el simple hecho de saber que estar rodeado de esta gente nos hace bien y nos hace seguir creciendo por un camino que yo intento llamar Deconstrucción.

**“papá puede arreglarlo, él siempre lo arregla todo, mamá puede traer la luna, que bueno es que me cuiden los grandes”:** abuela, tíos y tias, primos siempre pendientes de mi carrera, dispuestos a escuchar alguna enseñanza que les pudiera transmitir y siempre compartiendo una comida para hablar de la vida y recordar gratos momentos. Mi papa, mi mama y mi hermano por acompañarme y apoyarme. Por soportar momentos en los que podía tener un mal carácter. Por dejar cualquier interés personal a un lado, para que yo pueda realizar mi doctorado y desarrollar mi vida. Les quiero mucho.

A todos les quiero mucho...

# Resumen

---

*Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae), también conocida como la polilla de la fruta seca, es un insecto cosmopolita que ocasiona importantes daños en frutas secas, granos, harinas y productos manufacturados derivados. El control de este insecto plaga se realiza tradicionalmente a través de insecticidas de síntesis orgánica. Sin embargo, el uso intensivo de estos productos ha generado varios problemas, entre los que se pueden citar: el desarrollo de resistencia, la contaminación ambiental, daños en la salud humana y la eliminación de potenciales controladores biológicos. Estas circunstancias han llevado a replantear las estrategias de manejo de este insecto y a buscar nuevas metodologías de control, que sean menos perjudiciales para el ambiente y la salud humana. En este contexto, este trabajo propone desarrollar nuevas nanoformulaciones basadas en aceites esenciales (AE) con actividad insecticida en *P. interpunctella* y evaluar los efectos ecotoxicológicos de estos productos en organismos no blanco tales como *Tenebrio molitor* y *Artemia salina* y en células de mamíferos del tipo osteoblástico.

En consecuencia, se evaluó la actividad insecticida de los AE de *Citrus bergamia* Risso (Sapindales, Rutaceae) (Bergamota), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiales, Lamiaceae) (Lavanda), *Mentha piperita* L. (Lamiales, Lamiaceae) (Menta), *Geranium maculatum* L. (Geraniales, Geraniaceae) (Geranio), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (Poales, Poaceae) (Palmarosa) y *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtales, Myrtaceae) (Eucalipto) en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*. Se utilizaron dos metodologías: exposición a superficies tratadas y aplicación tópica. Los AE de geranio, menta y palmarosa tuvieron los valores de CL<sub>50</sub> más bajos en adultos de *P. interpunctella* para el ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas. Sin embargo, para el caso de las larvas del IV estadio tanto en el ensayo por exposición a superficies tratadas como en el ensayo por vía tópica, ningún AE mostró una mortalidad mayor al 20%, incluso a las máximas dosis. Finalmente y en el caso particular de los

adultos de *P. interpunctella* que se trataron por vía tópica se observó que la variabilidad de los resultados obtenidos fue muy grande. Por esta razón se descartó para el resto de la tesis este tipo de ensayos en adultos. En base a los datos obtenidos en el ensayo por exposición a superficies tratadas en adultos de *P. interpunctella* se procedió a seleccionar a los AE de geranio, menta y palmarosa para ser nanoformulados.

En lo que respecta a la obtención de nanopartículas (NP) poliméricas, se eligió al PEG-6000 como sustrato matricial y mediante el método de fusión-dispersión se obtuvieron las NP de PEG-6000 cargadas con AE (NPAE). Las NPAE de palmarosa tuvieron un tamaño de 191 nm, mientras que las de geranio de 259 nm. Ambas NP mostraron una eficiencia de cargado (EC) cercana al 90% y fueron monodispersas. Por su parte, las NP de menta tuvieron un tamaño de 380 nm, fueron polidispersas y su EC fue del 72%. Una vez obtenidas las NPAE se probaron mediante ensayos de exposición a superficies tratadas y por exposición a vapores en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*. Además se estudió, en ambos ensayos, el efecto de la temperatura de post-aplicación a 17, 24 y 31 °C. Uno de los resultados más destacables es que a todas las temperaturas, las NPAE potenciaron el efecto insecticida por exposición a superficies tratadas en adultos *P. interpunctella*, en relación con los AE libres, entre 1,54 y 3,54 veces. Por otra parte, en el caso del ensayo por exposición a vapores, solo las NPAE de palmarosa y menta incrementaron el efecto insecticida de los AE, entre 1,26 y 4,45 veces. Sin embargo, es para destacar que el AE de palmarosa fue el que mostró el mayor efecto insecticida y su temperatura óptima de post aplicación fue de 17 °C. A su vez, sus NPAE también presentaron a esta temperatura la mayor actividad insecticida convirtiéndose así en las más efectivas de este estudio. Finalmente, se demostró que la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la actividad insecticida de los AE y de sus NP cuando estos productos se usaron en el ensayo por exposición a superficies tratadas sobre adultos de *P. interpunctella*. No se registró efecto alguno de la temperatura post-aplicación cuando las NPAE se emplearon en los ensayos por exposición a vapores.

Los AE de geranio, menta y palmarosa también se formularon como nanoemulsiones (NEs) utilizando Tween 80 como surfactante y la técnica de ultrasonido. Para la elaboración de las NEs las condiciones optimizadas de la sonda ultrasonido fueron: 65 W de potencia, ciclos de 30 “on”/ 20 “off”, tiempo total de sonicación de 2 min y distancia óptima de la sonda ultrasónica de 3,7 cm. En lo que respecta a estas formulaciones, las NEs de geranio elaboradas con una relación AE:Tween 80 de 1:2 tuvieron tamaños de gota de  $\approx 14$  nm, fueron monodispersas, de aspecto transparente y comenzaron a perder su estabilidad a los 120 días. En cuanto a las NEs de menta formuladas con una relación AE:Tween 80 de 1:2 mostraron tamaños de gota  $\approx 33$  nm, fueron polidispersas y de aspecto macroscópico transparente. En cuanto a la estabilidad de estas NEs, se observó un proceso de separación de fases a los 60 días de haber sido formuladas. Finalmente los nanosistemas elaborados con el AE de palmarosa no fueron estables ni translúcidos con la relación AE: Tween 80 de 1:2. Es por esto que para no modificar las condiciones de ultrasonido, se procedió a enriquecer la mezcla con acetato de linalilo (AL). Cuando este componente enriqueció al AE de palmarosa en un 50%, se obtuvieron NEs con tamaños de gota de  $\approx 14$  nm, monodispersas, de aspecto macroscópico transparente y estables durante 120 días. En relación a la actividad insecticida de estos productos, los resultados mostraron que las NEs combinadas con  $\beta$ -cipermetrina potenciaron el efecto tóxico, con respecto al piretroide solo y a este combinado con los AE en larvas del IV de *P. interpuctella*.

Por otra parte se estudiaron aspectos ecotoxicológicos de las NPAE y NEs a través de ensayos con distintos organismos no blanco y en células de mamíferos. Con respecto a las NPAE y a las NEs se observó que estas nanoformulaciones no generaron efectos tóxicos a las dosis ensayadas en larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). En cuanto a los estudios de las nanoformulaciones en *Artemia salina* L. (Anostraca, Artemiidae) los resultados fueron heterogéneos. Por un lado, las NPAE del AE de geranio resultaron ser inocuas, mientras que las NEs de este AE tuvieron una alta toxicidad en este crustáceo, incluso a bajas dosis. El caso contrario fue el de las NPAE de menta y palmarosa que resultaron ser tóxicas a bajas dosis



(< 25ppm). Sin embargo, las NEs de menta y palmarosa + AL mostraron valores de  $CL_{50}$  muchos más altos que los encontrados en el ensayo con *Cx. p. pipiens*, demostrando una toxicidad diferencial. Con respecto a los estudios relacionados con las células de mamíferos de tipo osteoblástico, luego de 24 h, las NEs de menta y palmarosa + AL redujeron la viabilidad celular levemente, siendo este efecto aún más pronunciado con las NEs de geranio. Luego de 72 h, las células expuestas a Tween 80 y a las NEs de menta y palmarosa + AL, exhibieron un aumento significativo en la viabilidad celular en comparación con las células del control. Por otra parte, las NEs de geranio redujeron significativamente la viabilidad celular. Finalmente a las 168 h, solo las NEs de geranio redujeron significativamente la viabilidad celular. A estos tiempos de exposición no se hallaron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos y los controles.

En el marco del desarrollo de nuevas estrategias de manejo de insectos plaga, las nanoformulaciones basadas en AE han incrementado su importancia como nuevos insecticidas bioracionales. Según los resultados obtenidos las NPAE y NEs, elaboradas en el marco de esta tesis, son prácticamente atóxicas para organismos no blanco, como *A. salina* y *T. molitor* y podrían considerarse bioinsecticidas potenciales para el manejo integrado de *P. interpunctella*.

# Abstract

---

The Indian meal moth, *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera, Pyralidae) is a cosmopolitan major economic insect pest of stored products. The larvae prefers to feed on broken grains and especially on milled products such as flour, breakfast foods, stored cereal products, dried vegetables and fruits, processed foods and meals. Generally, the control of this insect pest in storage systems depends on synthetic insecticides. However, their indiscriminate application contributed to environmental contamination and pest resistance and affected non-target organisms. Essential oils (EO) appear as new ecofriendly insecticides, which show good biological activity against insect pest. Consequently, they become a complementary method for integrated pest management strategies (IPM). The overall objective was to develop new bioinsecticides nanoformulations that can be used for a safer management of *P. interpunctella* as well as an improvement in the knowledge of the econanotoxicological field.

This study evaluated the chemical constituents and bioactivity of six essential oils namely *Citrus bergamia* Risso (Sapindales, Rutaceae) (Bergamot), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiales, Lamiaceae) (Lavender), *Mentha piperita* L. (Lamiales, Lamiaceae) (Peppermint), *Geranium maculatum* L. (Geraniales, Geraniaceae) (Geranium), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (Poales, Poaceae) (Palmarosa) and *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtales, Myrtaceae) (Eucalyptus) against larvae IV and adults of *P. interpunctella*. The EO were topically applied or were evaluated in contact toxicity bioassays. The contact toxicity order was palmarosa > geranium > peppermint > lavender > bergamot > eucalyptus in adults of *P. interpunctella*. However, when EO were topically applied or were evaluated in contact toxicity bioassays against larvae IV, the EO showed less than 20% of mortality even at the highest doses. In topically assays with *P. interpunctella* adults, the results were variable. In this sense, topically assays with *P. interpunctella* adults were not performed in the thesis. Based on these results,

geranium, peppermint and palmarosa oils were further evaluated for essential oils polymeric nanoparticles (EOPN) and nanoemulsion (NEs) elaboration.

EOPN were elaborated by the melt-dispersion method using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) as matrix system in PEG 6000: EO ratio 10: 1. The first step of the study was the characterization of the EOPN. The EOPN sizes from palmarosa were 191 nm, followed by geranium (259 nm) and peppermint EOPN (381 nm). Palmarosa and geranium EOPN were monodisperse and the loading efficiency (LE) showed values close to 90%. On the other hand, peppermint EOPN were polydisperse and the LE was > 70%. The aim of second chapter was to evaluate the insecticidal activity of EO and EOPN on *P. interpunctella* adults at different environmental temperatures (17, 24 and 31 °C). In the contact toxicity bioassay, all EOPN significantly increase the insecticidal activity of the bioactive compounds from 1.54 to 3.54 times. In the case of fumigant assays, just palmarosa and peppermint potentiated the biological activity from 1.26 to 4.45 times. It has been found that palmarosa EO and EOPN presented the highest insecticidal activity and the optimal post application temperature was 17 °C. It was also observed that the temperature had a significant effect on the insecticidal activity of the EO and EOPN when applied by contact. However, this effect could not observe in fumigant bioassay.

Geranium, peppermint and palmarosa EO were also formulated as nanoemulsions (NEs) using Tween 80 (surfactant) and ultrasound. For NEs elaboration, the ultrasound parameters were optimized: ultrasound power = 65 W, sonication time = 2 min, cycles = 30 on/20 off and ultrasonic probe distance = 3.7 cm. Transparent NEs of geranium EO were achieved using 1:2 oil-surfactant ratios. These nanosystems measured 13.58 nm, were monodisperse and stable for 60 days. Moreover, after 120 days of storage, NEs began to lose stability. In case of peppermint EO, transparent NEs were formulated using a 1:2 peppermint EO/Tween 80 ratio. These NEs showed sizes of  $33.97 \pm 33.16$  nm and the PDI value of  $0.424 \pm 0.008$ , and were stable after 30 days. The NEs lost stability after 60 days. It is important to point out that the

palmarosa EO alone at the highest Tween 80 ratio (1:2) was unable to produce stable and transparent NEs. The addition of linalyl acetate (LA) to the coarse emulsion made the NEs production possible with the same ultrasound parameters. When the ratio of LA was 50%, the palmarosa + LA NEs were transparent. Moreover, the NEs measured 14.73 nm and were monodisperse. According to bioassays, the NEs combine with  $\beta$ -cypermethrin enhance the toxicity of EO against larvae IV of *P. interpunctella*.

Finally, it was also evaluated the potential influence of EOPN and NEs on the non target aquatic model *Artemia salina*, L. (Anostraca: Artemiidae), and on the terrestrial model *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). The results from the ecotoxicology assay in *T. molitor* indicated that EOPN and NEs did not have toxic effect on this terrestrial model. However, the ecotoxicology assay in *A. salina* showed different results. On the one hand, geranium EOPN were not harmful for *A. salina*; on the other hand, NEs were toxic even at the lowest doses. Nevertheless, peppermint and palmarosa EOPN were toxic even at the lowest doses, though their NEs showed  $CL_{50}$  values higher than the values found in *Cx. p. pipiens* assay. In the context of the biosafety evaluation of these novel nanofomulations, the viability of cell culture exposed to NEs was also evaluated. After 24 h, the treated cells with peppermint and palmarosa + AL NEs showed a significant slowdown on the cell viability rate. The geranium NEs had a stronger effect in this variable. Nevertheless, after 72 h, cells exposed to Tween 80 and NEs exhibited a significant increase in the cell viability rate compared with control. However, geranium NEs showed a higher reduction in the cell viability rate. After 168 h, the NEs did not have a significant effect on the cell viability when compared with control and control + Tween 80. Though, the geranium NEs showed similar results as 72 h assay.

The potential uses of nanoformulations based on EOs as novel bioinsecticides responds to the new socioproductive conditions and fulfill the demands of new ecofriendly pest management tools. In this sense, this work shows that the EOPN and NEs are relatively safe for

nontarget organisms, such as *A. salina* and *T. molitor* and could be act as a new bioinsecticides for the management of *P. interpunctella*.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridos por los jurados**



Dr. Jorge Omar, Werdin González

.....

Firma Director



Dra. Ana Paula Murray

.....

Firma Codirectora



# Índice General

<b>1. El punto de partida: Los aceites esenciales</b>	<b>1</b>
1.A. Introducción	1
1.A.1. Los artrópodos	1
1.A.2. Insecto en estudio: <i>Plodia interpunctella</i>	6
1.A.2.b. Biología de <i>Plodia interpunctella</i>	6
1.A.3. Métodos de control de insectos plaga	9
1.A.4. Métodos no químicos para el control de insectos	15
1.A.4.a. Temperatura	15
1.A.4.b. Saneamiento y estructuras de almacenamiento	16
1.A.4.c. Polvos inertes	17
1.A.4.d. Irradiación	17
1.A.4.e. Métodos mecánicos	18
1.A.4.f. Métodos Biológicos	18
1.A.5. Aceites esenciales: Una nueva alternativa como bioinsecticidas	19
1.A.5. Aplicación	22
1.A.5.a. Actividad antimicrobiana	22
1.A.5.b. Actividad antioxidante	23
1.A.5.c. Actividad antiinflamatoria	23
1.A.5.d. Actividad anticancerígena.	24
1.A.5.e. Actividad insecticida.	25
1.A.6. Hipótesis	27
1.A.7.a. Objetivo general	27
1.A.7.b. Objetivos específicos	27
1.B. Materiales y Métodos.	28
1.B.1. Materiales	28
1.B.2. Caracterización de los aceites esenciales	28
1.B.3. Insectos	28
1.B.4. Bioensayos	29
1.B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas	29
1.B.4.b. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica de los AE	30
1.C. Resultados	31
1.C.1. Caracterización de los aceites esenciales	31
1.C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas	32
1.C.3. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica de los AE	33
1.D. Discusión	34
1.E. Conclusiones	38
<b>2. El Camino: Nanopartículas poliméricas</b>	<b>39</b>
2.A. Introducción.	39
2.A.1. La llegada de la nanotecnología.	40
2.A.2. Nanopartículas: definición y variedad	44
2.A.3. Aplicaciones de las nanopartículas.	49
2.A.4. Aplicación de temperatura como estrategia de manejo de insectos plaga.	52
2.A.5. Hipótesis	55
2.A.6.a. Objetivo general	55
2.A.6.b. Objetivo específicos	55
2.B. Materiales y Método	56
2.B.1. Preparación de las nanopartículas poliméricas de PEG-6000 cargadas con AE (NPAAE).	56
2.B.2. Caracterización de las NPAAE	57
2.B.2.a. Medidas de tamaño e índice de polidispersión (IPD) de las NPAAE.	57
2.B.2.b. Análisis mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).	57
2.B.2.c. Eficiencia de cargado de las NPAAE.	57
2.B.2.d. Composición química de los AE pre y post formulación	58
2.B.3. Bioensayos	58

2.B.3.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas.	58
2.B.3.b. Ensayo de toxicidad por exposición a vapores.	59
2.B.3.c. Efecto de la Temperatura.	60
2.B.3.d. Ensayo de toxicidad por tópico	60
2.B.4. Análisis estadístico.	61
2.C. Resultados.	62
2.C.1. Caracterización de las nanopartículas.	62
2.C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas.	66
2.C.3. Toxicidad por exposición a vapores.	68
2.C.4. Efecto de la temperatura.	70
2.C.5. Ensayo de toxicidad por tópico.	70
2.D. Discusión	72
2.E. Conclusiones	81
<b>3. Otra parte del trayecto: Nanoformulaciones Acuosas</b>	<b>83</b>
3.A. Introducción	83
3.A.1. Contexto del desarrollo de micro/nanoemulsiones	83
3.A.2. Definición de MEs y NEs	84
3.A.3. Principales diferencias entre MEs y NEs	89
3.A.4. Aplicación de las NEs	91
3.A.5. Hipótesis	94
3.A.6.a. Objetivo general	95
3.A.6.b. Objetivos específicos	95
3.B. Materiales y Método.	96
3.B.1. Preparación de MEs y de NEs	96
3.B.2. Rol del acetato de linalilo (AL) en la formación de NEs del AE de palmarosa	97
3.B.3. Caracterización de las MEs y NEs	98
3.B.3.a. Medida de tamaño e índice de polidispersión	98
3.B.3.b. Estabilidad de las formulaciones	98
3.B.4. Bioensayo.	98
3.B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas	98
3.B.4.b. Ensayo de toxicidad por tópico	98
3.B.5. Bioensayo.	98
3.B.5.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas	98
3.B.5.b. Ensayo de toxicidad por tópico	98
3.B.6. Análisis estadístico.	99
3.C. Resultados	100
3.C.1. Resultados preliminares: Tipo de surfactante y MEs	100
3.C.2. Desarrollo de NEs	101
3.C.2.a. Efectos del ultrasonido.	101
3.C.2.b. Efecto del co-surfactante y del surfactante en la formación de NEs	102
3.C.2.c. Rol del acetato de linalilo (AL) en la estabilización de las NEs de palmarosa	109
3.C.2.d. Estabilidad de las Nanoemulsiones	112
3.C.3. Bioensayo	117
3.D. Discusión	119
3.E. Conclusiones	129
<b>4. * El final es en donde partí: Ecotoxicología de las nanoformulaciones</b>	<b>131</b>
4.1. Introducción	131
4.A.2. Organismos en estudio:	135
4.A.2.a. Clasificación <i>Tenebrio molitor</i>	135
4.A.2.b. Clasificación <i>Culex pipiens pipiens</i>	137
4.A.2.c. Clasificación <i>Artemia salina</i>	139
4.A.3. Hipótesis	141
4.A.4.a. Objetivo general	141
4.A.4.b. Objetivo específicos	141
4.B. Materiales y métodos	142

4.B.1. Cría de <i>Cx p. pipiens</i>	142
4.B.2. Cría de <i>T. molitor</i> y <i>A. salina</i>	142
4.B.3. Cultivo celular	142
4.B.4. Bioensayos ecotoxicológicos con <i>T. molitor</i>	143
4.B.5. Ensayos preliminares de toxicidad en <i>Cx. p. pipiens</i>	144
4.B.6. Bioensayos ecotoxicológicos con <i>A. salina</i>	145
4.B.7. Ensayo de viabilidad celular	145
4.B.8. Análisis estadístico	148
4.C. Resultados	149
4.C.1. Bioensayos ecotoxicológicos con NPAE y NEs en larvas de <i>T. molitor</i> .	149
4.C.2. Bioensayos ecotoxicológicos en organismos acuáticos.	150
4.C.2.a. Ensayos previos de toxicidad con NPAE y NEs en <i>Cx p.pipiens</i>	150
4.C.2.b. Ensayos ecotoxicológicos con NPAE y NEs en <i>A salina</i> .	152
4.C.3. Ensayo de viabilidad en células con NEs	154
4.D. Discusión	158
4.E. Conclusiones	163
<b>5. Consideraciones Finales</b>	<b>164</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>167</b>
<b>7. Trabajos derivados de esta tesis</b>	<b>199</b>

## Índice de Figuras, Láminas y Tablas.

<b>1. El punto de partida: Los aceites esenciales</b>	<b>1</b>
<u>Lámina 1.1 : Características morfológicas de <i>P. interpunctella</i></u>	8
Lámina 1.2: Principios de manejo integrado de plagas según Barzman (2015)	14
Lámina 1.3. Estructuras representativas típicas de los aceites esenciales (Bilia et al., 2014)	21
Lámina 1.4. Larva masculina del IV estadio, donde se observa la marca sexual en los últimos segmentos abdominales	29
Tabla 1.1. Composición química de los AEs y contenido porcentual de cada componente.	31
Tabla 1.2. Valores de CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> para los distintos AE en adultos <i>P. interpunctella</i> expuestos a superficies tratadas.	33
<b>2. El Camino: Nanopartículas poliméricas</b>	<b>39</b>
Lámina 2.1. Nanomateriales en la Edad Antigua y la Edad Media	43
Lámina 2.2: Variedades de nanomateriales	44
Figura 2.1. Imágenes obtenidas por MEB de las NPAE de los AE de palmarosa (A), geranio (B) y menta (C), acompañadas con sus respectivos gráficos de DLS	63
Tabla 2.1. Tamaño medio (valor medio ± ES), índice de polidispersión (IPD, valor medio ± ES) y eficiencia de cargado (EC, valor medio ± ES) de las NPAE a los 7 días post-formulación	62
Tabla 2.2. Análisis químico pre / post-formulación de los aceites de palmarosa, geranio y menta	65
Tabla 2.3. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de palmarosa y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	66
Tabla 2.4. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de geranio y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	67
Tabla 2.5. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de menta y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	68
Tabla 2.6. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de palmarosa y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	69
Tabla 2.7. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de palmarosa y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	69
Tabla 2.8. Valores de CL <sub>50</sub> (ug cm <sup>-2</sup> ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de palmarosa y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> .	70
Tabla 2.9. Coeficientes de temperatura de los AE y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de <i>P. interpunctella</i> en bioensayos de exposición a superficies tratadas o a vapores.	71.

<b>Otra parte del trayecto: Nanoformulaciones Acuosas</b>	<b>83</b>
Lamina 3.1 Diagrama de fases idealizado, tomado y adaptado de Salager et al. (2001)	85
Cuadro 3.1. Comparación de las propiedades físico-químicas entre emulsiones/nano/microemulsiones	86
Lamina 3.2. Diferencias entre la formación de una NEs y una MEs en base a la estabilidad termodinámica y a los cambios en el $\Delta G$ .	90
Figura 3.1. Representación esquemática del proceso de preparación de las NEs y de los componentes del equipo de ultrasonido.	97
Tabla 3.1. Caracterización de las MEs elaboradas con el AE de geranio y etanol (EtOH) utilizando la técnica convencional. N = 3 réplicas.	100
Tabla 3.2. Análisis de los parámetros de ultrasonido estudiados para la elaboración de las formulaciones del AE de geranio con Tween 80 (1:2)	101
Tabla 3.3. Caracterización de formulaciones de AE de geranio elaboradas con o sin el agregado de etanol (EtOH) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm). N = 3 réplicas.	105
Tabla 3.4. Caracterización de formulaciones de AE de menta utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm). N = 3 réplicas.	105
Tabla 3.5. Caracterización de formulaciones de AE de palmarosa enriquecidas con acetato de linalilo (AL) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) N = 3 réplicas.	105
Figura 3.2. Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de geranio	106
Figura 3.3. Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de menta	107
Figura 3.4. Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de palmarosa + acetato de linalilo	108
Tabla 3.6. Caracterización de formulaciones elaboradas con geraniol (G) + acetato de linalilo (AL) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm).	110
Figura 3.5. Aspecto visual (columna 1), distribución del tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs de geraniol + acetato de linalilo.	111
Tabla 3.7. Diámetro promedio e índice de polidispersión (IPD) para las NEs de geranio, menta y palmarosa + acetato de linalilo durante 120 días de almacenamiento a 25 °C.	113
Figura 3.6. Estabilidad de las NEs de geranio (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 120 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3).	114
Figura 3.7. Estabilidad de las NEs de menta (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 30 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3).	115
Figura 3.8. Estabilidad de las NEs de palmarosa + acetato de linalilo (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 30 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3)	116
Figura 3.9. Actividad biológica de la $\beta$ -cipermetrina sola y combinada con los AE o sus NEs en larvas del IV de <i>P. interpunctella</i> .	118
Lamina 3.3. Evolución de las burbujas durante el proceso de cavitación, según Canselier et al. (2002)	121
<b>4. *El final es en donde partí: Ecotoxicología de las nanoformulaciones</b>	<b>131</b>
<u>Lamina 4.1. Características morfológicas de <i>Tenebrio molitor</i></u>	136
<u>Lamina 4.2. Características morfológicas de <i>Culex pipiens pipiens</i></u>	138
<u>Lamina 4.3. Características morfológicas de <i>Artemia salina</i> (Criel y Macrae, 2002)</u>	140
Figura 4.1. Efectos ecotoxicológicos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en larvas de <i>T. molitor</i> .	150
Figura 4.2. Toxicidad de los AE de geranio, menta y palmarosa y sus NPAE en larvas IV de <i>Cx p. pipiens</i> .	151
Figura 4.3. Toxicidad de los AE de geranio, menta y palmarosa y sus NEs en larvas IV de <i>Cx p. pipiens</i> .	152
Tabla 4.1. Efectos ecotoxicológicos de las NPAE de geranio, menta y palmarosa en larvas naupli de 48 h de <i>A. salina</i> .	153
Tabla 4.2. Efectos ecotoxicológicos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en larvas naupli de 48 h de <i>A. salina</i> .	153
Figura 4.4. Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 24 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm	155

Figura 4.5. Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 72 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm.	156
Figura 4.6. Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 168 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm	157



# 1. El punto de partida: Los aceites esenciales

---

## 1.A. Introducción

### 1.A.1. Los artrópodos

Desde sus comienzos, la taxonomía ha tenido como objetivo determinar cuántos seres vivos existen en el planeta. Sin embargo, esto ha resultado un objetivo esquivo, debido a que nuevas especies son descubiertas constantemente y, al mismo tiempo, otras se están extinguiendo. Otro motivo radica en la dificultad de hallar especies nuevas, no porque no existan, sino debido a que los métodos de muestreo son inadecuados. Además en muchos casos, resulta difícil acceder a ciertas regiones del planeta. Por los motivos antes mencionados es que encontramos números muy variables en cuanto a la cantidad de seres vivos que habitan la Tierra. Si bien las estimaciones más conservadoras hablan de alrededor de 3 millones de especie descritas, otras investigaciones más audaces estiman este número en 100 millones (Jiang, 2016). Es por esto mismo que generalmente se suele hablar más acerca de los seres vivos que ya se encuentran identificados que de los que quedan por identificar. Con esta idea en mente, Chapman (2009) plantea que existen 1.900.000 especies descritas, de las cuales el 75% resultan ser animales ( $\approx 1.425.000$  especies). Con respecto a estos datos, alrededor de 1 millón de especies se corresponden a insectos y 100.000 son arañas, ácaros y escorpiones, lo que convierte al taxón de los artrópodos en el más abundante de todos los grupos (Stork, 2019).

La relación que se ha establecido entre los artrópodos y los humanos es tan antigua como la propia humanidad. Este vínculo presenta distintos matices, desde el punto de vista antrópico; por un lado, muchos artrópodos son beneficiosos para las actividades humanas, por ejemplo los polinizadores o los controladores biológicos y por otro, existen artrópodos que establecen una relación más bien perjudicial con el ser humano, como son los ponzoñosos, los vectores de enfermedades o los que atacan a los cultivos o granos almacenados, entre otros

(Morris, 2020). Es importante focalizar la atención en este último inciso ya que la preocupación por los organismos plaga ha sido una constante en la historia de la humanidad. No son pocas las hambrunas que desde los tiempos antiguos se han relacionado con los ataques de artrópodos plagas. Sin embargo, es importante resaltar que la palabra plaga es un término totalmente circunstancial y antrópico, lo que llevó a que en su definición más tradicional se considere plaga a cualquier animal que cause daños, típicamente a los cultivos o a los productos almacenados. Esto condujo a que automáticamente se asociara a un animal con el adjetivo de “malo” o “bueno”, según la relación que entablara con el ser humano (Nilda y Vázquez, 2004).

Actualmente, el término plaga se lo puede situar al mismo nivel que el concepto de enfermedad. De la misma manera que se conceptualiza que la enfermedad no es el patógeno *per se* (virus, bacteria, etc.) sino la situación en la que un organismo vivo ocasiona alteraciones fisiológicas en otro, se debe entender al concepto de plaga como una situación en la que un animal produce daños a diversos intereses de las personas (salud, plantas cultivadas, animales domésticos, materiales o recursos naturales). Esta nueva percepción, permite separar la idea de organismo plaga de la especie animal, evitando establecer clasificaciones de estas como “buenas” o “malas”, y facilitando la explicación de por qué un animal es beneficioso en un contexto determinado y perjudicial en otro (Yáñez, 2018). Un ejemplo ilustrativo es el castor americano, *Castor canadensis* Kuhl, (Rodentia, Castoridae), el cual es una especie muy importante en Norteamérica (como elemento fundamental del ecosistema) ya que actúa como “ingeniero” del ambiente y es una pieza clave de las redes tróficas. Sin embargo, en la provincia de Tierra del Fuego, Argentina, la población de castores introducidos ha crecido a un ritmo insostenible. Por tal motivo, se considera a este animal como una especie plaga, debido a que ha modificado el ambiente y desplazó a muchas especies autóctonas de la región (Anderson et al., 2017). Otro ejemplo para pensar esta situación, es el de las hormigas y termitas, las cuales se caracterizan por sus elevadas densidades poblacionales y son

consideradas artrópodos plaga en muchos lugares del mundo. Se ha estimado que ambos grupos representan el 20% de la biomasa animal total de la Tierra. En el caso de los ecosistemas tropicales, y teniendo en cuenta a las avispa, este número se incrementa hasta el 50%. Con estos datos en mente es posible interpretar el papel decisivo que juegan los artrópodos. Por esto, a pesar de su categoría como organismos plaga, es indudable que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas (Nilda y Vázquez, 2004).

Retomando la relación que existe entre los artrópodos y el ser humano, de los 32 órdenes de insectos descritos, solamente tres (Coleoptera, Lepidoptera y Psocoptera) contienen especies consideradas organismos plaga de granos almacenados. Los hemípteros e himenópteros también pueden aparecer en estos productos, pero actuando como predadores y parasitoides de los insectos plaga antes mencionados. Miembros de otros órdenes como Thysanura, Blattodea, Diptera e Isoptera pueden encontrarse accidentalmente contaminando los granos (Dal Bello y Padin, 2006; Kumar et al. 2017; Nerio et al., 2010, Rees, 2004).

Los insectos asociados a los granos almacenados tienen una gran variedad de hábitos alimenticios; por ejemplo, existen especies granívoras o comedores de semillas que se alimentan del endosperma y/o del embrión de granos y semillas; hay especies micófagas que se alimentan de hongos e incluso depredadores y parasitoides que consumen huevos o larvas de organismos plaga. De acuerdo con los hábitos y los patrones de alimentación, los insectos que infestan el grano almacenado se clasifican en insectos plaga primarios o secundarios. Los primeros perforan la cutícula del grano, penetran y transcurren la etapa inmadura dentro del mismo, para luego emerger como adultos, alimentándose del endospermo y / o del embrión. Además de la lesión directa, los insectos plaga primarios abren puntos de entrada para otros insectos y microorganismos que se constituirán en organismos plaga secundarios. Estos comienzan a alimentarse de la parte interna del grano o de los productos procesados que se pueden llegar a encontrar almacenados (Lazzari y Lazzari, 2012).

Hill (1990) describió las comunidades de artrópodos relacionados con los granos y productos almacenados y los clasificó en seis categorías: (1) insectos plaga primarios, que penetran y crecen dentro del grano consumiendo el endosperma y el embrión; (2) insectos plaga secundarios, que se alimentan de granos rotos o harina; (3) insectos carroñeros (que incluyen cucarachas, grillos, polillas) que consumen productos de desecho de origen animal o vegetal; (4) especies fitófagas, especializadas en semillas oleaginosas, tabaco, chocolate o frutas secas; (5) especies que infestan material de origen animal en busca de queratina (piel, lana, cabello, pieles, cuernos) u otras proteínas (carne, queso, jamón y tocino) y (6) artrópodos depredadores y parasitoides como hemípteros, algunos himenópteros y ácaros.

Los insectos plaga de productos almacenados comenzaron a establecer su relación con el ser humano hace más de 10.000 años, cuando *Homo sapiens* abandonó los hábitos de caza y recolección dando paso a una vida más sedentaria. Esta nueva vida potenció el intercambio cultural y de conocimientos, factores claves para el desarrollo sociocultural futuro (Kumar et al., 2017).

Se espera que la población mundial alcance los 9.700 millones de habitantes en 2050. De esta manera se ha estimado que la producción mundial de alimentos deberá aumentar en un 70% y la producción en los países en desarrollo deberá duplicarse para satisfacer las necesidades alimentarias del mundo (ONU, 2019a). Por lo tanto, aumentará la dependencia de los cereales y las semillas oleaginosas, no solo para consumo humano y animal, sino también para producción de etanol y biodiesel. Así, el almacenamiento de la producción agrícola será indispensable para mantener la calidad y cantidad de semillas. Sin embargo, durante el almacenamiento, se pueden producir pérdidas cualitativas y cuantitativas que pueden tener un impacto significativo según las distintas partes del mundo en las que ocurran (Lazzari y Lazzari, 2012). Se estima que en países de clima templado se pierde entre el 5% y el 10% de la producción agrícola por causa de insectos plaga de granos y productos almacenados; mientras que en zonas subtropicales y tropicales este porcentaje está por encima del 25%,

especialmente en agriculturas de subsistencia. En términos monetarios se calcula que a nivel global los artrópodos causan pérdidas del 18 al 20% del total de lo producido, lo que representa aproximadamente una pérdida de US\$ 470 mil millones (Sharma et al., 2017). En el caso particular de la Argentina la producción promedio de grano en los últimos tres años fue 125 millones de toneladas anuales (Secretaría de Agroindustria, 2018). Esto representó alrededor del 15% del comercio mundial de granos y subproductos (Abadía et al., 2019). Debido a la demanda internacional, se proyecta que la producción argentina aumentará un 10-20% (Ministerio de Agricultura de Argentina, 2011; Fundación INAI, 2017). Las pérdidas poscosecha (como resultado del transporte, limpieza, secado y acción de roedores, insectos, pájaros, hongos, entre otros) rondan el 10% promedio anual. Esto representa unos 22 mil millones de dólares que dejan de ingresar en el sistema económico. Esto implica que cada punto porcentual de reducción de esas pérdidas arrojaría un beneficio para el país de 22 millones de dólares, excluyendo el beneficio extra que derivaría de la transformación de esos granos en productos elaborados (INTA, 2013).

Los daños millonarios que pueden producir los insectos plaga pueden dividirse en dos categorías: daños directos y daños indirectos (Shankar y Abrol, 2012). Los daños directos son los producidos por la alimentación del insecto sobre el producto, que se reflejan en la pérdida de peso y/o volumen de los mismos así como también en la reducción de la capacidad germinativa y el valor nutricional (Pascual, 1997). Los daños indirectos ocasionan la inviabilidad del producto y suelen tener un impacto mayor que los directos. La presencia de exuvias, deyecciones, seda y otros restos causan la pérdida de valor del producto que ha sido atacado. Además, la propia actividad metabólica de los insectos produce un aumento de la temperatura que provoca la condensación de la humedad favoreciendo así el desarrollo de hongos que contaminan el producto con micotoxinas y lo convierten en no apto para el consumo humano (Shankar y Abrol, 2012; Rees, 2004).



Entre los agentes causales de estos daños, podemos citar dentro del grupo de las plagas primarias a algunos coleópteros de la familia Curculionidae (*Sitophilus granarius* L.; *S. oryzae* L.; *S. zeamais* Motschulsky y *Prostephanus truncatus* Horn) y Bostrichidae (*Rhyzopertha dominica* Fabricius) y lepidópteros de la familia Gelechiidae (*Sitotroga cerealella* Olivier). Entre las plagas secundarias podemos citar coleópteros de la familia Cucujidae (*Cryptolestes ferrugineus* Stephens y *Oryzaephilus surinamensis* L.), Tenebrionidae (*Tribolium castaneum* Herbst) y lepidópteros de la familia Pyralidae por ejemplo *Corcyra cephalonica* Stainton, *Ephestia cautella* Walker y *Plodia interpunctella* Hübner (Kumar et al. 2017). Esta última especie fue el insecto utilizado para desarrollar la mayoría de los ensayos de esta tesis doctoral.

### **1.A.2. Insecto en estudio: *Plodia interpunctella***

#### **1.A.2.a. Clasificación**

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Lepidoptera

**Superfamilia:** Pyraloidea

**Familia:** Pyralidae

**Género:** *Plodia*

**Especie:** *Plodia interpunctella* (Hübner).

#### **1.A.2.b. Biología de *Plodia interpunctella***

*P. interpunctella*, también conocida como la polilla de la fruta seca, es un lepidóptero cosmopolita, considerado un organismo plaga secundario, que ataca toda clase de frutas secas, granos, harinas y productos manufacturados derivados (Jia et al., 2018).

Es un insecto holometábolo su comportamiento de ovoposición está influenciado por los olores de los alimentos, sobre los cuales la hembra deposita los huevos (Mohandass, 2007). Pérez et al. (2012) informaron que la cantidad de huevos por hembra varía de 40 a 400, con un promedio de 177, siendo la alimentación, la temperatura y la HR las principales variables que

modifican este parámetro (McDonough, 2011). El periodo larval, que es la fase dañina del insecto al alimentarse de los productos almacenados, dura aproximadamente la mitad del ciclo de la especie. El periodo pupal tiene una duración que varía entre 7 y 9 días. Finalmente, el estado adulto tiene una duración aproximada de 10 días (Pérez et al., 2012). El ciclo de vida de *P. interpunctella*, desde la eclosión del huevo hasta la muerte del adulto, requiere de entre 25 y 60 días según las condiciones ambientales. A 25 °C y 70 % de humedad, el ciclo se completa en 34 días (Mohandass, 2007).

Es importante destacar que este ciclo se puede ver alterado debido a las condiciones del entorno, lo que puede generar que estos insectos desarrollen una mayor capacidad de colonizar un ambiente. Algunos trabajos estudiaron el efecto de diferentes dietas en el comportamiento reproductivo de las hembras de *P. interpunctella*. Phillips y Strand (1994) demostraron que una dieta basada en harinas de maíz produce la dispersión de este insecto así como la ovoposición de hembras oviplenas. Por otra parte, las nueces y las almendras también parecen contener volátiles atractivos para las hembras (Hoppe, 1981); a su vez, el aceite de nuez puede actuar como un estimulante de la ovoposición (Nansen y Phillips, 2003). En un estudio llevado a cabo en una fábrica de chocolates se observaron polillas adultas volando alrededor de grandes contenedores con chocolate y productos derivados que fomentaron la ovoposición de las hembras (Olsson, 2006).

### **Lámina 1.1: Características morfológicas de *P. interpunctella***

**Adultos:** Miden 15 a 20 mm de envergadura alar. Las alas anteriores en su parte basal son de color grisáceo claro; el resto son de color pardo oscuro, lo mismo que la cabeza y el tórax. Las alas posteriores son de color gris claro. Cuando el insecto está en reposo, pliega las alas a lo largo del cuerpo quedando las antenas dispuestas hacia atrás, apoyadas a lo largo del cuerpo (INTA, 2010).



Adultos de *P. interpunctella*

**Huevos:** Son pequeños y ovalados con bordes aplanados, de color blanquecino, con un tamaño aproximado de 0,54 - 0,67 mm de largo. Presentan excrecencias redondeadas y carenas prominentes, características que permiten separarlos de otros huevos de insectos plaga (Mohandass, 2007)

**Larvas:** El desarrollo larval transcurre por cinco estadios que se diferencian por su color y por su tamaño. El primer y segundo estadio presenta la cabeza marrón claro y el cuerpo blanco, casi transparente, con setas blanquecinas en el dorso y los laterales. En el tercer estadio la coloración

del cuerpo cambia a amarillo claro, con el primer segmento torácico más oscuro, similar en coloración a la cápsula cefálica. El cuarto estadio tiene el cuerpo amarillo claro con el primer segmento torácico oscuro y la cabeza marrón; presenta setas traslúcidas en todo el cuerpo, más coloreadas en los dos último segmentos abdominales. El último estadio se caracteriza por su color amarillo con tonalidades rosadas, la cabeza de color marrón, el primer segmento torácico más claro que esta y en el último segmento abdominal, las setas amarillentas. En este estadio se alcanza la mayor longitud del cuerpo con  $7,63 \pm 1,01$  mm como promedio. En este periodo las larvas tejen un capullo para el posterior desarrollo de la pupa (Pérez et al., 2012).



Larva IV de *P. interpunctella*

**Pupas:** Son de color variable dependiendo del tiempo de desarrollo; al principio, es amarillenta, después se torna marrón claro y finalmente marrón oscuro, con una longitud aproximada de  $8,71 \pm 0,56$  mm. Próximo a la eclosión del adulto, adquiere una coloración oscura (McDonough, 2011).

### **1.A.3. Métodos de control de insectos plaga**

Como fue citado anteriormente, muchos insectos causan efectos no deseados en la agricultura y la salud humana. Se calcula que a nivel mundial se pierde en promedio el 14% de los cultivos y alimentos, lo que representa un grave problema en un mundo en donde alrededor de 870 millones de personas todavía tienen hambre y 8 millones de personas mueren debido a esta problemática (ONU, 2019b). A esto hay que sumarle que varios artrópodos propagan enfermedades como la malaria, la ceguera de los ríos, la enfermedad del sueño, el mal de Chagas, la enfermedad de Lyme, entre otras. En muchas regiones se ha declarado al mosquito como "enemigo público número uno", ya que sigue siendo un importante problema de salud pública como vector de malaria, virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, filariasis, dengue y encefalitis japonesa (Govindarajan et al., 2016). Es por estas causas que el control y manejo de los artrópodos plaga se ha convertido desde hace varios años en un eje clave de muchas políticas internacionales.

A lo largo de la historia, el ser humano ha tratado de combatir a los insectos de distintas formas. Algunos escritos indican que ya en el año 4500 a.C los sumerios usaban compuestos de azufre contra los organismos plaga, y hacia el 3500 a.C los chinos aplicaban sustancias con mercurio y arsénico para luchar contra los piojos (Ansari et al., 2014).

Pero el uso exitoso e intensivo de productos químicos para controlar a los insectos comenzó en la segunda mitad del siglo XIX, cuando sustancias tales como naftalenos, kerosene, ácido cianhídrico, sulfuro de carbono y compuestos derivados del arsénico, entre otros comenzaron a ser producidos y empleados masivamente (Oberemok et al., 2015).

Durante la Segunda Guerra Mundial, la industria de los pesticidas sintéticos tomó auge, principalmente con el uso del DDT (diclorodifeniltricloroetano) para proteger a los soldados de los ectoparásitos. Luego, con la explosión demográfica, la creciente demanda de alimentos, la tecnificación agrícola y la necesidad de controlar nuevos y diversos organismos plaga,

favoreció la fabricación y el consumo de pesticidas, entre los que se destacaron los organoclorados y organofosforados (Betancur Corredor et al., 2013). Es así que los insecticidas sintéticos comenzaron a jugar un papel importante en el manejo de especies plagas, con el fin de reducir las pérdidas causadas por éstas y lograr satisfacer las demandas de la creciente población. Los organoclorados se han utilizado para controlar la malaria, el dengue y los insectos vectores desde la década del 50'. En 1955, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó un programa para eliminar la malaria en todo el mundo, basándose principalmente en el uso del DDT. Tal programa tuvo gran éxito en el Caribe, Taiwán, parte del norte de África, los Balcanes, etc. y desempeñó un papel menor en América del Norte y Europa. Alrededor de siete millones de vidas humanas se han salvado mediante el uso del DDT y otros compuestos organofosforados, que permitieron el control de enfermedades transmitidas por insectos como la malaria, la enfermedad del sueño, la peste bubónica y el tifus (Gamboa, 2014).

Hoy en día aproximadamente mil sustancias químicas son utilizadas en más de cincuenta mil formulaciones en todo el mundo como insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas y antimicrobianos (Rousis et al., 2017). A pesar de que los insecticidas sintéticos siguen siendo los más usados a nivel mundial, su uso indiscriminado ha producido efectos adversos en la salud humana y en la vida silvestre, muchas veces de carácter irreversible. En lo que respecta a la temática ambiental, el uso generalizado de agroquímicos para controlar a los organismos plaga y proteger los cultivos se asoció ampliamente con la contaminación de las aguas, los suelos y los alimentos. Las altas concentraciones de estas sustancias detectadas en muestras ambientales son resultado de su continua aplicación. Por otro lado, los residuos líquidos y sólidos, así como los productos caducos, son almacenados o dispuestos a la intemperie de forma inadecuada, lo que ha propiciado la aparición de importantes cantidades de pasivos ambientales que, en la mayoría de los casos, no son reportados a la autoridad correspondiente (McKnight et al., 2015).

El agua contaminada con pesticidas genera efectos nocivos en la biota acuática. El zooplancton, la principal fuente de alimento para muchos peces jóvenes, puede verse gravemente afectado por los pesticidas, cuando estos se acumulan en cuerpos de agua a niveles peligrosos. Los peces que se alimentan de insectos afectados por los pesticidas, se ven en la obligación de migrar para buscar nuevas fuentes de alimentos y, por lo tanto, pueden exponerse a mayores riesgos, como los depredadores (Ansari et al 2014). También se conoce que, a nivel mundial, las poblaciones de anfibios están disminuyendo en los ecosistemas agrícolas en los que se emplean cantidades excesivas de pesticidas (Brühl et al., 2013). Los anfibios están más amenazados debido a que resultan ser más sensibles a las bajas concentraciones de insecticidas que las aves o los mamíferos (Hua y Relyea, 2012). De esta manera y mediante los procesos de biomagnificación y bioacumulación, los pesticidas también afectan a los animales a lo largo de la cadena alimentaria (como las aves y los mamíferos), generando una reducción de la biodiversidad (Bolzonella et al., 2019).

Otra de las problemáticas asociadas al uso excesivo de insecticidas químicos es el desarrollo de poblaciones resistentes. Esto incrementa sustancialmente el uso de estos productos, lo que conlleva a efectos adversos en organismos no blanco (Hackett y Bonsall, 2019)

Con respecto a la salud humana, una exposición prolongada, incluso a dosis bajas de pesticidas, genera trastornos en el mediano y largo plazo, entre los que se destaca el cáncer y las alteraciones reproductivas y en el sistema nervioso (Ansari et al., 2014). Estas alteraciones se deben a que muchos insecticidas, como el caso de los organofosforados, tienen sitios de acción similares en insectos y mamíferos. Estas sustancias producen la fosforilación de la acetilcolinesterasa (AChE) que se encuentra en las sinapsis. De esta manera, el órgano efector se sobreestimula por el exceso de acetilcolina (la sustancia transmisora de impulsos en la terminación nerviosa) como resultado de una pérdida de la actividad de la AChE. La exposición aguda a insecticidas puede causar vómitos, diarrea, calambres abdominales, mareos, dolor

ocular, visión borrosa, confusión, entumecimiento, espasmos, parálisis y muerte (Manthripragada et al., 2010; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Rohlman et al., 2011). Además, estos productos pueden generar efectos teratogénicos, tumores cerebrales infantiles, leucemia y linfomas y también pueden actuar como tóxicos para el hígado y el sistema respiratorio. Cabe mencionar que la mayoría de los casos leves de intoxicación no son reportados porque las personas no acuden a los sistemas de salud (Koureas et al., 2012).

Desde finales de la década de los 70', una gran cantidad de investigaciones científicas en diferentes disciplinas han focalizado los riesgos ambientales a los que conlleva el uso de los pesticidas (Vernier et al., 2017). Estos estudios concluyeron que el uso indiscriminado de insumos químicos en el sistema de producción agrícola no puede ser ambiental ni socialmente sostenible a largo plazo (Travisi et al., 2006), ya que reducen la biodiversidad y desestabilizan la estructura del suelo, además de que contribuyen con el efecto invernadero (Khalil y Osborne, 2018; Marín-Benito et al., 2017).

Los continuos ataques de insectos plaga a finales de los años 50 condujeron a pensar en una nueva concepción para su control. En esta década se discutieron y formularon las ideas principales del entonces denominado Control Integrado, que dio paso, a la noción de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP representó un cambio radical en la filosofía del control de organismos plaga promulgando su manejo de una manera más ecosustentable. El objetivo central del MIP es resolver los problemas provocados por los organismos plaga, para lograr maximizar la productividad de los cultivos y a la vez reducir el uso de plaguicida, con la incorporación de buenas prácticas de manejo (Jeger, 2000). El MIP es una combinación de sentido común y principios científicos. Es una manera de pensar que combina el conocimiento de la biología y el comportamiento de las especies plaga con la experiencia en la utilización de las distintas herramientas disponibles (culturales, físicas, químicas, e incluso legislativas) y la habilidad de adaptarse a la multiplicidad de circunstancias en las que se presentan los organismos plaga. Su objetivo principal es disminuir al máximo los factores de riesgo que

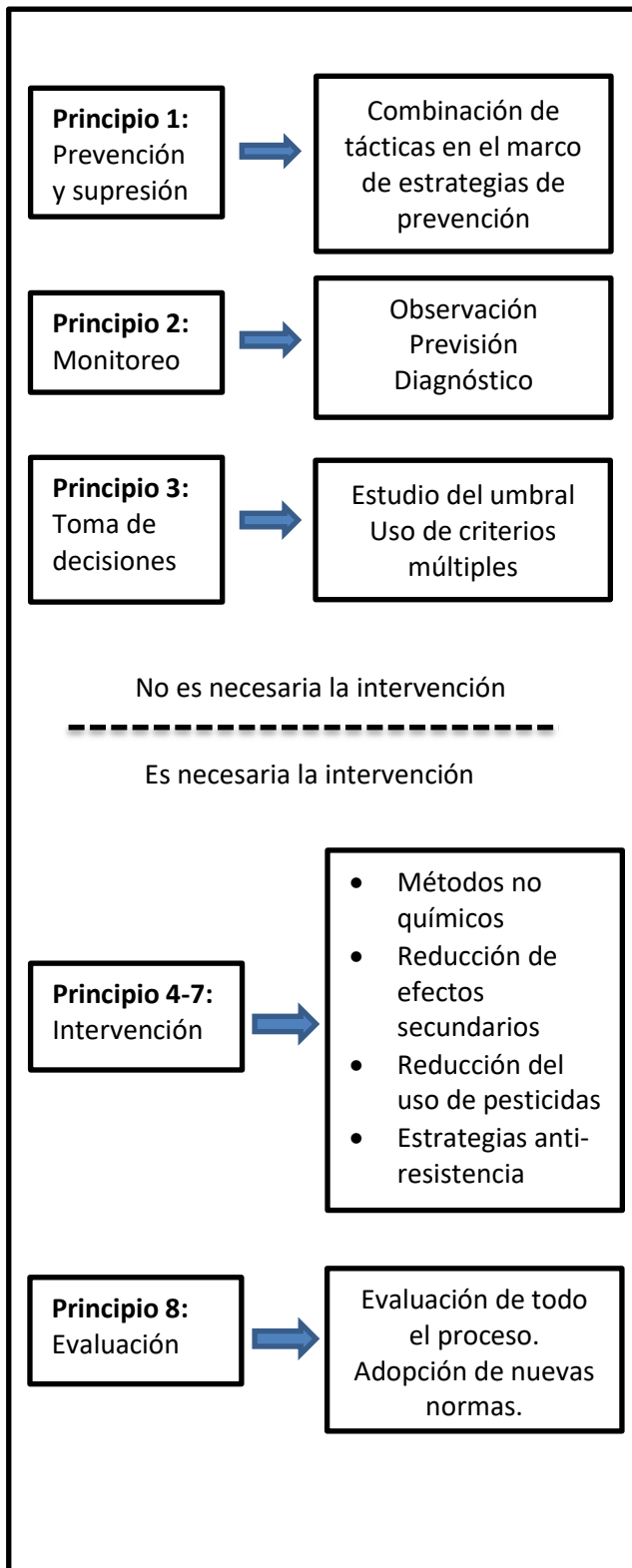
posibilitan la proliferación de los mismos, a través de mejoras ambientales, culturales y de infraestructura y paralelamente reducir la aplicación de productos tóxicos al máximo posible, a fin de prevenir efectos perjudiciales en la salud humana y en el medio ambiente (Stenberg, 2017)

Ciertas acciones son importantes en cualquier estrategia de MIP (Barzman,2015), entre las que se pueden citar

- Aprender sobre la biología de las especies (hábitos, ciclo de vida, necesidades y aversiones) para poder modelar y predecir los crecimientos poblacionales y definir el nivel de daño.
- Monitorear frecuentemente las poblaciones del organismo plaga.
- Controlar oportunamente las poblaciones que alcancen el umbral de daño económico.
- Evaluar y controlar los métodos utilizados con el fin de asegurar que no causen deterioro al ambiente y afecten la salud de los operarios o consumidores.
- Buscar un balance entre maximizar las ganancias del productor y la sostenibilidad del programa de producción establecido.



Lámina 1.2: Principios de manejo integrado de plagas (Barzman, 2015)



**Principio 1: Prevención / supresión de organismos nocivo**

- Prevenir la propagación de organismos nocivos mediante medidas de higiene (por ejemplo, mediante la limpieza periódica de maquinaria y equipos)
- Protección y mejora de organismos benéficos importantes, por ejemplo, mediante medidas adecuadas de protección de plantas o la utilización de infraestructuras ecológicas dentro y fuera de los sitios de producción.

**Principio 2: Monitoreo**

Los organismos nocivos deben controlarse mediante métodos y herramientas adecuadas que deberían incluir la observación y sistemas de advertencia, pronóstico y diagnóstico temprano. Además del asesoramiento de profesionales.

**Principio 3: Toma de decisiones**

Con base en los resultados del monitoreo, el profesional tiene que decidir si aplicar medidas de protección y cuándo hacerlo. Los valores umbral son componentes claves para la toma de decisiones.

**Principio 4: Métodos no químicos**

Los métodos biológicos, físicos y otros métodos no químicos sostenibles deben preferirse a los métodos químicos si proporcionan un control de plagas satisfactorio.

**Principio 5: Selección de pesticidas**

Los pesticidas aplicados deben ser lo más específico posible para el organismo plaga y deben tener casi nulos efectos secundarios sobre la salud humana, los organismos no blanco y el medio ambiente.

**Principio 6: Uso reducido de pesticidas**

El profesional debe mantener el uso de pesticidas y otras formas de intervención en los niveles recomendados a modo de evitar el rápido desarrollo de resistencia y el riesgo de intoxicación.

**Principio 7: Estrategias de resistencia**

Es necesario aplicar estrategias que eviten desarrollar resistencia para mantener la efectividad de los productos. Esto puede incluir el uso de múltiples pesticidas con diferentes modos de acción.

**Principio 8: Evaluación**

Con base en los registros sobre el uso de pesticidas y el monitoreo de organismos nocivos, el profesional debe verificar el éxito de las medidas de protección aplicadas.

#### **1.A.4. Métodos no químicos para el control de insectos**

##### **1.A.4.a. Temperatura**

El manejo de las temperaturas en los lugares de almacenamiento de granos y semillas es una de las mejores maneras de controlar los distintos insectos plaga que habitan en estos ambientes. Casi todas las especies plaga no pueden tolerar temperaturas extremas, por ejemplo, el calentamiento o enfriamiento de los granos y semillas. Esta técnica proporciona una buena protección sin ningún tratamiento químico (Kumar et al., 2017). Se conoce que la tasa máxima de crecimiento y de reproducción para la mayoría de los insectos plaga de grano almacenado ocurre entre 25 y 35°C. Es decir que incrementar o reducir la temperatura por encima o debajo de este rango conduce a la reducción o cese del desarrollo, como así también puede llevar a una eventual muerte (Bartholomaeus et al., 2005). Para lograr esto se suele usar, por ejemplo, la aireación mediante ventiladores que permiten enfriar granos o semillas y reducir la tasa de crecimiento en silos y almacenes, aunque también se la puede usar en cultivos (Arthur et al., 2008). El enfriamiento mediante refrigeradores industriales es otra estrategia usualmente empleada. Sin embargo, para lograr una disminución significativa de los insectos plaga, se requieren tiempos prolongados de almacenamiento a estas temperaturas (entre dos a tres semanas), (Johnson, 2007). Por otra parte, en lo que se refiere a mecanismos que incrementan la temperatura, se puede citar la radiación por microondas o infrarroja. Estos métodos no se han utilizado ampliamente debido al tiempo requerido para tratar grandes cantidades de granos y semillas (Beckett et al., 2007). Otro método ensayado es el calentamiento directo de los contenedores de granos para su desinfección, pero el costo requerido para implementarlo resulta inviable al compararlo con la aplicación de los insecticidas convencionales (Tilley et al., 2007).

#### **1.A.4.b. Saneamiento y estructuras de almacenamiento**

El saneamiento de los productos almacenados, la estructura de los lugares de almacenamiento y la exclusión efectiva de los insectos son las claves del manejo preventivo. Para los granos almacenados a granel, es imperativo que los productos recién cosechados se almacenen en contenedores desinsectizados y nunca con restos de granos o productos más antiguos, ya que estos pueden actuar como vehículos para infestar los nuevos productos. Además, el equipo de cosecha, los contenedores de transporte o almacenamiento y las áreas de carga deben desinsectarse completamente antes del almacenamiento de los nuevos productos (Arthur et al., 2009; Reed, 2006).

Otras variables a tener en cuenta son los aspectos mecánicos y estructurales de los contenedores y edificios que contienen granos o productos almacenados. Tales aspectos deben ser considerados durante la construcción y el mantenimiento de dichas estructuras. Por ejemplo, los granos crudos, que pueden almacenarse durante varios meses antes del procesamiento y pueden albergar poblaciones de insectos en crecimiento, se deben ubicar físicamente en contenedores separados de las áreas de procesamiento y embalaje. Además, se deben sellar los techos y las paredes laterales de las estructuras de almacenamiento. El sellado del almacén o cualquier estructura es crítico para que el tratamiento con fumigantes sea efectivo cuando sea necesaria su aplicación (Kumar et al., 2017).

Con respecto a la exclusión de los insectos, los materiales de empaque para granos almacenados y sus productos derivados, deben ser resistentes a la penetración de los mismos (Mullen et al., 2006). Estos alimentos deben sellarse muy bien, de modo tal de lograr disuadir a los insectos invasores y por lo tanto, deben fabricarse con materiales duraderos que resistan la posibilidad de ser penetrados. También existen nuevas tecnologías, que buscan impregnar estos envases con repelentes. Sin embargo, su adopción comercial es difícil, principalmente

debido a la baja rentabilidad y el bajo potencial de aceptación del consumidor. (Hou et al., 2004).

#### **1.A.4.c. Polvos inertes**

Los polvos inertes son utilizados para la protección de productos almacenados de los insectos plaga y se pueden clasificar en cuatro grupos (Banks y Fields, 1995). El primero consiste en arcillas, arena, cenizas de cáscara de arroz y cenizas de madera. Este grupo también incluye a las cenizas volcánicas que han demostrado poseer actividad insecticida (Buteler et al., 2014). El segundo grupo consiste en una gran cantidad de minerales como dolomita, magnesita, oxiclورو de cobre, fosfato de roca, azufre molido, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y cloruro de sodio. Estos tipos de polvos se han probado en el pasado y brindan protección contra los insectos plaga de grano almacenado. Algunos de estos minerales se utilizan ampliamente en los países en desarrollo y en vías de desarrollo como forma de almacenamiento de bajo costo (Golob, 1997). El tercer grupo consiste en polvos que contienen dióxido de silicio, que son ligeros e higroscópicos, y que se producen al secar una solución acuosa de silicato de sodio (Korunic, 1998). El cuarto grupo consiste en polvos que contienen sílice natural, como la tierra de diatomeas, que proviene de esqueletos fosilizados de estos organismos (Kumar et al., 2017).

#### **1.A.4.d. Irradiación**

La aplicación de irradiación a bajas dosis es capaz de esterilizar o matar a los insectos plaga, incluso en sus etapas inmaduras, por lo cual es un método adecuado para su uso a nivel comercial. Mediante la radiación de superficie o directamente de los mismos productos comerciales, se puede eliminar a los distintos organismos plaga que pueden afectarlos (Hallman et al., 2008). En este método se suelen usar fuentes de radiación ionizante como los radioisótopos de cesio o el cobalto, o se generan rayos X a través de un haz de electrones (Halverson et al., 2000).

#### **1.A.4.e. Métodos mecánicos**

La utilización de varios dispositivos mecánicos para el manejo de organismos plaga es bastante común en todo el mundo.

La centrifugación es el medio directo de control mecánico más utilizado; permite separar los granos o semillas de los insectos que los afectan. Hay varios otros dispositivos mecánicos, por ejemplo, trampas de sonda, de pulsos, de luz, de cebo, adhesivas y de feromonas que se utilizan para eliminar a los insectos minimizando las pérdidas de almacenamiento (Balasubramani et al., 2003).

#### **1.A.4.f. Métodos biológicos**

La utilización de enemigos naturales para el manejo de los insectos plaga se ha reportado en varios trabajos científicos (Dainese et al., 2017; Rodríguez-Saona et al., 2012; Soares et al., 2019; Tschardt et al., 2016), pero su aplicación práctica a nivel comercial es muy limitada. Los parasitoides son los controladores naturales más utilizados en el mercado. Por ejemplo las polillas de productos almacenado pueden ser manejadas fácilmente por *Trichogramma sp.* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). La liberación de *Trichogramma evanescens* y *Habrobracon hebetor* resultó ser un método altamente efectivo para el manejo de *E. kuehniella* en el sector industrial (Akinkulore et al., 2009, Scholler et al., 2006). La agencia de Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología sugirió promover el control biológico, por ejemplo, al tratar lugares de almacenamiento vacíos con ácaros depredadores o parásitos, avispas y hongos entomopatógenos para eliminar las poblaciones restantes de insectos plaga que pueden quedar alimentándose de restos de comida (Hansen y Wakefield, 2007). Es así que la liberación efectiva de enemigos naturales se podría convertir en un paso muy importante para el éxito de los programas de control biológico.

### 1.A.5. Aceites esenciales: Una alternativa como bioinsecticidas

A medida que los consumidores están cada vez más informados sobre los problemas de alimentación, salud y nutrición, también están tomando conciencia de los beneficios y las posibles aplicaciones de las plantas medicinales y aromáticas y sus metabolitos; entre ellos, los aceites esenciales (AE) (Dhifi et al., 2016). A pesar de su composición rica y compleja, el uso de los AE sigue estando limitado a los dominios de la industria cosmética y de perfumería. Es por esto que vale la pena desarrollar una mejor comprensión de su química y sus propiedades biológicas para desarrollar nuevas aplicaciones en la salud humana, la agricultura y el ambiente. Los AE podrían explotarse como alternativas efectivas o complementos a los compuestos sintéticos de la industria química, evitando de esta manera los efectos colaterales de estos últimos (Van de Vel et al., 2017).

El término AE se remonta al siglo XVI, y estuvo inspirado en la droga *Quinta essentia*, debido a que ambos elementos mostraban un carácter inflamable (Hanif et al., 2019). Actualmente, los AE se definen como sustancias volátiles que tienen componentes aromáticos que le dan un olor, sabor o aroma característico a una determinada planta. Estas sustancias son los subproductos del metabolismo de las plantas y se conocen comúnmente como metabolitos secundarios. Los AE son producidas por más de 17.500 especies de plantas aromáticas que pertenecen a diferentes familias tales como Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae y Asterácea (Regnault-Roger et al., 2012). Estos productos son sintetizados en el citoplasma de ciertas células y almacenados en estructuras secretoras complejas que se encuentran en la epidermis, los tricomas glandulares, las cavidades secretoras y los conductos de resina. Tales estructuras se pueden ubicar en las hojas, los tallos, las flores y los frutos, en la corteza o en las raíces (Calo et al., 2015). Según la especie vegetal el lugar de almacenamiento del AE será distinto (Dhifi et al., 2016):

- En lavanda, geranio, naranja, rosas y clavo de olor el aceite se almacena en las flores.

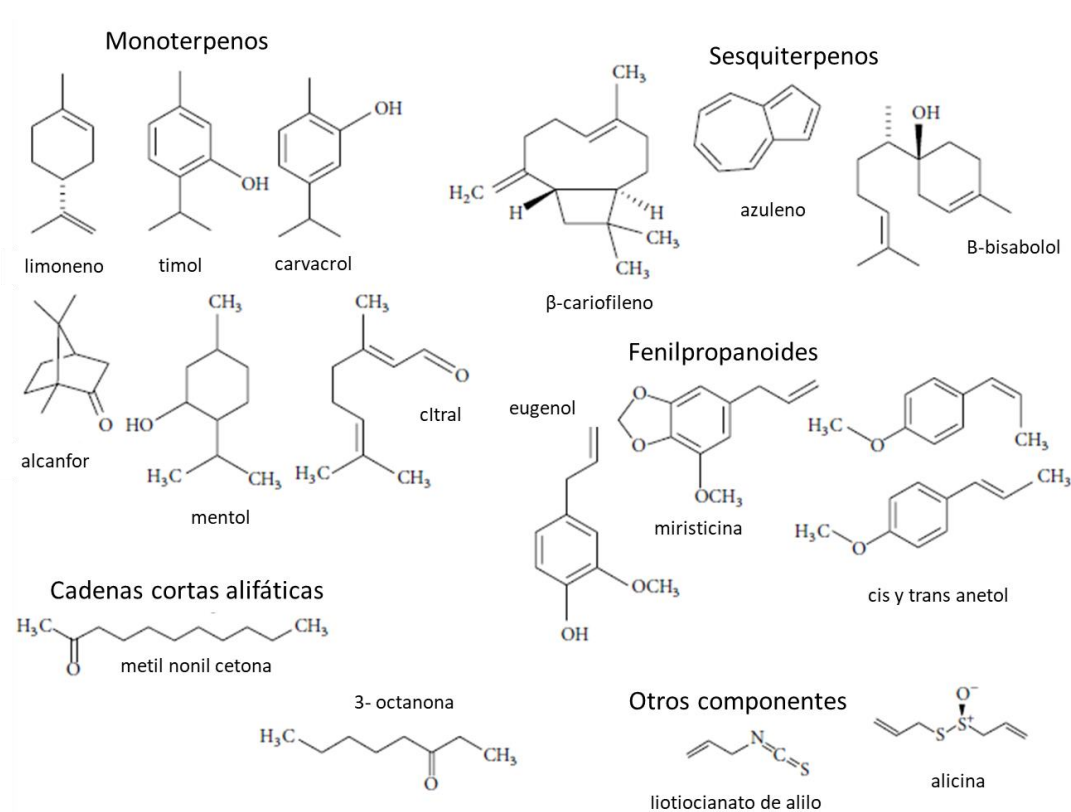
- En eucalipto, menta, palmarosa, tomillo, laurel, salvia, en las hojas
- Ciertas plantas almacenan AE en los órganos subterráneos por ejemplo, raíces (vetiver), rizomas (jengibre, dulce bandera) o semillas (carvi, cilantro).
- hinojo, anís, bergamota y otros cítricos almacenan el AE en los frutos
- canela, sándalo, palo de rosa depositan estos productos en la corteza.

En la naturaleza, los AE cumplen un rol vital como señales químicas que permiten a la planta controlar o regular su entorno (función ecológica) ya sea en la atracción de insectos polinizadores, la repelencia de los fitófagos, la inhibición de la germinación de semillas o la comunicación entre plantas (por ejemplo, actúan como señales que indican la presencia de herbívoros) (Bali et al., 2016).

Los AE se caracterizan por ser sustancias solubles en alcohol, éter y aceites, pero insolubles en agua. Son generalmente líquidos e incoloros a temperatura ambiente, poco densos y con olores característicos. Tienen un índice de refracción y una actividad óptica muy alta (Bhavaniramy et al., 2019).

Estos aceites son mezclas complejas que pueden contener más de 300 compuestos diferentes. Generalmente, presentan componentes orgánicos volátiles de bajo peso molecular (< 300). Estos compuestos son principalmente terpenos con distintos grupos químicos: alcoholes, aldehídos, éteres u óxidos, cetonas, ésteres, aminas, amidas, fenoles, heterociclos. Los alcoholes, los aldehídos y las cetonas son los que demuestran una amplia variedad de aromas tales como frutales (E-nerolidol), florales (linalool), cítricos (limoneno), entre otros (Ali et al., 2014). La composición (compuestos y sus respectivas concentraciones) de AE pueden variar significativamente, dependiendo del método de extracción, el órgano vegetal utilizado, la temporada de cosecha y el origen de la planta (Yuan et al., 2016).

**Lámina 1.3.** Estructuras representativas de los AE (Bilia et al., 2014).



Los factores geoclimáticos y el tipo de suelo pueden originar diferentes quimiotipos de una misma planta, de la cual se pueden destilar AE con composición química, propiedades y bioactividad, diferentes. Por ejemplo, en el tomillo, *Thymus vulgaris* L. (Fam. Labiatae), se distinguen al menos cuatro quimiotipos, según sus compuestos principales: (I) timol y p-cimeno; (II) carvacrol, timol y borneol; (III) linalool, terpinen-4-ol y acetato de linalilo y (IV) geraniol y acetato de geraniol. Cada aceite aislado de estos quimiotipos huele diferente y tiene distintas propiedades biológicas. Mientras que los quimiotipos de tomillo I y II tienen una fuerte actividad antibacteriana y son irritantes, los quimiotipos III y IV no lo son y tienen una actividad antibacteriana moderada. Además, el aceite del quimiotipo III tiene un efecto sedante debido a la presencia de linalol y acetato de linalilo (Satyal et al., 2016). Otro parámetro importante es el momento de cosecha de la planta, de esto dependerá tanto el rendimiento como la composición del aceite. Por ejemplo, el AE de salvia (*Salvia officinalis* L., Lamiales, Lamiaceae) contiene,  $\alpha$ -tujona, compuesto que varía sus cantidades, dependiendo



del momento en que se cosecha la planta. Es así que la cantidad de este componente será máxima cuando la planta es cosechada después de la floración y será mínima, luego de florecer (Medrano et al., 2019). Otro caso llamativo resulta ser el de las flores de jazmín que al ser recolectadas en las horas de la mañana contienen en su aceite una combinación de linalol, alcohol bencílico, *cis*-jasmona e indol, pero cuando las flores se recolectan en horas de la tarde, su aceite presenta altos niveles de benzoato de bencilo, eugenol y metilsalicilato. Estos dos últimos compuestos suelen producir un aroma desagradable e indeseable, que puede generar un rechazo, por parte de los consumidores de perfumes y de productos de aromaterapia (Pino y Ramírez, 2009).

#### **1.A.5.a. Aplicación**

Los AE tienen propiedades interesantes con distintas actividades, por lo que han sido empleados en industrias como la cosmética y de perfumería, además de su uso en terapias aromáticas. A su vez muchas nuevas propiedades han sido descubiertas últimamente y esto hace que en los años recientes el interés de industrias como la alimenticia y de insecticidas se haya incrementado mediante diferentes investigaciones en este área (Dhifi et al., 2016).

#### **1.A.5.b. Actividad antimicrobiana**

Las propiedades antimicrobianas de los AE y de sus componentes, así como también los mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados (Al-Shuneigat et al., 2020; Donsi y Ferrari, 2016; Herman et al., 2016; Knezevic et al., 2016; Moosavy et al., 2017). Una de las características más llamativas de los AE es la hidrofobia, que les permite alterar la estructura y la permeabilidad de las membranas celulares bacterianas. De esta manera, se promueve la salida de iones y otras moléculas, además del contenido celular, lo que conduce a la muerte del organismo (Hammer y Carson, 2011; Devi et al., 2010). Se ha informado que los AE que contienen principalmente aldehídos o fenoles, como el cinamaldehído, citral, carvacrol, eugenol o timol, se caracterizaron por poseer gran actividad antibacteriana, seguidos por los

AE que contienen alcoholes terpénicos. Aquellos AE que presentan cetonas o ésteres, como la tujona o el acetato de geranilo, tienen una actividad mucho más débil, mientras que los aceites ricos en hidrocarburos terpénicos generalmente son inactivos (Hui et al., 2017).

#### **1.A.5.c. Actividad antioxidante**

Numerosos estudios han demostrado las propiedades antioxidantes de los AE (Das et al., 2020; da Silva et al., 2016; Mezza et al., 2018; Selmi et al., 2016; Snoussi et al., 2018). El potencial antioxidante de un AE depende de su composición, es así que los compuestos fenólicos y los metabolitos secundarios con dobles enlaces conjugados suelen mostrar propiedades antioxidantes sustanciales (Snoussi et al., 2018). El timol y el carvacrol son los compuestos que presentan una mayor actividad antioxidante. Tal actividad está relacionada con su estructura fenólica. Estos compuestos fenólicos tienen propiedades redox y, por lo tanto, juegan un papel importante en la neutralización de los radicales libres y también en la descomposición del peróxido de hidrogeno (Rúa et al., 2019). La actividad antioxidante de los AE se debe también a ciertos alcoholes, éteres, cetonas, aldehídos y monoterpenos: linalool, 1,8-cineol, geranial, neral, citronelol, isomentona, y mentona (Dhifi et al., 2016).

#### **1.A.5.d. Actividad antiinflamatoria**

Un proceso de inflamación es una respuesta habitual de protección y que es inducida por una lesión o infección del tejido. La respuesta inflamatoria induce un aumento de la permeabilidad de las células del revestimiento endotelial y la afluencia de leucocitos al intersticio, a la vez que se estimula la actividad de varias enzimas. Recientemente, los AE se han utilizado en entornos clínicos para tratar enfermedades inflamatorias, como reumatismo, alergias o artritis (Hanif et al., 2019). Entre los ejemplos que se pueden citar, se encuentra el AE de *Duguetia furfuracea* Benth. & Hook. f. (Magnoliales, Annonaceae), que demostró tener propiedades antiinflamatorias (Saldanha et al. 2019). Otro aceite con estas propiedades es el de geranio, habiéndose determinado que los responsables de esta actividad son sus componentes

mayoritarios, el linalol y el acetato de linalilo (Boukhatem et al., 2013). Este último compuesto, también presente en el AE de lavanda, le aporta sus características antiinflamatorias (Silva et al., 2015). Mogosan et al. (2017) informaron que el AE de menta produce una reducción de la concentración de prostaglandina en los tejidos afectados. En el AE de *Salvia rosmarinus* L. (Lamiales, Lamiaceae) las actividades biológicas antiinflamatorias reportadas se atribuyen a varias moléculas, principalmente monoterpenos, como 1,8-cineol, borneol, pineno, limoneno, canfeno, alcanfor y mirceno (Borges et al., 2019). Estos AE y sus compuestos activos actúan principalmente inhibiendo la liberación de histamina o reduciendo la producción de mediadores de inflamación y, por lo tanto, representan una nueva opción en el tratamiento de ciertas enfermedades (Hajimohammadi et al., 2019).

#### **1.A.5.e. Actividad anticancerígena**

El potencial terapéutico de los AE y sus componentes volátiles atrajo en los últimos años la atención de los investigadores, especialmente, por su actividad anticancerígenas (Mesquita et al., 2019). Los AE poseen propiedades anticancerígenas y actúan a través de diversos mecanismos, ya sea previniendo la formación de células tumorales o bien actuando sobre las mismas (Blowman et al., 2018). Es sabido que ciertos alimentos, como el ajo y la cúrcuma, son buenas fuentes de agentes anticancerígenos debido a la presencia de azufre, que es reconocido por su efecto preventivo contra esta patología (Pyun et al., 2006). El geraniol, componente de muchos AE, demostró poseer un efecto inhibitor del crecimiento tumoral de las células de cáncer de colon (Lee et al., 2005). Otro AE con gran potencial anticancerígeno ha sido el aceite de lavanda, que demostró inducir la apoptosis y necrosis de células tumorales (Gezici, 2018). Adnan (2019) estudió los efectos bioactivos de una planta cosmopolita como el eucalipto, hallando resultados prometedores en células que inducen el cáncer de pulmón. Estos son apenas algunos ejemplos sobre la vasta información que existe acerca de los AE como agentes anticancerígenos, pero que sirven para demostrar una vez más la utilidad de estas sustancias en el área de la salud humana.

#### 1.A.5.f. Actividad insecticida

Los insecticidas botánicos son productos naturales vivos que se utilizan para el control de diferentes insectos plaga (Jampílek et al., 2020). Los extractos de plantas y los AE son generalmente menos tóxicos, menos persistentes y podrían degradarse más rápidamente que los insecticidas sintéticos y, por lo tanto, suelen ser menos nocivos para el ambiente. Además, un gran número de insecticidas botánicos son seguros para los humanos y los organismos no blanco (Campos et al., 2016; Hikal et al., 2017; Pavela 2016). Varios estudios han demostrado que los AE pueden provocar efectos agudos (al ser aplicados como fumigantes, por contacto e ingestión) y subletales (alterando el comportamiento motor del insecto y/o la reproducción y fecundidad) (Isman, 2019). En este sentido se demostró que el AE de *Schinus molle* L. (Sapindales, Anacardiaceae) tiene efectos antialimentarios en adultos de *S. oryzae* (Benzi et al., 2009). Los AE de *Aloysia polystachya* Griseb. Moldenke (Lamiales, Verbenaceae) y *Aloysia citriodora* [Palau] (Lamiales, Verbenaceae) demostraron efectos tóxicos por contacto en *T. castaneum* (Benzi et al., 2014). Stefannazi et al. (2011) demostraron efectos tóxicos y repelentes en *Tagetes terniflora* Kunth (Asterales, Asteraceae), *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales, Poaceae) y *Elyonurus muticus* (Spreng) Kuntz (Poales, Poaceae). Los extractos de hojas de *T. vulgaris* tuvieron efectos tóxicos en huevos de *Pediculus humanus capitis* Haeckel (Anoplura: Pediculidae) (Gutiérrez, et al., 2016). Werdin González et al. (2011) trabajaron con AE de *Origanum vulgare* L. (Lamiales, Lamiaceae) y *T. vulgaris* con efectos tóxicos en *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae).

Investigaciones recientes en lepidópteros demostraron el efecto ovicida, larvicida y adulticida de los AE, además de su acción repelente y su capacidad para retrasar el desarrollo (Ali et al., 2017). Con respecto a esto, el AE de *Helosciadium nodiflorum* L. (Apiales, Apiaceae) produjo efectos tóxicos por contacto en *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) (Afshar et al., 2017). En *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera, Yponomeutidae), los aceites de *Acorus calamus* L. (Acorales, Acoraceae) y de *Cedrus deodara* (Roxb.) Don (Pinales, Pinaceae)

demonstraron tener actividad tóxica por contacto. Además, el primer aceite resultó tener efectos fagodisuasivos, mientras que el segundo, efectos repelentes (Reddy et al., 2016). Los AE de limón y ajo demostraron poseer actividad insecticida y fagodisuasiva en *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera, Noctuidae) (Ali et al., 2017). Finalmente el AE de *Siparuna guianensis* (Laurales, Siparunaceae) demostró poseer efecto ovicida y larvicida en *Anticarsia gemmatali* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) y *S. littoralis* (Lourenço et al., 2018).

### 1.A.6. Hipótesis

En referencia a los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes hipótesis:

- Los AE de *Citrus bergamia* Risso (Sapindales, Rutaceae) (Bergamota), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiales, Lamiaceae) (Lavanda), *Mentha piperita* L. (Lamiales, Lamiaceae) (Menta), *Geranium maculatum* L. (Geraniales, Geraniaceae) (Geranio), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (Poales, Poaceae) (Palmarosa) y *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtales, Myrtaceae) (Eucalipto) son mezclas complejas de terpenos
- Los AE de bergamota, lavanda, menta, geranio, palmarosa y eucalipto poseen efectos letales por exposición a superficies tratadas en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*.
- Los AE de bergamota, lavanda, menta, geranio, palmarosa y eucalipto tienen actividad insecticida por tópico en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*.

#### 1.A.7.a. Objetivo general

El objetivo general planteado para este capítulo es evaluar los efectos letales de los AE de bergamota, lavanda, menta, geranio, palmarosa y eucalipto, en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*.

#### 1.A.7.b. Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los AE de bergamota, lavanda, menta, geranio, palmarosa y eucalipto.
- Evaluar el efecto letal por exposición a superficies tratadas de los AE en larvas IV y adultos de *P. interpunctella*.
- Analizar la actividad insecticida por tópico de los AE en larvas IV y adultos de *P. interpunctella*.

## **1.B. Materiales y Métodos.**

### **1.B.1. Materiales**

Se utilizaron aceites esenciales de *Citrus bergamia* Risso (Sapindales, Rutaceae) (Bergamota), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiales, Lamiaceae) (Lavanda), *Mentha piperita* L. (Lamiales, Lamiaceae) (Menta), *Geranium maculatum* L. (Geraniales, Geraniaceae) (Geranio), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (Poales, Poaceae) (Palmarosa) y *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtales, Myrtaceae) (Eucalipto) producidos por Swiss-Just (manufacturados bajo supervisión y control de Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Suiza). El solvente fue hexano (grado analítico) Dorwill (Argentina).

### **1.B.2. Caracterización de los aceites esenciales**

La composición química de cada AE se determinó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los compuestos se identificaron por comparación de sus índices de retención (Kovats Indices) con los índices de compuestos conocidos y sus espectros de masa con los contenidos en la base de datos EM (NBS75K.L MS DATA). Los porcentajes relativos se obtuvieron directamente a partir de las áreas de cada pico. El análisis de CG-EM se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5972A equipado con una columna capilar (HP-5, 25 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness), utilizando helio como gas carrier (1ml/min, split 1:50) y un volumen de inyección de 2 µl. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 50 °C durante 2 minutos, luego se programó a 5 °C/min hasta 200 °C, manteniendo luego esta temperatura por 15 min. Los espectros de masa se registraron a 70 eV, en un rango de masas m/z de 35 a 350 uma, manteniendo la temperatura del inyector a 280 °C.

### **1.B.3. Insectos**

Las colonias de *P. interpunctella* (sin previa exposición a ningún insecticida) se mantuvieron en el laboratorio de Zoología de Invertebrados II, UNS. La cría se desarrolló en

contenedores plásticos (13 cm diámetro × 30 cm alto) cubiertos por una tela de malla fina para permitir la ventilación. Cada recipiente contenía una mezcla de harina de maíz, harina de trigo, cereales, leche en polvo, levadura en polvo, miel y glicerina (8:4:2:2:1:1:1 p/p). Cada nueva colonia fue obtenida a partir de adultos de 1 o 2 días que se colocaban en un nuevo recipiente con dieta. Este procedimiento se realizó una vez por semana. Las colonias se mantuvieron en una atmósfera controlada de  $27 \pm 1$  °C, 45-50% HR y un fotoperiodo luz/oscuridad de 16:8 h.

En los ensayos biológicos, se utilizaron larvas del IV estadio de *P. interpunctella*. Para su selección, en primer lugar, se diferenciaron las larvas masculinas en base a la “marca sexual” distinguible en el extremo abdominal (Richards y Thomson, 1932) (Lámina 1.4) Posteriormente, se midió la longitud corporal y el ancho de la capsula cefálica y se usaron estas variables para seleccionar a las larvas femeninas de este estadio.

**Lámina 1.4.** Larva masculina del IV estadio, donde se observa la marca sexual en los últimos segmentos abdominales



#### **1.B.4. Bioensayos**

Con el objetivo de determinar cuáles serían los AE con mayor actividad insecticida y considerar a estos como posibles candidatos para su posterior nanoformulación, se decidió realizar dos tipos de ensayos preliminares en larvas IV y adultos de 1 o 2 días de edad de *P. interpunctella*, sin distinción de sexo.

##### **1.B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas**

Para este bioensayo se utilizaron frascos de vidrio de 23 ml (1,6 cm de diámetro x 11 cm de alto) y papeles de filtro (56 cm<sup>2</sup>) que se trataron con 1 ml de las soluciones hexánicas de los AE.



Para el caso del control, se empleó solamente solvente puro. Sobre la base de ensayos preliminares, se determinó un rango de concentraciones que fueron desde 5 a 600  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Luego de la evaporación del solvente, los papeles de filtro se introdujeron en cada frasco y se adicionaron seis larvas o seis adultos de *P. interpunctella*, que se cubrieron con tela de voile. Se realizaron cinco réplicas independientes y los insectos se mantuvieron a  $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16:8 h L:O. La mortalidad de los adultos se determinó a las 24 h de exposición, mientras que la de las larvas a las 72 h. Los tiempos de exposición se determinaron teniendo en cuenta los resultados de ensayos preliminares. Para el caso de los adultos, luego de las 48 h se observaron porcentajes de mortalidad mayores al 40% en los controles. En el caso de las larvas, no se registro mortalidad en los controles a las 72 h. Con estos datos se determinaron los valores de la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  (concentraciones necesarias para matar al 50% o 90% de la población, respectivamente). Los adultos se consideraron muertos cuando no se observaron movimientos abdominales ni de apéndices (patas, alas y antenas). En el caso de las larvas, cuando no se observó movimiento alguno, se consideraron muertas.

Los valores de dosis letal se calcularon con sus respectivos intervalos de confianza del 95% empleando el software estadístico SPSS 25.0. Estos valores se consideraron significativamente distintos si no se superponían los intervalos de confianza.

#### **1.B.4.b. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica de los AE**

En este ensayo se aplicaron alícuotas de 0,2  $\mu\text{l}$  de las soluciones acetónicas de los AE por vía tópica a 10 larvas del IV estadio o 10 adultos de *P. interpunctella*. Las dosis que se probaron para cada aceite fueron 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g insecto}^{-1}$  (obtenidas de ensayos previos). La acetona se aplicó tópicamente como control. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y los insectos se mantuvieron a  $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR y 16:8 h L:O. A las 24 h se calculó el porcentaje de mortalidad de los adultos y a las 72 h, el de las larvas.

## 1.C. Resultados

### 1.C.1. Caracterización de los aceites esenciales

Los componentes determinados por CG-EM para cada AE y sus porcentajes relativos se muestran en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Composición química de los AEs y contenido porcentual de cada componente.

TR (min)	Componentes	bergamota	geranio	menta	palmarosa	lavanda	eucalipto
7,16	$\alpha$ – pineno			1,92			0,62
8,36	$\beta$ – pineno	2,38		1,85			0,26
8,77	$\beta$ – mirceno					0,77	0,40
9,15	$\alpha$ -felandreno						0,55
9,75	p-cimeno					0,45	6,70
9,87	limoneno	17,49		3,36			
9,93	1,8 - cineol (eucaliptol)			5,88		2,70	87,97
10,13	$\beta$ – trans- ocimeno					3,37	
10,43	$\beta$ – cis- ocimeno					2,89	
10,59	3 – careno	4,77					
10,76	$\gamma$ – terpineno						3,50
13,06	Linalool	9,46	12,67		2,55	40,72	
13,28	alcanfor					1,37	
13,55	isomentona			16,90			
13,85	mentona		11,14				
14,10	mentol			52,51			
14,35	p-menten-3-ona			10,43			
14,23	terpinen-4-ol					1,70	
16,14	citronelol		26,14		9,94		
16,48	geraniol		23,19		77,07		
16,57	acetato de linalilo	58,27			4,55		
16,84	geranial						
16,98	formiato de citronelilo		10,37				
17,38	acetato de lavandulino					5,30	
17,70	formiato de geranilo		7,94				
18,04	acetato de mentol				7.15		
20,85	acetato de geranilo		2,01			2,80	
20,86	cariofileno	7,63	2,58		5,86	25,59	
22,71	$\beta$ – farneseno					6,37	
23,18	$\gamma$ – cadineno					1,39	
23,70	acetato de nerilo		2,98			1,44	
24,84	óxido de cariofileno					3,14	

El análisis químico reveló que en el AE de bergamota los componentes principales fueron acetato de linalilo y limoneno, y en el AE de geranio fueron citronelol, geraniol, linalool, mentona y formiato de citronelilo. Por otra parte, el AE de menta presentó como componentes mayoritarios mentol, isomentona y p-menten-3-ona, mientras que el AE de palmarosa tuvo como compuesto principal al geraniol. En el aceite de lavanda se encontraron como compuestos mayoritarios al linalool y al cariofileno. Por último, el AE de eucalipto presentó 1,8-cineol como componente mayoritario.

### **1.C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas**

Para los bioensayos con larvas IV, los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  no pudieron ser calculados, debido a que incluso a la máxima dosis, la mortalidad no fue significativa para ninguno de los AE en estudio.

En adultos de *P. interpunctella*, los AE de bergamota, lavanda, menta, geranio y palmarosa produjeron valores de  $CL_{50}$  en un rango entre 22,8 y 116,2  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , encontrándose diferencias significativas entre todos ellos (Tabla 1.2). El aceite de eucalipto no produjo mortalidad incluso a dosis máximas, por lo cual su valor de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  no fue calculado. El orden de toxicidad basado en los valores de  $CL_{50}$  fue palmarosa > geranio > menta > lavanda > bergamota > eucalipto. Los aceites mostraron valores de  $CL_{90}$  en un rango entre 44,3 y 188,7  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . No se observó mortalidad en los controles.

**Tabla 1.2.** Valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> para los distintos AE en adultos *P. interpunctella* expuestos a superficies tratadas.

AE	CL <sub>50</sub> (µg cm <sup>-2</sup> ) <sup>a,b</sup>	CL <sub>90</sub> (µg cm <sup>-2</sup> ) <sup>a,b</sup>
<b>Bergamota</b>	116,2 (100,8 – 134,1) <b>e</b>	188,7 (164,7–229,1) <b>d</b>
<b>Geranio</b>	37,2 (28,8 – 46,3) <b>b</b>	63,7 (52,2 – 73,4) <b>ab</b>
<b>Menta</b>	53,8 (47,4 – 60,3) <b>c</b>	77,5 (69,9 – 90,5) <b>b</b>
<b>Palmarosa</b>	22,8 (18,0 – 27,4) <b>a</b>	44,3 (37,1 – 57,5) <b>a</b>
<b>Lavanda</b>	76,3 (65,5 – 87,7) <b>d</b>	129,2 (113,4 – 145,6) <b>c</b>
<b>Eucalipto</b>	No calculado	

<sup>a</sup> Los valores de CL<sub>50</sub> seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna presentan diferencias significativas (P < 0,05).

<sup>b</sup> Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre paréntesis.

### 1.C.3. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica de los AE

En adultos de *P. interpunctella*, la aplicación tópica de los aceites generó porcentajes de mortalidad variables y con mucha dispersión a todas las dosis ensayadas, e incluso en el control.

En cuanto al ensayo por tópico en larvas, se observó que a las mayores dosis (40 y 80 µg larva<sup>-1</sup>) la mortalidad de cualquiera de los AE no superó el 20%. A las dosis de 10 y 20 µg larva<sup>-1</sup> no se observó mortalidad.

## 1.D. Discusión

El análisis químico de los AE reveló que son mezclas de diferentes terpenos. La bioactividad de un AE está en relación a su diversidad y redundancia química; esto es, los AEs son mezclas diversas dado que contienen diferentes compuestos químicos (monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, etc.) y son redundantes debido a que generalmente contienen análogos químicos de una misma clase (Regnault-Roger et al. 2012). De esta manera, es común que se observen fenómenos de sinergismo en la actividad biológica de un AE. Se ha propuesto que los efectos insecticidas están relacionados con los componentes principales de un AE, aunque los otros compuestos pueden contribuir a dicha actividad (Pavela, 2015). La composición de un AE puede variar, incluso dentro de la misma especie, en función del órgano vegetal utilizado para la extracción, el tiempo de colección, el estado de desarrollo y las condiciones ambientales en general (Zapata y Smagghe, 2010). Debido a ello se hace necesario determinar el perfil químico del AE a utilizar dado que las variaciones tanto cuantitativas como cualitativas pueden afectar la actividad insecticida de los mismos (Athnassiou et al., 2014).

Los AE de los géneros *Mentha* (Lamiales, Lamiaceae), *Lavandula* (Lamiales, Lamiaceae) o *Pinus* (Pinales, Pinaceae) se destacaron por su toxicidad en *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera, Aphididae), *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera, Aleyrodidae) y *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae), así como también en *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) y en *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae) (Behi et al., 2017; Benelli et al., 2017; Hanan, 2013; Mozaffari, et al., 2013; Ortiz de Elguea-Culebras et al., 2018). Otros insectos como *S. zeamais*, *T. castaneum* y *C. maculatus* fueron sensibles a las aplicaciones por contacto de los AE de cítricos (Sapindales, Rutaceae) (Bilal et al., 2015; de Andrade Dutra et al., 2016; Fouad y Camara et al., 2017). *Pediculus capitis* De Geer (Anoplura, Pediculidae), *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae), *Cimex lectularius* L. (Hemiptera, Cimicidae) y *Blattella germanica* L. (Blattodea, Blattellidae) fueron afectados por el aceite de *Eucalyptus* sp. (Myrtales,

Myrtaceae), el cual mostró efectos ovicidas, larvicidas y tóxicos en adultos (Machado et al., 2019; Manh et al., 2020; Soonwera et al., 2018; Yeom et al., 2013).

Al evaluar la toxicidad por exposición a superficies tratadas en adultos de *P. interpunctella*, se observó que los AE más tóxicos fueron los provenientes de palmarosa, geranio y menta, seguido de lavanda, bergamota y eucalipto. En trabajos previos se informó que los AE usados en este estudio mostraron actividad tóxica por contacto en insectos plaga de productos almacenados. Por ejemplo, los AE de bergamota y geranio produjeron toxicidad por contacto en adultos de *T. castaneum* y *R. dominica* (Werdin-González et al., 2014) y el AE de palmarosa tuvo efectos insecticidas por contacto en la cucaracha alemana (Yeguerman et al., 2020). Además, el AE de eucalipto mostró actividad insecticida por contacto en *A. obtectus* y *S. cerealella* (Bett et al. 2017). Por otra parte, el AE de lavanda demostró poseer efectos tóxicos en *Orgyia trigotephras* Boisduval (Lepidoptera, Lymantriidae) (Badreddine et al., 2015). Finalmente el AE de menta mostró actividad insecticida en *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) (Boulamtat et al., 2020).

La toxicidad por exposición a superficies tratadas depende de varios factores entre los que figuran la hidrofobia de los productos y la tasa de difusión a través de la cutícula. Por difusión horizontal, los compuestos pueden alcanzar el sistema traqueal desde donde se distribuyen al resto del cuerpo; mientras que por difusión vertical, estas sustancias pueden cruzar desde el tegumento hasta la epidermis alcanzando la hemolinfa y distribuyéndose por todo el organismo (Tarelli et al., 2009).

Como se mencionó, el AE de palmarosa fue el que mostró mayor actividad insecticida seguido del aceite de geranio y el de menta. Los demás aceites mostraron menor o nula toxicidad (eucalipto). Estos resultados podrían ser explicados en parte, debido a la composición de los AE. Zahran y Abdelgaleil (2011) estudiaron 12 compuestos principales de diferentes AE por contacto en larvas de *Culex pipiens* L. (Diptera, Culicidae). En este trabajo, los

autores demostraron que el componente más tóxico fue el geraniol, seguido del mentol, mientras que el linalool y el 1,8-cineol no mostraron efectos tóxicos. Resultados similares se obtuvieron en *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae) en donde el geraniol fue uno de los componentes más tóxicos, mientras que el 1,8-cineol fue el menos tóxico (Borrero-Landazabal et al., 2020). En base a estos resultados se podría explicar el orden de toxicidad de los AE en este estudio. Así el aceite de palmarosa fue el más tóxico debido probablemente a la presencia de un 77% de geraniol. En orden de toxicidad le siguieron el AE de geranio (con un menor contenido de geraniol) y el AE de menta (constituido principalmente por mentol). Los aceites de lavanda y eucalipto mostraron menor toxicidad que los anteriores. Esto podría deberse a que presentan como componentes mayoritarios al linalool y al 1-8 cineol, respectivamente. El 1,8-cineol es reconocido como un efectivo compuesto fumigante, no así al actuar por contacto; esto podría explicar la nula actividad tóxica por contacto observada con el AE de eucalipto (Kumar, 2013). El AE de bergamota se encontró entre los aceites que tuvieron menor actividad tóxica. Como se mencionó, este aceite es rico en acetato de linalilo. Sfar et al. (2009) demostraron que este monoterpeno posee baja toxicidad en ninfas de *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera, Reduviidae).

Por otra parte, la aplicación tópica de los AE en adultos de *P. interpunctella* fue poco práctica mostrando mucha variabilidad entre los resultados. Probablemente la razón principal se deba a la fragilidad del cuerpo de los adultos y a que estos están cubiertos de escamas lo que afectaría la penetrabilidad de los aceites. Tomando en consideración estas observaciones, se decidió no utilizar esta técnica en futuros ensayos para evaluar la toxicidad en adultos de *P. interpunctella*.

Para el caso de las larvas IV de *P. interpunctella*, en ambos bioensayos se observó nula o baja mortalidad incluso a las máximas concentraciones. En muchos insectos los estadios larvales suelen ser más tolerantes que los adultos a los efectos tóxicos de distintos productos insecticidas. Por ejemplo, la toxicidad del disulfuro de di-n-propilo, que proviene de semillas de

neem, fue mucho menor en las larvas de *T. castaneum* que en los adultos (Rajendran y Sriranjini, 2008). Este mismo efecto, fue observado en este insecto empleando los AE de *Achillea biebersteinii* Afan, *A. santolina* L. y *A. millefolium* L. (Asterales, Asteraceae) (Nenaah, 2014). Por otra parte los AE de *Athmanta haynaldii* Borb. (Apiales, Apiaceae) y *Myristica fragrans* Houtt. (Magnoliales, Myristicaceae) mostraron moderada o nula actividad insecticida en larvas de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) (Kostić et al., 2013). Estas variaciones en la susceptibilidad de la respuesta de las larvas frente a los AE podrían atribuirse a que durante el estado larval, los organismos presentan altos contenidos de lípidos en sus cuerpos grasos. Al aplicar un compuesto lipofílico por contacto, como los AE, este tejido podría captar los principios activos, disminuyendo su concentración en la hemolinfa y por ende, en los sitios de acción (Stefanazzi et al., 2011).

Como consecuencia de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo (principalmente en el bioensayo por exposición a superficies tratadas en adultos de *P. interpunctella*), se procedió a seleccionar a los AE de palmarosa, geranio y menta como productos bioinsecticidas para su posterior nanoformulación.



### 1.E. Conclusiones

- ✓ Los AE de palmarosa, geranio y menta presentaron mayor actividad insecticida por exposición a superficies tratadas en adultos de *P. interpunctella*.
- ✓ Los AE no tuvieron efectos letales por exposición a superficies tratadas en larvas del IV estadio de *P. interpunctella*.
- ✓ La aplicación tópica de todos los AE en adultos de *P. interpunctella* presentó resultados heterogéneos.
- ✓ A las máximas dosis, los AE no mostraron actividad insecticida significativa al ser aplicados por tópico en larvas del IV estadio de *P. interpunctella*.

En base a estas conclusiones se decidió elaborar con los AE de palmarosa, geranio y menta, nanopartículas poliméricas y nanoformulaciones acuosas a fin de evaluar su bioactividad en *P. interpunctella*.

## 2. El Camino: Nanopartículas Poliméricas

---

### 2.A. Introducción.

En el Sistema Internacional de Unidades, el nanómetro (nm) es una unidad que representa  $10^{-9}$  m. El término "nano" deriva de la palabra griega *vávo* ("enano") (Vunain et al., 2016) y en relación con este prefijo, resulta interesante definir ciertos términos que serán utilizados a lo largo de esta tesis. Para ello, se extrajeron sus definiciones del "*British Standards Institution*" (2017):

**Nanoescala:** es un rango de tamaño que oscila entre 1 y 1000 nm.

**Nanociencia:** es el estudio de la materia que se encuentra a una escala nanométrica. Se ocupa de comprender el tamaño y las propiedades dependientes de la estructura a esta escala.

**Nanotecnología:** es la manipulación y el control de la materia en la dimensión nano, mediante el uso del conocimiento científico y de diversas aplicaciones industriales y biomédicas.

**Nanomaterial (NM):** material con estructuras en el rango nanométrico.

**Nanofibras:** es un nanomaterial en el cual 2 de sus 3 dimensiones pertenecen a la nanoescala, mientras que la restante es mucho mayor.

**Nanopartículas (NP):** se define como un material cuyas 3 dimensiones se encuentran en el rango nanométrico.

**Nanoinsecticida:** es toda aquella sustancia con actividad insecticida y que, a su vez, se encuentra presente a escala nanométrica (Murugan et al., 2016)

**Nanobioinsecticidas:** son una subclase de nanoinsecticidas que derivan de organismos vivos, materiales naturales o metabolitos. Generalmente presentan nula o leve toxicidad para organismos no blanco, en comparación con los insecticidas químicos. Estas formulaciones se encuentran a escala nanométrica y están basadas en la actividad de un producto de origen natural con acción insecticida (Nuruzzaman et al., 2019)

### **2.A.1. La llegada de la nanotecnología.**

La humanidad ha utilizado los NM desde la antigüedad; por ejemplo, hace más de 4500 años las matrices de cerámica se reforzaban con la inclusión de nanofibras de asbesto natural (Heiligtag y Niederberger, 2013). Hacia el año 2000 a.C, en el Extremo Oriente, se diseñaron los procedimientos para la elaboración de la tinta china. Esta técnica ancestral empleó la nanotecnología de forma extensiva, ya que con diversas variantes, la tinta china, se conseguía mezclando agua con hollín obtenido de la cocción de las ramas de los árboles y aglutinando la mezcla con gelatina, para fijar el pigmento. Hoy en día definiríamos entonces a la tinta china como una dispersión coloidal de nanopartículas de carbono (pigmento negro) en agua (Wang et al., 2018). Por esa misma época, los antiguos egipcios usaron NP de galeno que poseen un diámetro de 5 nm para producir un tipo de tinte capilar (Walter et al., 2006). Años después, alrededor del siglo III a.C., el pigmento "azul egipcio" se preparó utilizando una mezcla de vidrio y cuarzo de tamaño nanométrico. El uso de este tinte, con fines decorativos, se extendió en el Imperio Romano, en Egipto, en la Mesopotamia y en Grecia (Johnson-McDaniel et al., 2013).

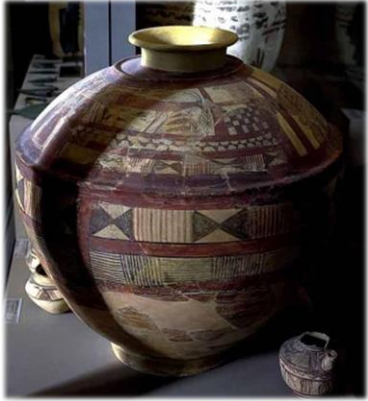
La síntesis de NP metálicas mediante métodos químicos data de los siglos XIV y XIII a.C., cuando los egipcios y mesopotámicos comenzaron a producir vidrios utilizando metales. Este hito puede ser considerado como el comienzo de la era de las NP metálicas (Schaming y Remita 2015). Sin embargo, Artioli et al. (2008) plantearon que tal era comenzó con la aparición de vidrios rojos coloreados por el uso de NP de Cu hacia finales de la edad de Bronce. Esta técnica, años después (400-1000 d.C), fue empleada por los Celtas en los esmaltes rojos usados en sus pinturas. Estudios recientes detectaron que las copas romanas del siglo IV, conocidas como Copas de Licurgo, estaban realizadas con un vidrio dicróico que mostraba diferentes colores: rojo cuando una luz pasaba por detrás, y verde cuando la luz era proyectada desde el frente. Según estos estudios, tales copas contenían NP de aleaciones de Ag-Au (relación 7:3) de unos 50 nm de diámetro (Leonhardt, 2007). Más adelante en la línea de

tiempo, los investigadores determinaron que los vidrios encontrados en las iglesias de la época medieval que constituían los bellos vitrales y rosetones fueron fabricados mediante la incorporación de NP de Au y Ag (Schaming y Remita, 2015). Es durante el siglo IX que los mesopotámicos comenzaron a utilizar cerámicas esmaltadas con decoraciones que requerían un brillo metálico. Estas decoraciones poseían sorprendentes propiedades ópticas debido a la existencia de distintas NP de Ag y Cu aisladas dentro de las capas de esmalte. (Sciau et al., 2012).

Los avances en física y química en la segunda mitad del siglo XIX y las primeras décadas del siglo XX demostraron que existía un mundo nanoscópico estableciendo de esta manera cierto conocimiento de las magnitudes moleculares y atómicas y de los procesos que tienen lugar a esta escala. En 1857, mientras trabajaba con soluciones de NP de oro, Michael Faraday descubrió que frente a distintas condiciones de iluminación las mismas podían generar distintos colores como consecuencia de las diferentes nanoestructuras del metal (Jeevanandam et al., 2018). El campo de la nanoescala se benefició ampliamente de la aparición del microscopio de emisión de campo diseñado en 1936 por Erwin Müller con el cual se obtuvieron las primeras imágenes de NM (Drechsler, 1978). Aunque muchos de estos hitos tienen su protagonismo y efecto en la nanoescala, se considera que la historia moderna de la nanotecnología comienza en 1959, cuando el físico estadounidense Richard Feynman, en un discurso en la Sociedad Estadounidense de Física celebrado en el Instituto Tecnológico de California, estableció la idea inspiradora de la nanotecnología. En dicho discurso preguntó: “¿Por qué no manipular la materia átomo a átomo?” y de esta manera presentó sus ideas. Por este motivo, se reconoce a Feynman como padre conceptual de la nanotecnología aunque no hiciera aportes concretos en el campo (Fanfair et al., 2007). Más aún, hubo que esperar hasta 1979 para encontrar el primer hito puramente nanotecnológico: la primera evidencia de la obtención de nanotubos de carbono, por parte de investigadores de Nueva Zelanda (Hirlekar et al., 2009). Finalmente, ya entrados los años 2000, empresas como Mercedes Benz o

Samsung empezaron a implementar NP metálicas para sus dispositivos electrónicos. En 2012, se incorporaron NP de  $\text{TiO}_2$  en celdas solares para aumentar su capacidad. Para 2014, había alrededor de 1814 productos nanotecnológicos a disposición del mercado de consumo (Jeevanandam et al., 2018).

## Lámina 2.1. Nanomateriales en la Edad Antigua y la Edad Media



Cerámica Sumeria (4.500 A.C.)



Tinta China (4.000 A.C.)



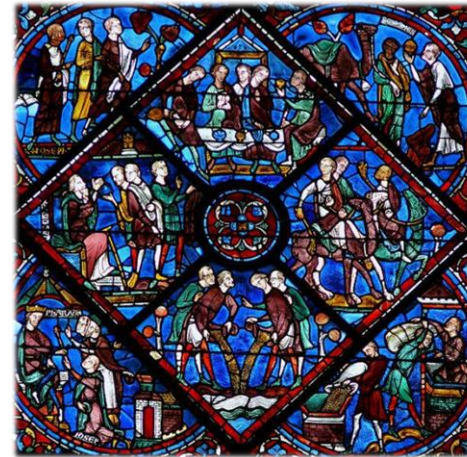
Azul Egipcio (4.000 A.C.)



Esmalte Rojo Celta (400-1000 D.C.)



Copas de Licurgo (Siglo IV)



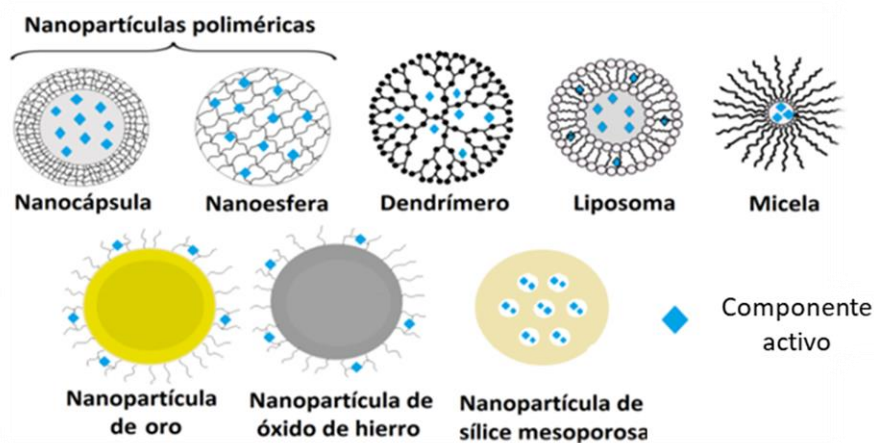
Vitral Medieval

## 2.A.2. Nanopartículas: definición y variedad

En la actualidad, las NP son un área de investigación activa y uno de los sectores económicos que se encuentra en plena expansión con múltiples campos de aplicación. Debido a sus características fisicoquímicas adaptables, como el punto de fusión, la conductividad eléctrica y térmica, la actividad catalítica, la absorción y dispersión de luz, las NP han ganado mayor importancia como nuevos avances tecnológicos (Jeevanandam et al., 2018).

Las NP son materiales que poseen sus tres dimensiones en el rango nanométrico. Muchas de ellas son utilizadas como nanoportadores, en las cuales un componente activo se haya disuelto, atrapado, encapsulado o unido a una matriz de NM. Atendiendo a su composición, este tipo de NP pueden clasificarse en orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas), inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa) o híbridas (cuando se combinan los dos tipos) (Shahzad y Manzoor, 2019).

Lámina 2.2: Variedad de nanomateriales



El término dendrímero deriva de las palabras griegas “*dendron*” (árbol) y “*meros*” (parte), y se refiere al aspecto característico que estas estructuras toman asemejándose a cristales de hielo, estrellas de Navidad o copas de los árboles. Específicamente se definen como polímeros esféricos ramificados de geometría fractal (Vögtle, 2000). Los dendrímeros consisten en tres componentes unidos covalentemente: un núcleo interior, células ramificadas interiores

(compuestos de unidades repetitivas) y células ramificadas exteriores (Vunain et al., 2016). Las propiedades únicas que exhiben estos materiales permiten que tengan un amplio campo de aplicación: tratamiento del agua (Wang et al., 2015), terapia génica (Wang et al., 2010) catalizadores (Karakhanov et al., 2015) aplicaciones electrónicas y sensores químicos (Satheeshkumar et al., 2015), y sistemas de administración de fármacos (Jędrych et al., 2014).

El nombre liposoma deriva de dos palabras griegas: "*lipos*" que significa grasa y "*soma*" que significa cuerpo. Los liposomas son compartimientos esféricos cerrados por una doble capa de fosfolípidos (que contribuye con la biocompatibilidad) que envuelven a un líquido. Además, contienen colesterol, que brinda estabilidad. Es por estos motivos que se suele definir vulgarmente a los liposomas como "membranas celulares sin ornamentaciones" (Haghiralsadata et al., 2017). Hay varias ventajas para su aplicación en el campo de la medicina, como son la facilidad de síntesis, la alta biocompatibilidad y la similitud con las membranas biológicas. Esto permite que sean utilizados como sistemas para la liberación de sustancias y como adyuvantes en la elaboración de vacunas (Rideau et al., 2018) o incluso en innovadores tratamientos contra el cáncer (Riaz et al., 2018).

En general, las micelas son partículas coloidales formadas por detergentes y jabones. El principio de ensamblaje en la formación de micelas es la hidrofobia de las moléculas anfifílicas en el agua generando agregados coloidales. Las micelas se caracterizan por una arquitectura *core-shell*; esto significa que el núcleo interno está compuesto por las regiones hidrofóbicas, que contiene el principio activo, mientras que el exterior es una corona compuesta de los bloques hidrofílicos (Enrico, 2018). Por sus propiedades las micelas han sido aplicadas principalmente en la industria farmacéutica y en la medicina. A su vez, mostraron un futuro prometedor en terapias génicas con ADN y en el tratamiento de tumores (Cabral et al., 2018).

Las NP metálicas están compuestas por metales nobles como oro, plata, platino, paladio, entre otros. Estas NP se han utilizado ampliamente en diversas áreas, como la electrónica, la



cosmética, los recubrimientos, el embalaje, la biotecnología y la salud humana (Mittal et al., 2013). Por ejemplo, debido a que las NP pueden alcanzar fácilmente cualquier órgano blanco, muestran un gran potencial para ser aplicadas en nuevas terapias biomédicas. Otro ejemplo interesante de la aplicación de las nanopartículas metálicas es su uso para elaborar sensores electroquímicos y biosensores (Mittal et al., 2018).

La sílice ( $\text{SiO}_2$ ) es un sólido inorgánico que se organiza en forma de una red tridimensional, dando origen a una estructura porosa (poros con diámetros entre 2 y 50 nm). Entre los NM inorgánicos, los materiales de sílice han sido estudiados intensamente debido a sus características sobresalientes, la disponibilidad del material y su método de síntesis. Además, presentan un gran potencial para su aplicación en procesos biológicos y biomédicas (Vázquez et al., 2017). Las NP de sílice se pueden usar en campos muy diversos ya sea para el transporte de medicamentos terapéuticos o de productos activos, o bien para la remoción de metales pesados (Vunain et al., 2016).

Las NP poliméricas, que serán el objeto de estudio de este capítulo, pueden dar origen a nanocápsulas o nanoesferas según el método de preparación utilizado. Las nanocápsulas son sistemas en los que el principio activo se limita a una cavidad interior rodeada por una capa del polímero, mientras que las nanoesferas son sistemas en los que el principio activo se dispersa uniformemente en la matriz polimérica (Mohanraj y Chen, 2006).

Las NP poliméricas se pueden elaborar a partir de la polimerización directa de los monómeros o mediante polímeros preformados. En el primer caso, se encuentran los métodos de polimerización mediados por emulsiones o microemulsiones y la polimerización interfacial. En el segundo, los métodos más comunes para la obtención de NP poliméricas son: la nanoprecipitación, la diálisis, las tecnologías que emplean fluidos supercríticos y el método de fusión-dispersión. La elección del método de preparación de las NP se realiza teniendo en cuenta una serie de factores, como el tipo de polímero empleado en la elaboración del

nanosistema, el área de aplicación, el tamaño de partícula requerido, etc. Por ejemplo, un sistema polimérico desarrollado para una aplicación en el campo biomédico no debe contener trazas de disolventes orgánicos (Rao y Geckeler, 2011).

La polimerización mediada por emulsiones comienza con la formación de una emulsión que contiene los monómeros, el principio activo y el agente tensioactivo en un medio acuoso (Muñoz-Bonilla et al. 2010). Luego, a esta mezcla, se agrega un iniciador que permite que los monómeros polimericen rápidamente y se forme una NP polimérica. Esta operación se repite hasta agotar las cantidades de monómero e iniciador (Zhang et al., 2019). La polimerización mediada por microemulsiones se basa en la misma metodología pero partiendo de una microemulsión. Este método asegura la obtención de NP de menor tamaño que el método anteriormente citado. Esta técnica puede ser aplicada para la obtención de fármacos, adhesivos, lubricantes y para el recubrimiento de superficies, entre otros (Yong y Gan, 2005).

El método de polimerización interfacial utiliza las ventajas de ciertos polímeros que tienen una rápida velocidad de polimerización. En este método, primero se emulsiona una fase orgánica, que contiene el principio activo y un monómero hidrofóbico, en una fase acuosa. A continuación se agrega un segundo monómero soluble en agua, produciéndose una reacción rápida entre ambos monómeros en la interfaz de las gotitas de la emulsión, formando de esta manera la cubierta del polímero que encapsula al ingrediente activo. Esta técnica tiene una alta eficiencia en la encapsulación de fármacos, tales como insulina, calcitonina, indometacina, etc. (Llabot et al., 2008).

Dentro de los métodos de obtención de NP a partir de polímeros preformados se encuentra la nanoprecipitación. Consiste en la formación de una emulsión a partir de una fase acuosa que contiene un agente emulsionante y una fase orgánica con el principio activo y el polímero que formará la matriz. Una vez formada la emulsión, se induce la evaporación del solvente orgánico, que suele ser altamente volátil. De esta manera, el polímero precipita,

encapsulando los principios activos hidrófobos y da origen a las NP. Esta metodología es utilizada habitualmente para la obtención de fármacos (Gomes et al., 2011). Los polímeros de uso más común para esta técnica son biodegradables, especialmente poli-caprolactona, polilactida y poli-lactida-co-glicólido (Mishra et al., 2010).

En el método de precipitación por diálisis, se disuelve un polímero junto con el componente activo que se desea encapsular. La solución resultante, con la fase orgánica, se carga posteriormente en una membrana de diálisis. Después de esto, la membrana de diálisis se pone en contacto con una fase acuosa y el disolvente orgánico (miscible en agua) difunde fuera de la membrana, lo que lleva a la precipitación y separación de las moléculas de polímero del disolvente. De esta manera, el polímero y el componente activo se reúnen y ensamblan formando NP esféricas. Esta técnica se suele usar principalmente para la incorporación de fármacos en NP (Jeong et al., 2001; Zhang et al., 2012).

Recientemente se ha explorado el uso de los fluidos supercríticos como un método limpio y efectivo para la nanoencapsulación de diferentes compuestos. El CO<sub>2</sub> en estado supercrítico presenta una gran versatilidad; de esta manera puede ser usado como disolvente para la síntesis, modificación o purificación de polímeros sintéticos o naturales. En el proceso RESS (*rapid expansion of supercritical solution*), el principio activo y el polímero se disuelven en el fluido supercrítico (ej: CO<sub>2</sub>), luego este se despresuriza rápidamente a través de una boquilla de aspersión dentro de una cámara de precipitación generando las NP (Fattahi et al., 2016).

En los últimos años se ha trabajado intensamente en la obtención de NP poliméricas basadas en AE con el objetivo de aplicar estos productos en distintas áreas como la medicina, la agroindustria, la industria alimenticia y el manejo de insectos plaga. Sin embargo, aún se discute sobre el método más adecuado en la elaboración de esta clase de NP. Los métodos más comunes para la preparación de NP cargadas con AE (polimerización mediada por emulsión, nanoprecipitación o polimerización interfacial) son complejos y requieren mucho

tiempo. Además, algunos de ellos requieren altas temperaturas (más de 100 °C) durante el proceso de preparación, lo que puede provocar la pérdida del AE. Por lo tanto, se necesita una metodología adecuada y económicamente factible para abordar el problema de la elaboración de estas NP. Con respecto a esto, el método de fusión-dispersión es un procedimiento de preparación simple y rápida, siendo una buena alternativa para la elaboración de NP cargadas con AE (Kumar et al. 2014). Esta técnica consiste en la fusión de un polímero, generalmente bajo agitación magnética, a una determinada temperatura. Una vez fundido el polímero se procede a la incorporación del componente activo que se desea encapsular. Posteriormente la temperatura de la mezcla se reduce rápidamente con el objetivo de formar las NP de manera espontánea. Este proceso continúa con la molienda y el tamizado de la mezcla para finalmente ser almacenadas o utilizadas (Yang et al., 2009).

### **2.A.3. Campos de aplicación de las nanopartículas.**

El campo de las nanopartículas poliméricas se expandió rápidamente en este último tiempo. Es así que estas NP desempeñan un papel fundamental en un amplio espectro de áreas, que van desde la electrónica hasta la fotónica, la elaboración de materiales para sensores, la biotecnología para la medicina y el desarrollo de materiales para mitigar la contaminación y proteger el ambiente (Rao, 2011).

Ante la necesidad de abastecer de alimentos a la creciente población mundial, las tecnologías aplicadas en la agricultura, los pesticidas y especialmente los insecticidas, juegan un rol crucial en la mejora de la productividad de los cultivos (Singh et al., 2020). En el área de los insecticidas, específicamente de los bioinsecticidas, las empresas y los grupos de investigación que trabajan con estas tecnologías han focalizado sus esfuerzos en diseñar productos con mayor bioactividad y menor impacto en el ambiente (Woranuch y Yoksan et al., 2013). En este marco, en los últimos años se han incrementado las investigaciones relacionadas con el uso de la nanotecnología como una herramienta indispensable para

elaborar nuevas formulaciones para el manejo de insectos plaga (Hu et al., 2015). Más aún, el desarrollo de los llamados “procesos verdes” para la síntesis de nanopartículas y nanoformulados se convirtió en una rama muy importante dentro de la nanotecnología (Safaepour et al., 2009). La aplicación de estos procesos en la agricultura y en el control de insectos enfatiza los objetivos del desarrollo de NM limpios, seguros y ecológicos utilizando solventes biocompatibles y no tóxicos, así como matrices naturales y biodegradables. Estos materiales deben elaborarse mediante procesos sostenibles que sean a su vez energéticamente eficientes (Pascoli et al., 2019). La encapsulación de componentes activos representa un abordaje factible y eficaz para controlar la liberación de los productos, incrementado la estabilidad fisicoquímica de la sustancia activa y protegiéndola de los agentes ambientales. De esta manera se logra reducir la volatilidad y su toxicidad para organismos no blanco, incrementar la bioactividad y mejorar la biodisponibilidad del producto (Bilia et al., 2014).

La aplicación de las NP en el control de los insectos plaga es considerada un campo del conocimiento novedoso por sus implicancias tanto académicas como socioproductivas. Da cuenta de ello el número creciente de publicaciones en esta área. Así que al realizar una búsqueda bibliográfica en Scopus centrada en los últimos 10 años y con los motores de búsqueda “*nanoparticles*” + “*insect pest*” se hallaron 149 coincidencias. Es de destacar que la mayoría de estos trabajos se concentran a partir del año 2016, (más de 15 artículos por año) e incluso el mayor número se encuentra en el año 2018 con 30 artículos. Sin embargo, estos números siguen siendo insignificantes en comparación con los 972 resultados encontrados con los motores “*essential oil*” + “*insect pest*”, los 2246 resultados con “*pheromone*” + “*insect pest*” o los 12087 resultados con “*biological control*” + “*insect pest*”. A modo de ejemplo es posible citar algunos antecedentes sobre el uso de NP para el control de artrópodos plagas agrícolas y de interés sanitario. Ishwarya et al. (2018) diseñaron NP de óxido de zinc a partir de extractos de *Ulva lactuca* L. (Ulvales, Ulvaceae), que mostraron tener una gran actividad en el control de

*Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae). Por otra parte, Sahayaraj et al. (2016) demostraron que las nanopartículas de plata u oro elaboradas con el AE de *Millettia pinnata* L. (Fabales, Fabaceae) pueden actuar como un eficiente larvicida para el manejo de *Pericallia ricin* Fabricius (Lepidoptera, Erebidae). Kamaraj et al. (2012) informaron que las NP de plata elaboradas con extractos de *Manilkara zapota* L. (Ericales, Sapotaceae) mostraron tener efectos fagodisuasivos en *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae). Las nanopartículas de silica también han demostrado ser un producto con alta eficiencia para el manejo de insectos plaga. En *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera, Bruchidae) estas NP lograron el cien por ciento de mortalidad a los 14 días de exposición (Rouhani et al., 2013). Stadler et al. (2012) desarrollaron NP de óxido de aluminio (nanoalúmina) que tuvieron efecto insecticida en los coleópteros *S. oryzae* y *R. dominica*

En lo que respecta a las NP poliméricas, el quitosano y el polietilenglicol (PEG) figuran entre los polímeros más empleados para su elaboración. El PEG es un compuesto sintético soluble en agua que se forma por la condensación de óxido de etileno y agua. De acuerdo a su peso molecular, estos polímeros pueden encontrarse a temperatura ambiente en estado líquido (PEG 200-600), semisólidos (PEG 1500), sólidos semicristalinos (PEG 3000-20.000) y sólidos resinosos, cuando sus pesos moleculares superan los 100.000 (D'souza y Shegokar, 2016). En los últimos años, el PEG 6000 ha recibido una atención particular debido a su amplio rango de solubilidad, baja toxicidad, ausencia de antigenicidad e inmunotoxicidad (Biswal et al., 2008). El PEG 6000 es un sólido blanco o casi blanco, de aspecto céreo o parafínico con estructura general  $H-[O-CH_2-CH_2]_n-OH$  con  $n = \text{aprox. } 152$  (PM = aprox. 6000). Presenta punto de fusión: 56 – 63 °C y valores de  $DL_{50}$  oral en rata = 28.000 mg/kg y  $DL_{50}$  dérmica en conejo = > 20.000 mg/kg (D'souza y Shegokar, 2016). Este polímero es empleado en una gran variedad de preparaciones farmacéuticas tópicas, orales, oftálmicas y parenterales (Mohanraj y Chen, 2006). En cuanto a la aplicación de estas NP en el campo de la industria alimentaria y agrícola, uno de los primeros trabajos que se puede citar es el de Yang et al. (2009) quienes diseñaron

NP de PEG-6000 cargadas con AE (NPAE) de *Allium sativum* L. (Asparagales, Amaryllidaceae). En este trabajo se desarrollaron las NP a través del método de fusión-dispersión y además se aportó información relevante acerca de las características fisicoquímicas y de los efectos de estas NP en *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). A este trabajo se pueden sumar los datos aportados por Werdin-Gonzalez et al. (2014) quienes elaboraron NPAE de geranio y bergamota para el control de *T. castaneum* y *R. dominica*. Adicionalmente, Campolo et al. (2017) evaluaron la bioactividad de NPAE de naranja en *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera, Gelechiidae) con resultados prometedores. En el campo de los insectos de interés sanitario, se formularon NPAE de menta para el control de la mosca doméstica (Kumar et al., 2014). Un tiempo después se publicaron trabajos que informaban acerca de los efectos letales y subletales de estas NP en *Blattella germanica* L. (Blattodea, Blattellidae) y *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) (Werdin-Gonzalez et al. 2015, 2016, 2017; Yeguerman et al. 2020).

#### **2.A.4. Aplicación de temperatura como estrategia de manejo de insectos plaga.**

La temperatura es uno de los factores principales que limita la supervivencia y la reproducción de los artrópodos. Es por esto que su uso se ha explorado para el desarrollo de estrategias MIP, que sean más amigables con el ambiente y seguras para la salud humana (Hallman y Denlinger, 1999).

Tanto el calor como el frío se han utilizado desde la antigüedad como estrategias para controlar los organismos plaga. Por ejemplo, la quema de los residuos de las cosechas se utilizaba para combatir los insectos plaga hipogeos, mientras que el arado de otoño era a menudo una técnica eficaz para exponer a estos organismos a las temperaturas letales del invierno (Gangwar, 2006). En la actualidad, estos métodos se clasifican bajo la categoría de controles físicos, que Fields (1994) definió como aquellos que emplean propiedades abiológicas del ambiente para disminuir las poblaciones de los organismos plaga. Antes del uso

generalizado de los productos fumigantes, el frío y el calor se utilizaron en gran medida para controlar especies plaga de una amplia gama de productos almacenados que incluían granos, bulbos, troncos, frutas y telas (Kumar et al., 2017)

La manipulación de la temperatura está recibiendo un interés renovado como método físico para el manejo de insectos plaga de productos almacenados dado que no presenta los problemas ya conocidos de los métodos químicos (Daglish et al., 2018). La influencia de la temperatura en las reacciones bioquímicas y la actividad resultante de los artrópodos pueden mejorar o limitar la efectividad de las estrategias de control lo cual agrega una nueva variable que no siempre es tomada en cuenta por aquellos que diseñan o ponen en práctica estas estrategias. Las tasas de alimentación, dispersión y reproducción de los artrópodos plaga y sus enemigos naturales generalmente se ven afectadas fuera del rango óptimo de actividad (24 - 35 °C), aunque existen excepciones que pueden mostrar una amplia gama de resultados y comportamientos (Hallman y Denlinger, 1999). Las variaciones en la temperatura ambiental también influyen en las características químicas de los insecticidas afectando su estabilidad, volatilización, penetración, bioactividad y degradación. Generalmente estos procesos ocurren a mayor velocidad a temperaturas más altas, aunque no siempre muestran una relación lineal (Harwood et al., 2009).



Existen numerosos trabajos que informan sobre del efecto combinado de los insecticidas sintéticos y la temperatura en distintos insectos plaga (Alzogaray et al., 1998; Das and Needham, 1961; Harwood et al., 2009; Harris y Kinoshita, 1977; Musser y Shelton, 2005 Weston et al., 2009). Si bien en los últimos 20 años, los estudios relacionados con los AE y sus efectos biológicos se han incrementado exponencialmente, pocos de ellos estudiaron el efecto combinado de estos productos con la temperatura como método de control, pese a que esta última demostró incrementar la actividad de los insecticidas sintéticos. Se ha teorizado que la temperatura ambiental podría ser un factor que puede mejorar o reducir la toxicidad de los AE en insectos plaga de productos almacenados (Campolo et al., 2018). Sobre esta temática se puede citar el trabajo de Pavela et al. (2018) quienes estudiaron los efectos de la temperatura y el AE de *T. vulgaris* en Boisduval (Lepidóptera, Noctuidae) y *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae).

### 2.A.5. Hipótesis

- El método de encapsulación por fusión-dispersión permite obtener NP de PEG-6000 cargadas con AE (NPAE).
- Las NPAE poseen actividad insecticida por exposición a superficies tratadas y a vapores en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*.
- Las NPAE potencian la actividad insecticida de los AE en *P. interpunctella*.
- Los AE y las NPAE presentan toxicidad diferencial al ser aplicados usando diferentes temperaturas.
- Los AE y las NPAE poseen una temperatura óptima a la cual su acción insecticida es máxima.

#### 2.A.6.a. Objetivo general

El objetivo del trabajo es evaluar la actividad insecticida de las NPAE en *P. interpunctella* a diferentes temperaturas ambientales y comprender la correlación entre la temperatura post aplicación y la bioeficacia de las NP.

#### 2.A.6.b. Objetivo específicos

- Elaborar y caracterizar fisicoquímicamente NP de PEG-6000 con los AE de palmarosa, geranio y menta por el método de fusión-dispersión
- Evaluar la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas y a vapores de las las NPAE en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*
- Evaluar la actividad insecticida por tópico de las NPAE en larvas del IV estadio de *P. interpunctella*
- Comparar la toxicidad de los AE y sus NPAE a diferentes temperaturas en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*.
- Determinar la temperatura óptima a la cual las NPAE son más eficientes.

## **2.B. Materiales y Método**

### **2.B.1. Preparación de las nanopartículas poliméricas de PEG-6000 cargadas con AE (NPAE).**

Para la obtención de las NPAE se utilizaron los AE de palmarosa, geranio y menta, los cuales se seleccionaron por su alta actividad biológica en adultos de *P. interpuctella*. Las NPAE se elaboraron usando el método de fusión-dispersión de acuerdo con lo establecido por Yang et al. (2009) y Werdin Gonzalez et al. (2014) con algunas modificaciones. En ambos trabajos se determinó que la relación óptima entre AE y PEG 6000 es de 1:10 (proporción que será utilizada en el presente trabajo), dado que con esta proporción se obtienen la mejor relación entre las variables tamaño de partículas, polidispersión y eficiencia de cargado. Para la obtención de las NPAE se fundieron 20 g de PEG 6000 a 65 °C en una placa calefactora bajo agitación magnética. Posteriormente se agregaron 2 g de AE y la mezcla se homogenizó mediante un ultrahomogenizador (D-500 Handheld Homogenizer, D-lab instrument limited) durante 10 min a 15.000 rpm. Transcurrido este tiempo, la mezcla se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente y una vez que la misma comenzó a solidificar, se enfrió a -4 °C por 45 min con el objetivo de obtener NP de forma espontánea. Finalmente, la mezcla se molió en un mortero refrigerado a 0 °C y luego se tamizó mediante una malla fina de metal de 230 mesh. Las nanopartículas se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno y se colocaron en desecadores con cloruro de calcio a  $27 \pm 2$  °C. El tiempo de almacenamiento fue de 7 días, luego de los cuales se procedió a realizar los experimentos. Este tiempo se seleccionó según lo referido en Werdin-González et al. (2014), quienes establecieron, que luego de una semana de almacenamiento no se producen modificaciones significativas en las variables fisicoquímicas de las NPAE.

## **2.B.2. Caracterización de las NPAE**

### **2.B.2.a. Medidas de tamaño e índice de polidispersión (IPD) de las NPAE.**

Para la determinación del tamaño medio e IPD de las NPAE se utilizó un equipo Zetasizer nano instrument ZEN 3690 (Malvern, Reino Unido). El IPD es un indicador de la homo/heterogeneidad de la distribución de tamaños de las partículas que se calcula a partir del cuadrado del desvío estándar dividido el cuadrado de la media de las partículas (Pascoli et al. 2019). Para realizar las medidas anteriormente citadas, se tomaron 0,2 g de muestra de cada una de las NPAE y se suspendieron en 10 ml de agua destilada durante 30 min. Luego, la dispersión se filtró usando un papel de filtro Wathman N° 1 y se dejó equilibrar durante 2 horas. Para cada NP se realizaron cuatro réplicas y las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C.

### **2.B.2.b. Microscopía electrónica de barrido (MEB).**

Para la preparación de las muestras, 0,2 g de las NPEA se dispersaron en 10 ml de agua destilada y se sonicaron. Luego, tres gotas de la muestra se colocaron en un cubreobjetos. Una vez evaporada el agua, las muestras se cubrieron con una capa de oro usando un metalizador de plasma de argón. Las imágenes se visualizaron utilizando un microscopio LEO EVO 40-XVP (CCT-CONICET-Bahía Blanca). La observación se realizó a un voltaje de 10 kV y un aumento de 85.000x.

### **2.B.2.c. Eficiencia de cargado de las NPAE.**

La eficiencia de cargado (EC) se define como la masa de principio activo encapsulado en relación a su masa inicial pre-formulación (Ammendola et al., 2019) La EC se determinó espectrofotométricamente de acuerdo a la técnica de Werdin-González et al. (2014). 0,1 g de cada una de las NPAE de los distintos AE se disolvieron, separadamente, en 2 ml de alcohol absoluto-H<sub>2</sub>O (75:25). La mezcla se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. El sobrenadante se recolectó y se analizó por espectroscopia ultravioleta-visible mediante un fotómetro Shimadzu UV- 1203 con Kinetics-2-Program Pack P/N 206- 62029-10 (Shimadzu Corp., Kioto, Japón) a una

longitud de onda de 290 nm. Se analizaron cuatro muestras y la cantidad de AE en cada una de ellas se estimó mediante una curva de calibrado AE libre/ etanol. La eficiencia de cargado se calculó con la siguiente fórmula:

$$EC(\%) = \frac{\text{Peso del AE cargado}}{\text{Peso inicial del AE}} \times 100$$

#### **2.B.2.d. Composición química de los AE pre y post formulación**

Para la extracción de los aceites de las NPAE, 0,5 g de cada muestra se disolvieron en 5 ml de agua destilada que se calentó a 65 °C durante 30 min bajo agitación magnética. Una vez fundido el PEG se adicionaron 4 ml de éter de petróleo y la muestra se mantuvo en agitación durante dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a tomar una muestra de los AE extraídos con la fase éter. Con el objetivo de determinar si en la solución de PEG y agua quedaban remanentes de los AE, se realizó una segunda extracción incrementando la polaridad del solvente, (n-butanol). Finalmente se procedió a analizar las fases éter, n-butanol y acuosa mediante CG- EM.

#### **2.B.3. Bioensayos**

##### **2.B.3.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas.**

En este bioensayo se comparó la toxicidad por contacto de los AE y las NPAE en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*, a distintas temperaturas. Para llevar adelante el ensayo, se trataron papeles de filtro (diámetro de 9,4 cm) con 0,7 ml de las soluciones hexánicas de los AE. Sobre la base de ensayos preliminares, se determinó un rango de concentraciones que fueron desde 25 a 400 µg cm<sup>-2</sup>. Luego de la evaporación del solvente, los papeles de filtro se colocaron en las bases de cajas de Petri (9,4 cm de diámetro x 1,9 cm). A continuación se agregaron 10 adultos o larvas de *P. interpunctella* y se cubrieron con una tela fina tipo voile. Como control, se utilizaron papeles de filtro tratados con 0,7 ml de hexano. En los ensayos con NPAE, las mismas se esparcieron directamente sobre los papeles de filtro a

concentraciones equivalentes a la de los AE (teniendo en cuenta la EC de cada NP). En cuanto al control, en este caso se utilizó PEG-6000 procesado según 2.B.1 sin agregado de AE. Para estudiar el efecto de la temperatura, las arenas experimentales se acondicionaron en cámaras de cría a tres temperaturas diferentes (17, 24 y  $31 \pm 1$  °C) y 45-50% de HR. Por cada temperatura y tratamiento se realizaron cuatro réplicas.

La mortalidad de los insectos se determinó trascurridas las 24 h (adultos) y 72 h (larvas) de exposición a los productos.

### **2.B.3.b. Ensayo de toxicidad por exposición a vapores**

A fin de comparar la toxicidad por exposición a vapores de los AE y las NPAE en adultos y larvas del IV de *P. interpunctella* a distintas temperaturas se llevó a cabo un bioensayo con cámara fumigante. Papeles de filtro de 9,4 cm diámetro se trataron con 0,7 ml de las soluciones hexánicas de los AE. Sobre la base de ensayos preliminares, se determinó un rango de concentraciones que fueron desde 25 a 400  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Luego de la evaporación del solvente, los papeles de filtro se colocaron en la base de cajas de Petri (9,4 cm de diámetro x 1,9 cm). Cada base se cubrió con una tapa con un orificio central recubierta con una tela de malla fina y sobre esta se liberaron diez adultos o larvas protegidos por un segundo recipiente plástico de diámetro equivalente y de un volumen de 350 ml. Para evitar su fuga el conjunto de caja y recipiente fue herméticamente sellado con cinta adhesiva. Como control, se utilizaron papeles de filtro tratados con 0,7 ml de hexano. En el caso de los ensayos con NPAE, estas se esparcieron directamente sobre los papeles de filtro a concentraciones equivalentes a la de los AE (teniendo en cuenta la eficiencia de cargado cada NP). En cuanto al control, en este caso se utilizó PEG-6000 procesado según 2.B.1 sin agregado de AE. De la misma manera que para el ensayo de superficies tratadas y con el objetivo de determinar los efectos de la temperatura, las cámaras fumigantes se acondicionaron a tres temperaturas diferentes (17, 24 y  $31 \pm 1$  °C) y 45-50% de HR. Por cada temperatura y tratamiento se realizaron cuatro réplicas. La mortalidad

de los insectos se determinó trascurridas las 24 h (adultos) y 72 h (larvas) de exposición a los productos.

### **2.B.3.c. Efecto de la Temperatura**

El coeficiente de temperatura (CT) indica la relación que existe entre la temperatura de un ambiente determinado y la toxicidad de un insecticida. Este coeficiente se define como el cociente entre dos valores de CL<sub>50</sub> estimados a dos temperaturas distintas (Toth y Sparks, 1988). El CT se calculó entre dos temperaturas (Ta, Tb) mediante la siguiente formula:

$$CT(Ta, Tb) = \frac{CL50(Ta)}{CL50(Tb)}$$

Donde Ta representa la temperatura a la cual el producto produjo menor actividad insecticida y Tb, a la cual el producto demostró mayor actividad

Los valores de CT se tipificaron como positivos cuando la toxicidad del producto se incrementaba a medida que aumentaba la temperatura, mientras que se denotaron como negativos cuando la toxicidad de la sustancia decrecía a medida que se incrementaba la temperatura. Los valores de CT se consideraron significativos cuando no existía superposición de los valores de CL<sub>50</sub> indicando que la temperatura modificó significativamente la actividad insecticida (Alzogaray et al., 1998; Liu et al, 2016).

### **2.B.3.d. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica**

Para evaluar el efecto por vía tópica de las NPAE se trataron 10 larvas de *P. interpunctella* (larvas iniciando el IV estadio). Para llevar adelante el ensayo, se realizó un tratamiento utilizando soluciones de NPAE en agua, en dosis que fueron desde 10 a 80 µg larva<sup>-1</sup>. El PEG-6000 procesado según 2.B.1 (en la proporción correspondiente a la usada en las NPAE) se aplicó tópicamente como control. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y las larvas se mantuvieron a 27 ± 2 °C, 45-50% HR. y 16:8 h L:O. La mortalidad de los insectos se

registró después de un periodo de exposición de 72 h para calcular el valor de Dosis Letal ( $DL_{50}$ ).

#### **2.B.4. Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos de las medidas de tamaño, IPD y EC de las NPAE fueron analizados mediante ANOVA y DMS. Los datos de mortalidad de los ensayos por exposición a superficies tratadas y por exposición a vapores, se procesaron mediante análisis probit utilizando el software estadístico SPSS 25.0 para obtener la Concentración Letal 50 ( $CL_{50}$ ). Además, se estimaron los intervalos de confianza del 95%. Los valores de  $CL_{50}$  se consideraron significativamente diferentes si sus intervalos de confianza del 95% no se superponían.



## 2.C. Resultados.

### 2.C.1. Caracterización de las nanopartículas.

El primer paso de este trabajo fue la caracterización de las NPAE a los 7 días post formulación. El tamaño de las partículas obtenidas fue menor de 390 nm y las mismas resultaron ser significativamente diferentes entre sí ( $P < 0,05$ ). Las NPAE de palmarosa fueron las más pequeñas (191 nm) y en orden creciente de tamaños le siguieron las NPAE de geranio (259 nm) y luego las de menta (381 nm).

Al analizar el IPD no se encontraron diferencias significativas entre las NPAE de palmarosa y geranio ( $P > 0,05$ ), indicando que ambas muestras fueron monodispersas ( $IPD < 0,25$ ). Por su parte las NPAE de menta mostraron valores de IPD significativamente mayores ( $P < 0,05$ ), lo que indica que las muestras fueron polidispersas ( $IPD > 0,40$ ).

**Tabla 2.1.** Tamaño medio ( $\pm$  ES), índice de polidispersión (IPD, valor medio  $\pm$  ES) y eficiencia de cargado (EC,  $\pm$  ES) de las NPAE a los 7 días post-formulación

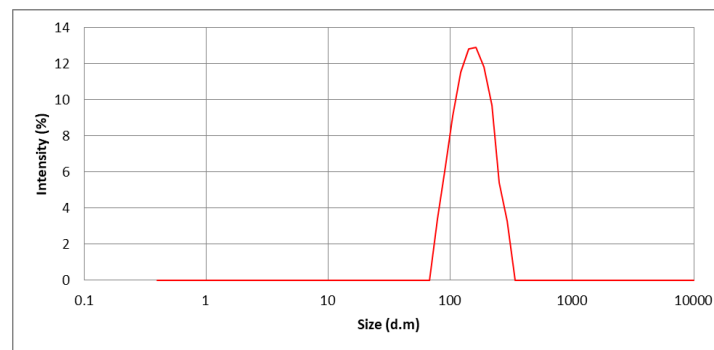
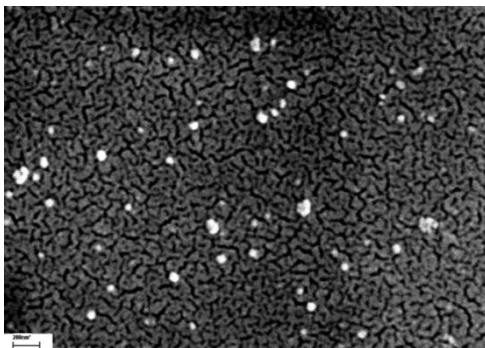
	Palmarosa		Geranio		Menta	
<b>Tamaño (nm)<sup>a</sup></b>	191 $\pm$ 5	<b>A</b>	259 $\pm$ 12	<b>B</b>	381 $\pm$ 29	<b>C</b>
<b>IPD<sup>a</sup></b>	0,232 $\pm$ 0,015	<b>A</b>	0,228 $\pm$ 0,007	<b>A</b>	0,532 $\pm$ 0,013	<b>B</b>
<b>EC (%)<sup>a</sup></b>	89,75 $\pm$ 2,5	<b>A</b>	90,5 $\pm$ 2,32	<b>A</b>	72,25 $\pm$ 1,6	<b>B</b>

<sup>a</sup>Los valores de  $CL_{50}$  seguidos de diferentes letras dentro de la misma fila muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

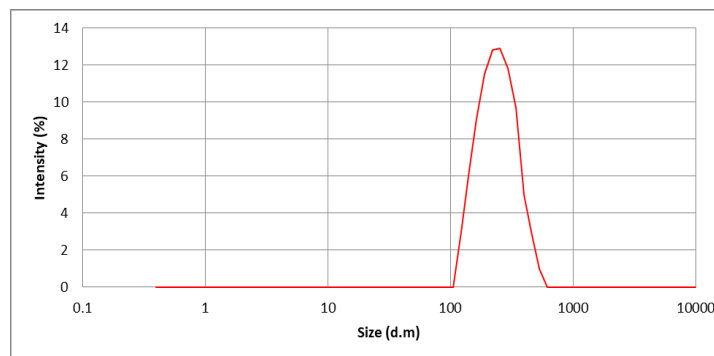
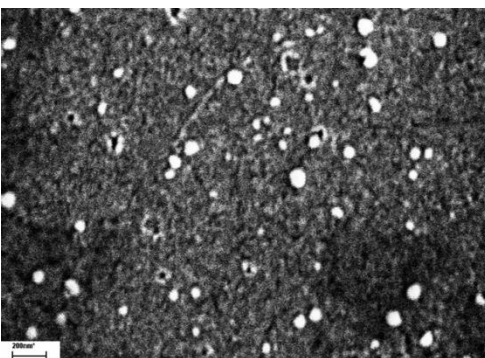
En este estudio también se analizó la morfología de las NPAE mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las Fig. 2.1.A y 2.1.B muestran la morfología de las NPAE de palmarosa y geranio (85.000x), y el gráfico DLS (por sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering). Las imágenes revelaron que ambas NP presentan forma esférica y uniforme. En contraposición, las NPAE de menta tienen forma irregular y fueron más heterogéneas con respecto a la variación de tamaño (Fig. 2.1.C). A su vez, se puede observar a través de los gráficos DLS que los tamaños medios de las NPAE fueron diferentes dependiendo de los aceites empleados.

**Figura 2.1.** Imágenes obtenidas por MEB de las NPAE de los AE de palmarosa (A), geranio (B) y menta (C), acompañadas con sus respectivos gráficos de DLS.

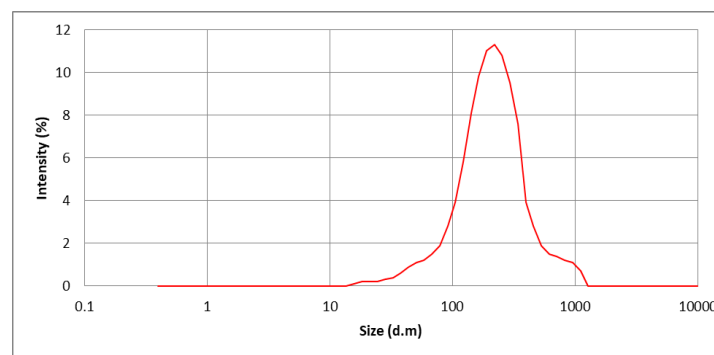
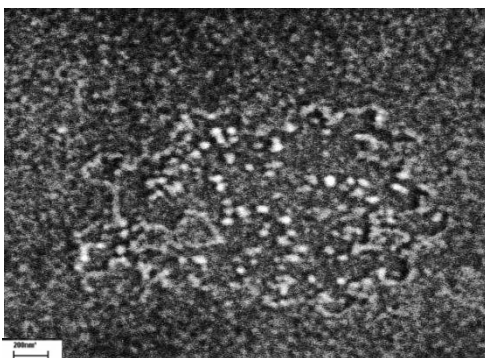
A



B



C



Con respecto a la eficiencia de cargado, la tabla 2.1 muestra que todas las NPAE tuvieron una EC > 70%. No se observaron diferencias significativas entre las NPAE de palmarosa y de geranio las cuales mostraron una EC cercana al 90% ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, la EC de las nanopartículas de menta fue significativamente menor en comparación con las anteriores ( $P < 0,05$ ).

En cuanto a la caracterización química de los AE post formulación, el análisis por CG-EM de las fases éter, n-butanol y acuosa, reveló que todos los componentes hallados se encontraron en la primera fase; mientras que no se detectaron terpenos remanentes ni en la fase n-butanol, ni en la acuosa.

Con respecto al análisis químico, en el AE de palmarosa y en sus NPAE se detectó al geraniol como componente mayoritario (tabla 2.2). Los demás componentes de este AE se mantuvieron en proporciones similares luego de la formulación.

En el AE de geranio y en sus NPAE, el  $\beta$ -citronelol y el geraniol fueron los compuestos principales (tabla 2.2). El linalol mantuvo una proporción similar en la muestra post formulación. Así mismo los componentes que originalmente representaban entre el 8% y el 11% (mentona, formiato de citronelilo y formiato de geranilo), se redujeron luego de la formulación (< 1,7%). Los componentes que en la muestra preformulación representaban menos del 3% no se detectaron en la muestra postformulación.

En el AE de menta, el mentol permaneció como el componente principal en las muestras pre y post formuladas; cabe destacar que en estas últimas la proporción de este compuesto aumentó notoriamente llegando a más del 80% (tabla 2.2). Después de la formulación del aceite se observó una ligera reducción en los contenidos de isomentona, p-menten-3-ona y acetato de mentol. Los componentes con una representación menor al 6% en la muestra original no se detectaron en la etapa postformulación.

**Tabla 2.2.** Análisis químico por CG- EM pre / post-formulación de los aceites de palmarosa, geranio y menta

RT (min)	Componentes	Palmarosa		Geranio		Menta	
		Preformulación	Postformulación	Preformulación	Postformulación	Preformulación	Postformulación
7,16	$\alpha$ -pineno	-	-	-	-	1,92	-
8,36	$\beta$ -pineno	-	-	-	-	1,85	-
9,87	Limoneno	-	-	-	-	3,36	-
9,93	1-8 cineol	-	-	-	-	5,88	-
13,06	Linalool	2,55	2,29	12,67	9,95	-	-
13,55	Isomentona	-	-	-	-	16,90	6,95
13,85	Mentona	-	-	11,14	1,38	-	-
14,10	Mentol	-	-	-	-	52,51	81,37
14,35	p-menten-3-ona	-	-	-	-	10,43	7,57
16,14	$\beta$ -citronelol	9,94	10,12	26,14	38,12	-	-
16,48	Geraniol	77,07	76,38	23,19	47,89	-	-
16,98	formiato de citronelilo	-	-	10,37	1,71	-	-
17,70	formiato de geranilo	-	-	7,94	0,95	-	-
18,04	acetato de mentol	-	-	-	-	7,15	4,11
20,85	acetato de geranilo	4,55	5,30	2,01	-	-	-
20,86	Cariofileno	5,86	1,39	2,58	-	-	-
23,70	acetato de nerilo	-	-	2,98	-	-	-

## 2.C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas.

En el rango de temperaturas y concentraciones estudiados, ningún AE o sus NP mostraron poseer actividad insecticida en las larvas del IV estadio de *P. interpunctella*.

Para el caso de los adultos de *P. interpunctella* se determinó que, a todas las temperaturas, el orden de toxicidad de los AE en base a los valores de  $CL_{50}$  fue palmarosa > geranio > menta, con diferencias significativas entre sí ( $P < 0,05$ ). Este mismo orden de toxicidad se obtuvo con las NPAE a 17 y 24 °C ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, a 31 °C, no se encontraron diferencias significativas entre el efecto de las NPAE de palmarosa y geranio ( $P > 0,05$ ), por lo tanto el orden de toxicidad fue palmarosa = geranio > menta. No se observó mortalidad en los controles.

La tabla 2.3 muestra que el aceite de palmarosa a 17 °C tuvo la mayor toxicidad por contacto con un valor de  $CL_{50}$  de 44,74  $\mu\text{g cm}^{-2}$  ( $P < 0,05$ ) en comparación con el resto de las temperaturas. A 24 °C y 31 °C, no se encontraron diferencias significativas en la actividad insecticida por contacto del aceite ( $P > 0,05$ ). Para las NPAE de palmarosa se observó una tendencia similar, en donde la mayor mortalidad se alcanzó a los 17 °C con un valor de  $CL_{50}$  de 17,56  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . A su vez es importante resaltar que las NPAE potenciaron significativamente la actividad insecticida por contacto del AE entre 1,77 y 2,53 veces ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2.3.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de palmarosa y sus NPAE a 17, 24 y 31°C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50} \text{ AE} / CL_{50} \text{ NPAE}$
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17 °C	44,74	40,3 – 49,1	17,56	14,3 – 20,5	<b>2,53*</b>
24 °C	102,92	91,4 – 113,9	54,49	50,5 – 59,0	<b>1,89*</b>
31 °C	84,10	74,0 – 93,1	47,44	40,5 – 55,8	<b>1,77*</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

La tabla 2.4 muestra que el aceite de geranio produjo el máximo efecto insecticida a 17 °C, con un valor de  $CL_{50} = 73,15 \mu\text{g cm}^{-2}$ . En cuanto al efecto del aceite a 24 y 31 °C, no se observaron diferencias significativas en los valores de  $LC_{50}$  entre estas temperatura ( $P > 0,05$ ). Al igual que el AE, el valor de  $CL_{50}$  de las NPAE estimado a los 17 °C resultó ser el más bajo a todas las temperaturas ( $59,85 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) ( $P < 0,05$ ), mientras que no se hallaron diferencias significativas en los valores de  $CL_{50}$  a 24 y 31 °C ( $P > 0,05$ ). En este caso, las NPAE también aumentaron significativamente la actividad insecticida de los compuestos bioactivos entre 1,54 y 1,90 veces ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2.4.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de geranio y sus NPAE a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50} \text{ AE} / CL_{50} \text{ NPAE}$
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17 °C	73,15	67,1 – 79,7	47,44	40,9 – 51,3	<b>1,54*</b>
24 °C	128,83	117,4 – 141,3	67,51	61,4 – 73,4	<b>1,90*</b>
31 °C	111,46	97,1 – 124,1	64,40	52,2 – 76,2	<b>1,73*</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

La tabla 2.5 muestra que el AE de menta a 17 °C fue el más tóxico ( $CL_{50} = 126,90 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), encontraronse diferencias significativas con el resto de las temperaturas ( $P < 0,05$ ). En el caso de las NPAE, a esta temperatura también se observó la mayor toxicidad con un valor de  $CL_{50}$  de  $59,85 \mu\text{g cm}^{-2}$  hallándose diferencias significativas con el resto de las temperaturas ( $P < 0,05$ ). Las NP también potenciaron significativamente la actividad insecticida del aceite de menta entre 2,12 y 3,54 veces.

**Tabla 2.5.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas del AE de menta y sus NPAE a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50} \text{ AE} / CL_{50} \text{ NPAE}$
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17 °C	126,90	115,1 – 138,6	59,85	52,2 – 68,9	<b>2,12*</b>
24 °C	202,05	191,1 – 212,7	86,84	76,7 – 98,2	<b>2,32*</b>
31 °C	386,64	348,5 – 387,5	109,18	93,4 – 128,0	<b>3,54*</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

### 2.C.3. Toxicidad por exposición a vapores.

Las larvas del IV estadio de *P. interpunctella* no fueron susceptibles a la actividad insecticida de los AE y sus NP a las temperaturas y concentraciones estudiadas.

En el bioensayo por exposición a vapores en adultos de *P. interpunctella*, a 17 y 24 °C, el orden de toxicidad de los AE fue palmarosa > geranio > menta, registrándose diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, a 31 °C no se hallaron diferencias significativas entre el AE de geranio y menta ( $P > 0,05$ ), por lo que el orden de toxicidad fue palmarosa > geranio = menta. Por otro lado, para las NPAE, a todas las temperaturas estudiadas, no se detectaron diferencias significativas entre la actividad insecticida de las NP de palmarosa y menta ( $P > 0,05$ ), aunque si entre estos dos productos y las NPAE de geranio ( $P < 0,05$ ). En consecuencia el orden de toxicidad fue palmarosa = menta > geranio. No se observó mortalidad en los controles.

Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en el valor de  $CL_{50}$  del aceite de palmarosa a diferentes temperaturas ( $P > 0,05$ ) (tabla 2.6). El valor de  $CL_{50}$  varió de 38,87 a 42,33  $\mu\text{g cm}^{-2}$  entre 31 y 17 °C, respectivamente. Para las NPAE de palmarosa se observó una actividad similar y los valores de  $CL_{50}$  oscilaron entre 23 y 31  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , a 17 y 31 °C. Es

importante destacar que las NPAE mejoraron significativamente la actividad insecticida entre 1,26 a 1,77 veces.

**Tabla 2.6.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de palmarosa y sus NPAE a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50}$ EO / $CL_{50}$ NPAE
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17 °C	42,33	37,2 – 49,1	23,81	15,0 – 29,5	<b>1,77*</b>
24 °C	40,66	35,7 – 45,2	23,30	20,0 – 27,3	<b>1,74*</b>
31 °C	38,87	31,8 – 46,8	30,73	26,6 – 35,8	<b>1,26*</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

La tabla 2.7 muestra el efecto tóxico de los vapores del AE de geranio. De esta tabla se desprende que no se encontraron diferencias significativas en los valores de  $CL_{50}$  del AE de geranio, ni en sus NPAE a las diferentes temperaturas ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 2.7.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de geranio y sus NPAE a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50}$ EO / $CL_{50}$ NPAE
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17°C	55,27	50,1 – 60,5	54,65	46,1 – 63,3	<b>1,01</b>
24°C	55,78	51,6 – 63,3	54,61	49,9 – 60,2	<b>1,02</b>
31°C	66,95	55,4 – 80,1	60,67	54,0 – 68,8	<b>1,10</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

En el caso del AE de menta y sus NPAE tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de  $CL_{50}$  a las diferentes temperaturas ( $P > 0,05$ ). Para el AE, los valores de  $CL_{50}$  oscilaron entre 81,37 y 100,59  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , mientras que para las NPAE entre 22,59 y 30,56  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (Tabla 2.8). Se destaca también que las NPAE aumentaron significativamente el efecto insecticida del AE en 2,26 a 4,45 veces.



**Tabla 2.8.** Valores de  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) para la actividad insecticida por exposición a vapores del AE de menta y sus NPAE a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella*.

Temp.	AE		NPAE		$CL_{50}$ EO / $CL_{50}$ NPAE
	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	$CL_{50}$	I.C. <sup>a</sup>	
17 °C	90,12	83,3 – 98,0	26,73	23,8 – 30,8	<b>3,37*</b>
24 °C	100,59	88,5 – 111,9	22,59	19,1 – 26,8	<b>4,45*</b>
31 °C	81,37	69,4 – 92,0	30,56	26,5 – 35,5	<b>2,66*</b>

\*Diferencias significativas entre los valores  $CL_{50}$  de los AE y de sus nanopartículas (superposición de IC,  $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> intervalos de confianza del 95%.

#### 2.C.4. Efecto de la temperatura.

La Tabla 2.9 muestra los coeficientes de temperatura de las diadas 17, 24 °C, 24, 31 °C y 17, 31 °C obtenidos de la exposición de adultos *P. interpunctella* a los AE y sus nanopartículas. En el ensayo de toxicidad por contacto, todos los AE y las NPAE mostraron un CT significativo y negativo entre las temperaturas 17, 24 °C y 17, 31 °C ( $P < 0,05$ ). Esta misma situación se repitió solo para el AE de menta en la diada de 24, 31 °C. Sin embargo, en el bioensayo de toxicidad por exposición a vapores, los valores de CT de todos los AE y sus NPAE no se vieron afectados por la variación en la temperatura.

#### 2.C.5. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica.

Debido a las dificultades de aplicación por vía tópica, no se lograron obtener resultados contundentes acerca de la actividad insecticida de las NPAE, en larvas IV de *P. interpunctella*.

**Tabla 2.9.** Coeficientes de temperatura de los AE y sus nanopartículas a 17, 24 y 31 °C en adultos de *P. interpunctella* en bioensayos de exposición a superficies tratadas y a vapores.

Producto		Superficies tratadas			Vapores		
		17,24 °C	24,31 °C	17,31 °C	17, 24 °C	24, 31 °C	17, 31 °C
Palmarosa	EO	-2,30*	1,22	-1,88*	1,05	1,05	1,09
	EOPN	-3,10*	1,14	-2,70*	1,02	-1,31	-1,29
Geranio	EO	-1,76*	1,15	-1,52*	1,00	-1,20	-1,21
	EOPN	-1,42*	1,05	-1,36*	1,00	-1,11	-1,11
Menta	EO	-1,59*	-1,91*	-3,05*	-1,12	1,24	1,12
	EOPN	-1,45*	-1,26	-1,82*	1,18	-1,35	-1,14

\*Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de  $CL_{50}$  para cada componente de las diadas de temperaturas (superposición de CI,  $P < 0,05$ ). Cada valor fue obtenido de datos basados en 4 réplicas.

## 2.D. Discusión

En este estudio, los AE de palmarosa, geranio, y menta se incluyeron en una matriz de polietilenglicol 6000 (PEG-6000) mediante el método de fusión-dispersión para obtener NP poliméricas cargadas con AE (NPAE). En cuanto a las características fisicoquímicas de estas NP, las NPAE de palmarosa y geranio presentaron tamaños de 191 nm y 259 nm, respectivamente. Ambas NP resultaron ser monodispersas y tuvieron una eficiencia de cargado (EC) cercana al 90%. Por otro lado, las NPAE de menta mostraron tamaños de 381 nm, resultaron ser polidispersas, y presentaron EC aproximadamente del 72%. Las imágenes MEB confirmaron los datos obtenidos en la caracterización de las NPAE. Además, los análisis químicos posteriores a la formulación mostraron que todas las NP encapsularon la mayoría de los componentes principales de los AE.

Recientemente, se empleó la técnica de fusión-dispersión para obtener NPAE de distintos cítricos (limón, mandarina y naranja) que mostraron tamaños de 212 a 240 nm, EC > 88% y PDI entre 0,23 - 0,34 (Campolo et al., 2017). Estos son valores similares a los obtenidos en la elaboración de las NPAE de geranio y palmarosa. Al usar el PEG 6000 y el aceite de *Mentha piperita* se obtuvieron NPAE de 331 nm, con EC cercana del 85% y PDI = 0.547 (Kumar et al., 2014). En comparación con estas últimas NPAE, las NP elaboradas en este trabajo tuvieron una EC levemente menor pero con tamaños e índices de dispersión similares. También se desarrollaron NP de PEG como sistemas transportadores para el AE de ajo utilizando esta técnica obteniéndose NP monodispersas de 233 nm y EC cercana al 80% (Yang et al. 2009). En otros trabajos se informó que las NPAE de bergamota presentaban tamaños de entre 184 y 236 nm con una EC cercana al 75% y un valor de PDI de 0,25 (Werdin-González et al. 2014, 2017). Teniendo en cuenta lo expuesto, es posible que la metodología de encapsulación conocida como método de fusión-dispersión es una técnica simple, conveniente y de bajo costo, que permite obtener NPAE con tamaños > 100 nm, generalmente monodispersas y con una alta EC. Otras técnicas halladas en la bibliografía para la obtención de NP han demostrado

poseer una baja EC. Por ejemplo al trabajar con NP de quitosano cargadas con eugenol, se obtuvieron EC cercanas al 20% (Woranuch y Yoksan, 2013). Estas mismas NP cargadas con AE de orégano tuvieron EC de entre 21% y 47% (Hosseini et al., 2013). NP de alginato / anacardo cargadas con AE de *Lippia sidoides* Cham (Lamiales, Verbenaceae) tuvieron EC de 55% (De Oliveira et al., 2014). Nanocápsulas diseñadas con ácido glicólico poliláctico y cargadas con carvacrol, mostraron una EC del 26% (Lannitelli et al., 2011). Al desarrollar NP poliméricas de metilcelulosa / etilcelulosa elaboradas con timol, se obtuvieron EC del 43% (Wattanasatcha et al., 2012). Además de la alta EC, es importante destacar la escalabilidad del método de fusión-dispersión, ya que resulta ser una metodología fácil y relativamente rentable para ser aplicada por la industria de los insecticidas. Adicionalmente, pensando en el desarrollo de tecnologías en relación con la química verde, el método de fusión-dispersión es una técnica que permite obtener NP poliméricas biodegradables, libres de solventes, que pueden dispersarse fácilmente en soluciones acuosas y amigables con el ambiente con potencial para ser incorporadas en las estrategias MIP. Finalmente, podemos sumar las ideas aportadas por algunos autores, quienes describieron que las formulaciones basadas en PEG son más efectivas que los productos comerciales conocidos para el control de insectos y nematodos (Loha et al., 2012).

En el bioensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas, todas las NPAE mejoraron significativamente la actividad insecticida de los compuestos bioactivos, entre 1,54 y 3,54 veces en adultos de *P. interpunctella*. En el caso de los ensayos de toxicidad por exposición a vapores, solo las NPAE de palmarosa y de menta potenciaron la actividad biológica de los AE entre 1,26 y 4,45 veces. A la luz de estos datos, es interesante destacar que esta mejora en la actividad insecticida de las NPAE comparadas con sus AE, es un resultado alentador para la puesta en práctica de estas NP para tratar y proteger los productos almacenados frente a los ataques producidos por *P. interpunctella*. Varios estudios han demostrado que las NPAE elaboradas con el método de fusión-dispersión aumentan la

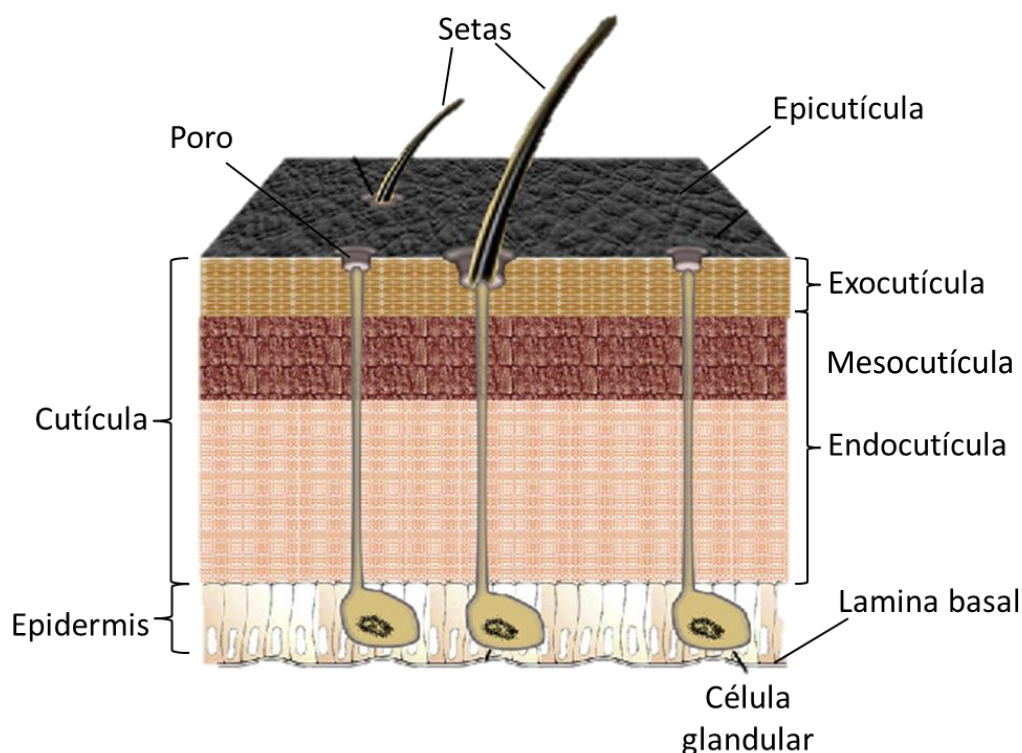
actividad insecticida por contacto de los AE. Campolo et al. (2017) informaron que las NPAE de distintos cítricos incrementaron la actividad tóxica de los componentes activos de los AE en *T. absoluta*. Recientemente, Yeguerman et al. (2020) informaron que las NPAE de palmarosa y menta potenciaron la toxicidad entre 8 y 10 veces en adultos de *B. germanica*. Por otra parte, Werdin-González et al. (2015) demostraron que las NPAE de geranio y bergamota aumentaron entre 10 y 11 veces el efecto tóxico en *B. germanica*. Además, estas mismas NP potenciaron entre 4 y 8 veces la actividad biológica de los aceites de geranio y bergamota en *R. dominica* (Werdin-González et al., 2014). Por su parte, Yang et al. (2009) demostraron que las NP de PEG cargadas con el AE de ajo aumentaron la actividad insecticida en *T. castaneum*. Werdin-González et al. (2014) trabajaron con este mismo insecto plaga y concluyeron que las NPAE de geranio y bergamota también incrementaban el efecto insecticida.

Por lo antes expuesto, se puede concluir en líneas generales que las NPAE de geranio, menta y palmarosa, pueden tener un buen desempeño para el manejo tanto de insectos plaga de productos almacenados como para otros de interés sanitario. Al analizar los datos de toxicidad por exposición a vapores, se observó que únicamente las NPAE de palmarosa y menta potenciaron la actividad biológica de los aceites en *P. interpunctella*. Sin embargo, las NPAE de geranio no causaron este efecto en este insecto plaga. Resultados similares en *R. dominica* y *T. castaneum* se obtuvieron con NPAE de geranio, donde no se encontró un fenómeno de potenciación (Werdin-González et al., 2014).

En la actualidad los nanomateriales han contribuido al desarrollo de los insecticidas botánicos basados en AE. Estos materiales modifican las propiedades químicas y físicas de los componentes activos (de Oliveira et al., 2018). Las NP son nanosistemas que presentan una gran relación superficie/volumen, lo que permite que tales sustancias tengan características únicas que están ausentes en partículas de mayor tamaño (Pascoli et al., 2019). De esta manera, las NP poliméricas podrían potenciar la actividad insecticida debido a que presentarían una capacidad mayor para penetrar la cutícula de los insectos en comparación

con los AE libres (Khandelwal et al., 2016). La cutícula de los insectos puede considerarse una estructura de dos fases: una lipofílica y otra hidrofílica. La primera está constituida por la epicutícula y la exocutícula, que en general poseen menos de un 10% de agua y la segunda está formada por la endocutícula, que puede contener entre un 40 y un 75% de agua (Lamina 2.3) (Merzendorfer, 2013; Tak e Isman, 2015).

**Lamina 2.3.** Esquema general de la cutícula de los insectos.



En general se acepta que los AE, por su naturaleza no polar, tienden a migrar por difusión horizontal a través de la epicutícula y la exocutícula, debido a que la endocutícula actúa como barrera hidrofílica. En este punto es donde los efectos de las NPAE empiezan a jugar un rol crucial en la penetración de los componentes activos del AE. Es importante recordar entonces la naturaleza anfifílica del PEG 6000, factor clave en la producción de las NPAE, el cual podría estar promoviendo que las NP logren no solo una difusión horizontal sino también una difusión vertical a través de la endocutícula del insecto. Así, la nanoformulación de los AE aumenta la capacidad de penetración en toda la cutícula y los productos pueden alcanzar más fácilmente

los órganos blanco en los insectos (Hashem et al., 2018). Además, dado el tamaño nanométrico, estas NPAE pueden cubrir grandes áreas de la cutícula del insecto, aumentando el tiempo de exposición a los compuestos bioactivos. Se ha postulado también que durante el proceso de elaboración de las NP, los cambios en los perfiles químicos de los componentes activos del AE pre y post formulación podrían aumentar la disponibilidad de los compuestos más tóxicos para los insectos, mejorando la efectividad del producto final (Lavicoli et al., 2017).

En este trabajo se observó que la composición química de los AE se vio modificada al ser formulados, ya que los compuestos minoritarios disminuyeron, aumentando la proporción de los mayoritarios. El ejemplo más notorio de esta situación fue con las NPAE de menta. En este caso, el mentol, compuesto mayoritario de este aceite, que representaba el 52% del total de los componentes paso a constituir el 81%, en la etapa de postformulación. Este fenómeno podría explicar el efecto significativo que tuvieron las NPAE en la potenciación de la actividad de este AE en *P. interpunctella*.

Cuando se analizaron los efectos de las NPAE por exposición a vapores, los resultados variaron. Las NPAE de menta y palmarosa potenciaron la actividad insecticida en comparación con sus AE. Probablemente, este fenómeno se deba a la alta relación superficie volumen que presentan las NP, lo que facilita la volatilización del producto y genera a su vez una liberación controlada del mismo. A esto hay que sumarle los efectos de la cámara fumigante que retiene los vapores de los AE en comparación con los ensayos por contacto. Resultados similares se encontraron al utilizar NP de quitosano cargadas con AE de menta en *T. castaneum* y *S. oryzae* (Rajkumar et al., 2020). Sin embargo, las NPAE de geranio, no potenciaron la actividad fumigante del AE en *P. interpunctella*. Esto podría deberse a que una vez formulado el AE se establezcan interacciones particulares entre los componentes bioactivos de este aceite y la matriz polimérica, que modifiquen la tasa de evaporación de los mismos. Al trabajar con NPAE de geranio en *T. castaneum* y *R. dominica* se observó que la nanoformulación no potenciaba la actividad fumigante del aceite (Werdin et al., 2014). Las NP de quitosano cargadas con AE de

*Achillea millefolium* L. (Asterales, Asteraceae) fueron menos efectivas que el aceite libre en ensayos por exposición a vapores con *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata, Tetranychidae) (Ahmadi et al., 2018a). Resultados similares se hallaron en este artrópodo, trabajando con estas mismas NP, pero cargadas con AE de *Satureja hortensis* L. (Lamiales, Lamiaceae) (Ahmadi et al. 2018b). Las NP con metil celulosa y alcohol polivinílico cargadas con el AE de *Artemisia haussknechtii* Boiss (Asterales, Asteraceae) no potenciaron la actividad fumigante del AE en *T. castaneum* y *S. oryzae* (Khanahmadi et al., 2017). Es importante destacar que en la bibliografía no abundan los trabajos que aborden las temáticas de la actividad insecticida de las NP por exposición a vapores, y por lo tanto sería interesante profundizar estos trabajos para elucidar los mecanismos asociados a la actividad fumigante de estos productos.

Además, en esta tesis, se analizó la influencia de la temperatura sobre la eficacia de los AE y sus NP como insecticidas para el manejo de *P. interpunctella*. Es importante resaltar que hasta el momento, este es el primer trabajo que analiza el efecto de la temperatura post-aplicación sobre la actividad insecticida de NP poliméricas. Del análisis de los datos se puede decir que a todas las temperaturas estudiadas (17, 24 y 31 °C), el AE de palmarosa y sus NP mostraron la mayor actividad insecticida en adultos de *P. interpunctella*, ya sea por exposición a superficies tratadas, como así también por exposición a vapores. Se debe tener en cuenta que los AE contienen mezclas complejas de compuestos con diferentes mecanismos de acción, especialmente a nivel del sistema nervioso (Pavela y Benelli, 2016). Por ejemplo se ha reconocido que el geraniol producen una inhibición competitiva reversible sobre la acetilcolinesterasa (Campos et al., 2019). Cabe recordar que tanto el aceite de palmarosa y el de geranio como sus NP contienen como componentes mayoritarios al geraniol y  $\beta$ -citronelol. Sin embargo, la concentración de estos constituyentes difiere sustancialmente entre un tipo de AE y otro. En el caso del aceite de palmarosa y sus NPAE, el geraniol representa más del 75% y el  $\beta$ -citronelol, aproximadamente el 10%. En contraposición, en el AE de geranio la proporción de estos dos compuestos tiende a ser equivalente tanto para las muestras



preformulación como en las postformulación. Estas variaciones en la concentración de los compuestos pueden influir claramente en la efectividad de un AE como insecticida generando una toxicidad diferencial.

Una de las variables más utilizadas en los estudios que comparan la toxicidad de diferentes sustancias a distintas temperaturas es el coeficiente de temperatura (CT), el cual muestra el cambio en la toxicidad de los insecticidas a medida que son expuestos a variaciones de la temperatura (Ma et al., 2012). En el ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas, llevado adelante en este trabajo se determinó que la actividad insecticida de los AE y sus NPAE en adultos de *P. interpunctella* aumentaba a medida que la temperatura disminuía. Este dato se desprende de los valores negativos obtenidos del análisis de los CT para los AE de palmarosa, geranio y menta y también para sus NPAE. Por otra parte, en el ensayo de toxicidad por exposición a vapores se observó que a las temperaturas estudiadas, los cambios en esta variable no generaban modificaciones significativas de la actividad insecticida de los AE y de sus NPAE.

Estudios previos demostraron los cambios en la actividad insecticida de distintos productos frente a la variación en la temperatura. Por ejemplo, los piretroides como la cipermetrina, el fenvalerato, el flucitrinato y la permetrina tuvieron coeficientes de CT negativos en los intervalos de temperatura de 14 a 23 °C y de 23 a 31 °C, en *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) (Grafius, 1986). Una disminución de la toxicidad de los piretroides con el aumento de la temperatura (hasta los 32 °C) se observó en *Gryllus pennsylvanicus* Burmeister (Orthoptera, Gryllidae), *Peridroma saucia* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae), *Hylemya antiqua* Meigen (Diptera, Anthomyiidae) y *Phylotreta cructerae* Goeze (Coleoptera, Chrysomelidae) (Harris y Kinoshita, 1977). Resultados similares se hallaron en la toxicidad de piretroides en *Heleothis virescens* F. (Lepidoptera, Noctuidae) y *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera, Noctuidae) (Sparks et al., 1982). Se demostró que la lambdacialotrina y la bifentrina reducían su actividad insecticida cuando la temperatura se

incrementaba de los 24 °C a los 35 °C (Musser y Shelton, 2005). En lo que respecta al primer trabajo de AE y temperatura, se informó que la aplicación por tópico del AE de *Thymus vulgaris* L. (Lamiales, Lamiaceae) combinada con el uso de temperatura exhibe valores de CT negativa en *S. littoralis* (Pavela et al., 2018). Este mismo AE en un ensayo de toxicidad por contacto en *Cx. quinquefasciatus* mostró valores de CT positivos. Por otro lado, se observó valores de CT positivos al exponer a *A. obtectus* a polvos de lavanda mediante un tratamiento por contacto (Bohinc et al., 2013).

No solo los valores de CT dependen de la temperatura y el tipo de insecticida sino también de la especie del insecto plaga y de la forma en que se lo expone al tratamiento. Estos datos son de vital importancia al pensar en la mejor estrategia de manejo para cada tipo de insecto plaga. Los valores de CT negativos encontrados en los ensayos por exposición a superficies tratadas llevados a cabo en esta tesis, podrían ayudar a comprender algunos mecanismos fisiológicos básicos involucrados en los efectos toxicológicos de los AE y las NPAE en *P. interpunctella*. Los posibles mecanismos que podrían estar explicando la actividad insecticida de estos productos en relación con los valores de CT negativos serían el incremento en la neurotoxicidad intrínseca, la reducción en la tasa metabólica y las diferencias en los patrones de penetración de las sustancias (Alzogaray et al., 1998). Con respecto a este último aspecto, se sugiere que la cutícula absorbe más insecticida a una temperatura más baja y, por lo tanto, se incrementa la disponibilidad del producto (Zubari y Cutkomp, 1964). Además de estos efectos, una temperatura más baja conduce a una disminución de la actividad metabólica de los insectos, reduciendo tanto la actividad locomotora como la tasa de detoxificación lo que amplía el tiempo de exposición de estos a los productos (Musser y Shelton, 2005). Esto explicaría en parte los resultados observados en los AE y las NPAE de palmarosa, geranio y menta.

Por último, y teniendo en cuenta que en los ensayos por exposición a vapores los valores de CT no fueron significativos, es posible suponer entre 17 y 31 °C la volatilización de los componentes de los AE libre como encapsulados no se modificó significativamente.

## 2.E. Conclusiones

- ✓ Mediante el método de fusión-dispersión utilizando PEG 6000 como sistema matricial, es posible obtener NP poliméricas de los AE de palmarosa, geranio y menta.
- ✓ Las NP de palmarosa tuvieron un tamaño de 191 nm, mientras que las de geranio de 259 nm. Además ambas NP mostraron una EC cercana al 90% y fueron monodispersas (IPD < 0,25). Por microscopia electrónica de barrido (MEB) se observó que las partículas fueron homogéneas y presentaron una forma circular. Al analizar la composición química de los AE pre- y post formulación se determinó que las NP de palmarosa mantienen todos sus componentes, mientras que en las NP de geranio persisten aquellos que en el AE libre se hallaban por encima del 3%.
- ✓ Las NP de menta tienen un tamaño de 380 nm, fueron polidispersas (IPD > 0,4) y poseen una EC del 72%. Las NP poseen formas variadas con contornos irregulares y mantuvieron los componentes que en el AE libre tenían una representación mayor al 6%.
- ✓ A 17°, 24°, 31 °C, las NP potencian el efecto insecticida por exposición a superficies tratadas en adultos de *P. interpunctella*, en relación con los AEs libres. Por exposición a vapores, las NP de palmarosa y menta potencian el efecto insecticida en comparación con el AE libre.
- ✓ El AE de palmarosa fue el que mostró el mayor efecto insecticida en comparación con el resto de los AE y su actividad insecticida óptima se observa a los 17 °C. A su vez sus NPAE también presentaron a esta temperatura la mayor actividad insecticida, siendo de esta manera las NP más efectivas de las tres en estudio.
- ✓ La temperatura tuvo un efecto significativo sobre la actividad insecticida de los AE y de sus NPAE, cuando estos productos fueron usados para tratar superficies.
- ✓ No se registró efecto alguno de las temperaturas, cuando estas se emplearon en los ensayos por exposición a vapores.

Los nanosistemas aquí estudiados podrían ser considerados como herramientas para el manejo integrado de *P. interpuctella* con bajo impacto en el ambiente y en la salud de la población. Sin embargo, en el futuro se necesitan más estudios para determinar los mecanismos fisiológicos responsables de la relación entre la toxicidad de las NPAE y la temperatura ya que esta es un tema central para la aplicación exitosa de la nanotecnología para el manejo de este insecto plaga.

## 3. Otra parte del trayecto: Nanoformulaciones Acuosas

---

### 3.A. Introducción

#### 3.A.1. Contexto del desarrollo de micro/nanoemulsiones

En las últimas décadas aumentaron las investigaciones sobre nuevos nanosistemas emulsionantes. La nanoformulación de diferentes productos tiene como objetivo general el aumento de la biodisponibilidad y de la solubilidad de los ingredientes activos mediante el incremento de la estabilidad (cinética o termodinámica) y la reducción de tamaño (Du et al., 2016). Es por esto que en la actualidad el uso de las micro y nanoemulsiones (MEs/NEs) creció en forma sostenida en industrias como la farmacéutica, la cosmética y la alimenticia (Chevalier y Bolzinger, 2019). Esta aplicación a escala industrial se debe, por un lado, a que los procesos de obtención de nanoformulaciones emplean técnicas con altos rendimientos energéticos lo que permite ahorrar costos. Por otro lado, los equipos utilizados para llevar adelante estas técnicas suelen ser relativamente fáciles de manejar por parte de los usuarios (Anton y Vandamme, 2010). Adicionalmente, en los últimos años, las nuevas generaciones de consumidores demandan productos más saludables, con mejores valores nutricionales y más amigables con el ambiente. Es en este punto donde las nanoformulaciones acrecientan también su valor (Assadpour, y Jafari, 2019). Sin embargo, para que las mismas alcancen un éxito aún mayor en el mercado se requieren más investigaciones sobre su estabilidad (Gupta et al., 2016).

En general, los procesos de micro y nanoemulsión consisten en la inclusión de ingredientes bioactivos dentro de matrices que permiten proteger estos componentes de condiciones tales como las altas temperaturas, los agentes oxidantes, la luz, las variaciones de pH o las interacciones indeseadas con otros compuestos. A su vez, estos procesos incrementan la vida media de los productos y generan un mecanismo de liberación controlado de los ingredientes activos (Ferreira y Nunes, 2019).

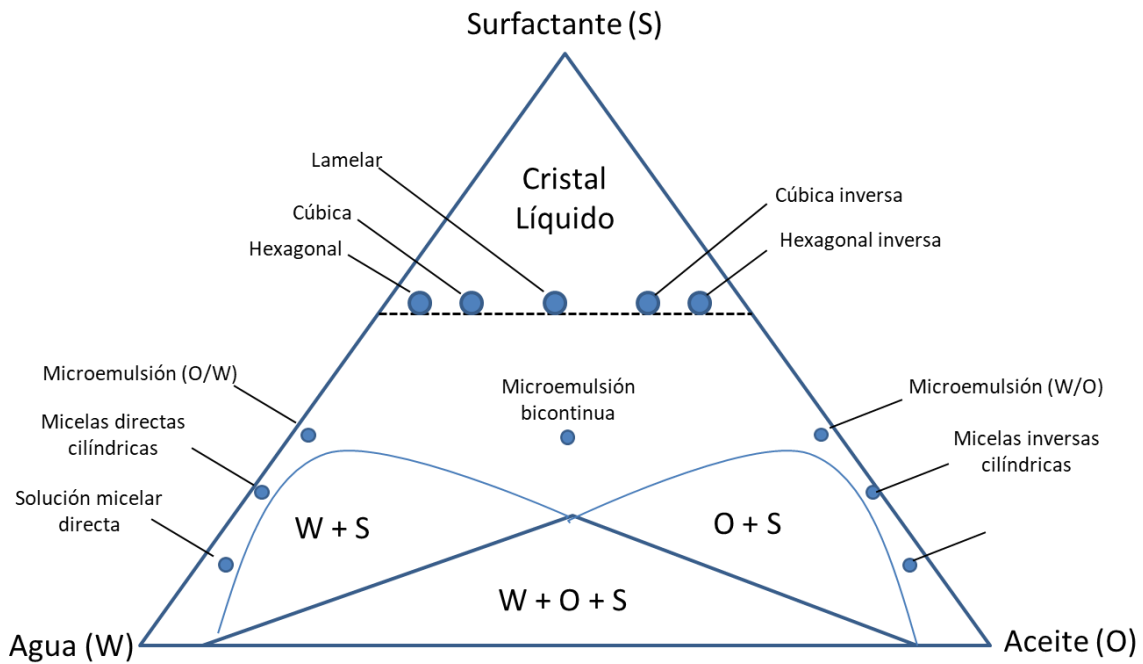
La mayoría de las MEs y NEs usadas son del tipo aceite en agua. El núcleo de las nanogotas confiere a estos tipos de sistemas, una propiedad específica, que es la alta capacidad de carga para ingredientes activos lipofílicos. Además, proporcionan un transporte más efectivo a un blanco biológico gracias a los pequeños tamaños de gota que pueden alcanzar (Chevalier y Bolzinger, 2019).

Antes de continuar con las aplicaciones de estos sistemas, es un buen momento para aclarar cierta confusión que suele ocurrir entre los sistemas termodinámicamente estables, llamados MEs, y los sistemas termodinámicamente inestables (pero cinéticamente estables), llamados NEs.

### **3.A.2. Definición de MEs y NEs**

Las MEs son un tipo particular de emulsiones que poseen tamaños de gota menores de 200 nm y que requieren para su formación grandes cantidades de tensioactivo. En el proceso de formación de MEs, se logra un equilibrio termodinámico entre todos los compuestos del sistema (generalmente agua, aceites y moléculas anfifílicas no iónicas o iónicas), por lo que se forman espontáneamente. Este estado de equilibrio termodinámico depende de las variables como la temperatura, la presión y los componentes del sistema (Rao y McClements, 2012). Atendiendo a las variaciones de las proporciones de estos componentes se construyen los diagramas de fases. Un diagrama de fases es un gráfico que se utiliza comúnmente en las ciencias químicas para visualizar las condiciones bajo las cuales una sustancia existe en una fase dada y los cambios que puede sufrir en otras condiciones. En particular, un sistema ternario que consta de tres componentes, por ejemplo aceite-tensioactivo-agua, puede ser representado en forma de un triángulo equilátero, siempre y cuando la temperatura y la presión se mantengan constantes (Arteaga, 2006). Cada una de las fases, dentro de este triángulo, puede exhibir tipos muy diferentes de morfologías a escala nanométrica como las micelas esféricas, los cristales líquidos, MEs, entre otras (McClements, 2015).

**Lámina 3.1.** Diagrama de fases idealizado, tomado y adaptado de Salager et al. (2001)



Los compuestos tensioactivos tienen un rol preponderante en la formación espontánea de una ME, debido a que presentan dos regiones de solubilidad: una con el aceite y la otra con el agua (Lukowicz et al., 2014). Teniendo en cuenta la importancia del tensioactivo y para interpretar el fenómeno de estabilización de las MEs es importante la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

donde  $\Delta G$  representa la energía libre del sistema, el término  $\gamma \Delta A$  indica la contribución de superficie (siendo  $\gamma$  la tensión interfacial y  $\Delta A$  el área superficial creada) y  $T \Delta S$  representa la contribución de la entropía (Rodríguez Gómez, 2017).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables porque su energía libre de formación ( $\Delta G$ ) es mayor que cero y por lo tanto la tendencia espontánea es a la separación de las fases. La tensión interfacial en las emulsiones es generalmente alta dada la baja cantidad de surfactante que estas poseen, y que conjuntamente con el gran área interfacial de las gotas da como resultado una alta energía interfacial (representado en el término  $\gamma \Delta A$ ). A esto se le debe sumar que la entropía de formación de la emulsión es relativamente pequeña, dado que



las gotas no son ni muy pequeñas ni numerosas. Estos dos factores hacen  $\Delta G \geq 0$ , por lo que la emulsión es termodinámica inestable (cuadro 3.1).

Por otra parte, las microemulsiones son termodinámicamente estables, porque el término de energía interfacial es muy pequeño por las tensiones ultra bajas, causadas por las altas cantidades de surfactante empleado (cuadro 3.1). Además, como resultado del tamaño muy pequeño y el número de las gotas, la entropía de formación positiva es de mayor orden que en las emulsiones superando al término  $\gamma\Delta A$ . En consecuencia, en la MEs el  $\Delta G \leq 0$  y hace que el sistema sea termodinámicamente estable.

**Cuadro 3.1. Comparación de las propiedades fisicoquímicas entre emulsiones/nano/microemulsiones**

Propiedades	Emulsiones	Nanoemulsiones	Microemulsiones
Aspecto visual	Blanco	Transparente	Transparente
Diámetro característico	>1 $\mu\text{m}$	10-200 nm	10-200 nm
Estabilidad		Cinética	Termodinámica
Formación		Aporte de Energía	Espontanea
Concentración de tensioactivo		Baja	Alta

Por lo anteriormente expuesto, es que la producción de una ME requiere grandes cantidades de tensioactivo, contribuyendo a la formación de micelas y disminuyendo la energía interfacial. Sin embargo esta disminución de energía muchas veces no es suficiente, por lo cual generalmente se requiere la adición de un cotensioactivo, cuya función será disminuir aún más esta energía. Los cotensioactivos utilizados comúnmente son alcoholes de cadena de longitud mediana (Dizaj, 2013).

Las NEs son sistemas formadas por gotas muy pequeñas (comúnmente gotas de aceite en agua) que presentan tamaños inferiores a los 200 nm. Al igual que las emulsiones (cuyas gotas son mayores a 1  $\mu\text{m}$ ), las NEs son inestables analizándolas desde un punto de vista termodinámico ya que su  $\Delta G \geq 0$  y, por lo tanto, es necesario el aporte de energía para su formación (cuadro 3.1). Sin embargo, debido a que la cinética de desestabilización de las NEs es tan lenta (meses), son consideradas como productos cinéticamente estables. Esto se debe

principalmente al pequeño tamaño de las gotas, lo que previene su coalescencia (Yukuyama et al., 2016).

El proceso de formación de NEs consiste en mezclar dos fases líquidas a temperatura ambiente, una es una fase lipofílica en la que se solubiliza un tensioactivo y la otra, una fase acuosa, que puede ser agua. Una vez que estos dos líquidos se ponen en contacto, las regiones hidrofílicas del tensioactivo contenidas en la fase oleosa interaccionan rápidamente con la acuosa. Gracias al aporte de energía externa al sistema se induce la formación de nanogotas de aceite estabilizadas por los compuestos anfifílicos (Homs et al., 2018). Como ya se indicará, para la obtención de NEs estables se requiere siempre de la adición de energía al sistema por algún mecanismo, que puede ser de baja energía (“low-energy”) o de alta energía (“high-energy”).

Los métodos de baja energía utilizan el aporte energético del potencial químico de los componentes del nanosistema. Las NEs se forman espontáneamente en la interfaz entre el aceite y el agua mediante una mezcla suave de los componentes. La emulsificación espontánea se puede controlar de dos maneras. Una es mediante el cambio de la temperatura del sistema sin alterar su composición. La otra es manteniendo la temperatura constante y variando la composición del sistema o las propiedades interfaciales. De acuerdo a lo antes expuesto se describen a continuación los métodos más comunes:

- **Inversión de fases PIT (*Phase inversion Temperature*):** Este método fisicoquímico para la obtención de NEs consiste en forzar la inversión de fases desde una emulsión W/O a una O/W, o viceversa, al variar la temperatura, cambiando de esta manera la hidrofilia o lipofilia del tensioactivo. Este cambio en la temperatura modifica la hidratación de las cabezas polares de los tensioactivos no iónicos cambiando su curvatura espontáneamente e induciendo la formación de las NEs (Anton y Vandamme, 2009).

- **Método de inversión de composición (*Phase Inversion Composition*):** En esta técnica, la formación de las NEs está dada por el cambio en el comportamiento hidrofílico-lipofílico del tensioactivo. Esto se consigue al variar la composición de las sustancias que constituyen el sistema. Por ejemplo: al agregar sal a un sistema O/W con emulsionante iónico, la carga eléctrica del surfactante cambia y se convierte en un sistema W/O, induciendo la formación de la NEs (Maestro et al., 2008). De manera similar, una emulsión de W/O con un alto contenido de sal se puede convertir en una O/W al diluirla (Liew et al., 2010). Sin embargo, este método es difícil de utilizar para compuestos altamente hidrófobos (Gómez Vega, 2014; Witthayapanyanon et al., 2006).

Por otra parte, Kale y Deore (2017) clasificaron los métodos de alta energía en 3 tipos:

- **Homogeneización a alta presión:** Para este proceso se utiliza un homogeneizador de alta presión especialmente diseñado para producir partículas de tamaño nanométrico. A una presión muy alta (500 a 5000 psi), se permite que la fase de aceite y la fase de agua entren a través del pequeño orificio. Por lo tanto, se crean gotas de tamaño nanométrico debido a la fuerte turbulencia y al cizallamiento hidráulico. Es decir que la presión y los ciclos de homogeneización son directamente responsables del tamaño de las gotas; es así que a mayor presión y mayores ciclos de homogeneización, menor es el tamaño de las mismas.
- **Microfluidización:** en este método también se requiere un dispositivo especialmente diseñado llamado microfluidizador que se utiliza para crear alta presión (500 a 20000 psi). Inicialmente se prepara una emulsión madre mezclando las fases de aceite y agua. El dispositivo consiste en una cámara de interacción de pequeños microcanales a través de los cuales la emulsión madre es forzada a atravesar un área porosa que permite la formación de gotas de tamaño nanométrico. A este proceso le sigue entonces una filtración para obtener partículas uniformes.

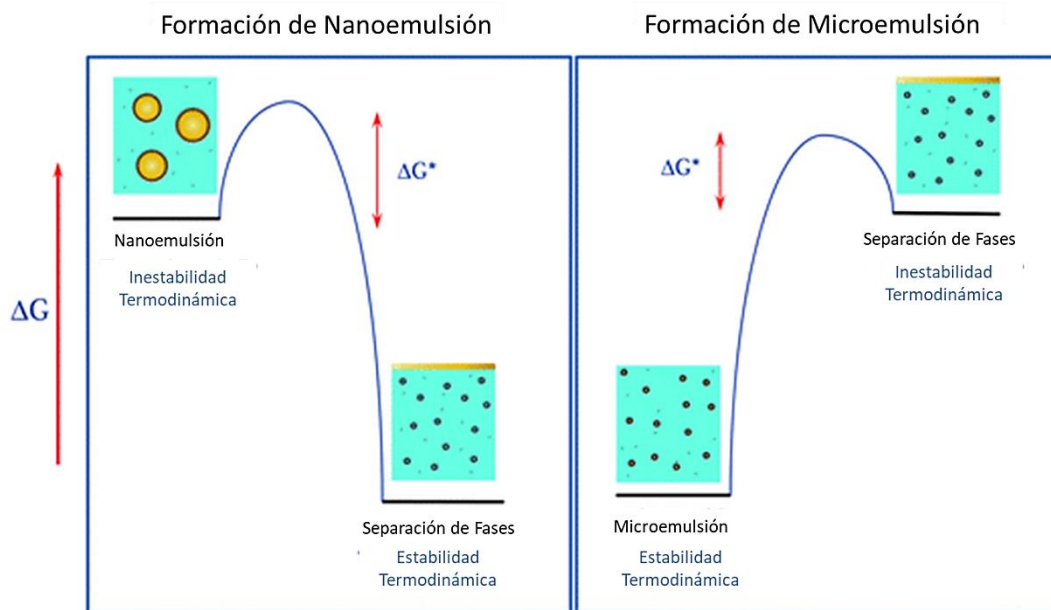
- **Ultrasonido:** La técnica de ultrasonido utiliza una sonda ultrasónica que produce ondas para reducir las gotas de la emulsión madre. Estas ondas de ultrasonidos proporcionan una fuerza de gran intensidad que permite convertir las gotas más grandes, mediante una ruptura mecánica, en gotas de menor tamaño. La técnica ofrece algunas ventajas tales como un mejor control sobre las variables de formulación y un costo de producción relativamente bajo.

### **3.A.3. Principales diferencias entre MEs y NEs**

En los últimos años abundan en la literatura conceptos erróneos relacionados a las MEs y NEs. El problema, sin duda, se origina en el hecho de que en condiciones experimentales particulares, con ciertas composiciones y temperaturas, las MEs pueden parecerse mucho a las NEs. Esto a menudo conduce a una mala interpretación de las propiedades de los sistemas generados, lo que resulta en el planteo de objetivos y de metodologías inapropiados para caracterizar a estas formulaciones (Anton y Vandamme, 2010).

La diferencia fundamental entre ambos tipos de emulsiones, es que las MEs, a diferencia de las NEs, son termodinámicamente estables (Gupta et al., 2016). Como se observa en la lámina 3.2, la energía libre de las MEs es menor que la energía libre de separación de fases. Esto significa que las MEs son estables termodinámicamente. Por otra parte, la energía libre en las NEs es mayor que la energía libre de separación de fases (agua y aceite), esto implica que las NEs sean termodinámicamente inestables. La alta estabilidad cinética de las NEs se logra gracias al aporte de energía durante su formación (Cornejo Arostegui, 2017).

**Lámina 3.2.** Diferencias entre la formación de una NEs y una MEs en base a la estabilidad termodinámica y a los cambios en el  $\Delta G$ .



Otra de las principales diferencias entre las MEs y las NEs es su comportamiento frente a las fluctuaciones de temperatura y a las diluciones. Concretamente las nanoestructuras de las MEs se ven fuertemente afectadas e incluso se pueden romper por cambios de temperatura o diluciones, mientras que las NEs siempre permanecerán estables en tales condiciones de estrés (Solans y Solé, 2012). Entender la posibilidad de sufrir cambios según el tipo de nanosistema con el que se esté trabajando resulta ser un factor clave a tener en cuenta, ya que esto podría derivar en conclusiones erróneas.

Otro de los aspectos que diferencia a ambos nanosistemas, es la metodología de elaboración de cada uno. Mientras que en las MEs el orden en que se mezclan los productos no altera de ninguna manera su formación, en las NEs el orden de agregado de los materiales es de vital importancia. En este último caso, siempre se debe mezclar primero el aceite con el surfactante y luego se debe proceder al agregado de agua. Si se realizara este proceso en otro orden, lo que se obtiene es una emulsión convencional (Thakur et al., 2013).

Una distinción más entre MEs y NEs, se relaciona con la distribución del tamaño de partícula. Al ser analizadas por DLS, las MEs de aceite en agua tienden a mostrar un solo pico estrecho, mientras que las NEs pueden tener un pico único o picos múltiples que pueden ser estrechos o anchos. Por lo tanto, si en una dispersión coloidal se encuentra un único pico estrecho, entonces puede ser una MEs o una NEs, pero si contiene picos múltiples o picos anchos, entonces probablemente sea una NEs (McClements, 2012).

Una diferencia final está relacionada con el uso de diagramas de fases. Esta forma de analizar una formulación solo es válida para analizar las MEs en donde las cantidades que se agregan de cada sustancia son claves para la formación espontánea del sistema, mientras que en las NEs se debe tener en cuenta además la técnica y los equipos usados para el desarrollo de la emulsión (Anton y Vandamme, 2010). Por lo tanto la construcción de diagramas de fase ternarios con una NE es una práctica errónea, que a menudo se lleva a cabo.

#### **3.A.4. Aplicación de las NEs**

Las NEs tienen propiedades únicas como son el tamaño nanométrico, su estabilidad y su apariencia transparente. Tales propiedades convierten a estos nanosistemas en candidatos atractivos para aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, así como también para el desarrollo de nuevos materiales con características únicas (Gupta et al. 2016).

En lo que respecta a la industria farmacéutica, las propiedades lipofílica de las NEs se han aprovechado para formular soluciones acuosas con distintos fármacos que puedan administrarse fácilmente al paciente. Aunque la piel brinda protección frente al entorno, también actúa como una barrera que impide el transporte de medicamentos a través de ella. Por eso, la administración por tópico de las NEs se ha estudiado ampliamente debido a los beneficios que podrían presentar estas formulaciones dado el pequeño tamaño de gota y el bajo potencial Z, lo que da una mayor capacidad de entrega de los fármacos hidrofóbicos en comparación con la simple suspensión de los mismos (Shakeel et al. 2007). Los investigadores

también han explorado el uso de NEs empleando otros modos de administración, como ocular, intravenosa, intranasal y oral. En estos estudios, las formulaciones se probaron para determinar su biodisponibilidad y eficiencia de administración, obteniéndose resultados prometedores (Ammar, et al. 2009)

Las NEs también han demostrado su campo de acción en la industria alimentaria, ya sea para la preservación de los alimentos o para diseñar productos inteligentes que contengan ingredientes que de otro modo serían difíciles de incorporar debido a su baja solubilidad en agua (Thiruvengadam et al., 2018). Un ejemplo de esto son las NEs basadas en  $\beta$ -caroteno, el pigmento responsable del color de vegetales como las zanahorias, que posee importantes beneficios para la salud y cuya nanoformulación mostró buenos resultados debido a los tamaños de gota obtenidos y a la estabilidad que las NEs han alcanzado (Yuan, 2008). En este trabajo también se informó que el producto activo nanoformulado tuvo una buena biodisponibilidad en ambientes que simulaban los entornos oral, gástrico e intestinal. Otro ejemplo a citar son las NEs elaboradas a partir de cúrcuma o flavonoides. Las primeras, se estudiaron por sus propiedades antiinflamatorias, con posibilidad de ser incorporadas a los alimentos; mientras que las segundas fueron investigadas por su capacidad para incrementar los sabores de los productos consumidos (Qian et al., 2012).

Otra aplicación de estas nanotecnologías ha sido el uso de los nanosistemas como bloques de construcción para la preparación de materiales más complejos mediante la explotación de su pequeño tamaño y su mayor relación de superficie. Por ejemplo, las NEs se han utilizado ampliamente en la síntesis de polímeros y nanoesferas de sílice (Wu et al., 2013) o también se han realizado NEs que tienen la capacidad de actuar como reactivos en reacciones fotoquímicas, acelerando estos procesos (de Oliveira et al., 2011).

Las NEs cargadas con AE han hecho su irrupción a partir del campo de la bromatología, ya que estos productos naturales pueden actuar como un aditivo que permite extender la vida

útil de los productos alimenticios (Donsi y Ferrari, 2016). Adicionalmente, estos aceites se convierten en un método efectivo para reducir los patógenos transmitidos por los alimentos, sin la necesidad de aplicar compuestos antimicrobianos sintéticos y semisintéticos (Liang, et al., 2012). Debido a las limitaciones que ya se han discutido con respecto al uso de los AE, muchos trabajos se han orientado a su formulación para su uso como antimicóticos y antifúngicos. Entre los aceites que se han utilizado para desarrollar NEs, se pueden destacar los de menta, limoncillo, canela y clavo de olor; además se han utilizado algunos monoterpenos como el timol, limoneno y eugenol. Estas formulaciones se han probado en múltiples organismos tales como *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (Saccharomycetales, Saccharomycetaceae), *Staphylococcus aureus* Rosenbach (Bacillales, Staphylococcaceae), *Bacillus subtilis* Ehrenberg (Bacillales, Bacillaceae), *Escherichia coli* Escherich (Enterobacterales, Enterobacteriaceae), *Listeria monocytogenes* Murray (Bacillales Listeriaceae), *Trichophyton rubrum* Malmsten (Onygenales, Arthrodermataceae) y *Fusarium oxysporum* Schldl. (Hypocreales, Nectriaceae) (Abd-Elsalam y Khokhlov, 2015; Donsi et al., 2011; Flores et al., 2013; Liang et al., 2012; Salvia-Trujillo et al., 2015; Zhang et al., 2014).

Finalmente, en estos últimos años, se incrementaron las investigaciones relacionadas con el desarrollo de las NEs elaboradas con AE en el marco del manejo de insectos plaga de interés económico y sanitario (Ghosh et al., 2013). Estas NEs se probaron como repelentes, atrayentes o como productos que generan efectos letales. En lo que respecta a las investigaciones que utilizan NEs formuladas a partir de la técnica de ultrasonido para el control de organismos plaga, estos trabajos son escasos y entre ellos se puede citar a Hashem et al., (2018), Pant et al., (2014), Pascual-Villalobos et al., (2017) y Sugumar et al., (2014).

Estos trabajos representan algunos ejemplos del poder de las NEs empleadas como bioinsecticidas con un gran potencial para ser aplicadas en diferentes estrategias de manejo de especies plaga. Muchas de estas NEs son de fácil elaboración y de un costo financiero relativamente bajo, lo que las convierte en interesantes candidatas para su uso a nivel masivo.



### 3.A.5. Hipótesis

En base a lo anteriormente expuesto se establecieron las siguientes hipótesis de trabajo:

- Es posible obtener NEs elaboradas con AE y Tween 80, prescindiendo de un co-surfactante.
- El uso de una sonda ultrasónica mejora la relación AE:Surfactante con el fin de obtener NEs con la mayor cantidad de AE posible y la menor cantidad de surfactante.
- Optimizando los parámetros fisicoquímicos y del equipo de ultrasónico se obtienen NEs con tamaños de gota menores a 100 nm.
- Las NEs son sistemas estables a lo largo del tiempo.
- Los nanosistemas de baja estabilidad pueden optimizarse por medio del enriquecimiento de alguno de los constituyentes del aceite.
- Las NEs generan efectos tóxicos por exposición a superficies tratadas en larvas IV y adultos de *P. interpuctella*.
- Las NEs potencian la actividad insecticida de la de  $\beta$ -cipermetrina en larvas IV de *P. interpuctella*.

### **3.A.6.a. Objetivo general**

El objetivo general del capítulo es la elaboración y caracterización fisicoquímica de las NEs de los AE de geranio, menta y palmarosa obtenidas mediante la aplicación de ultrasonido y su evaluación como bioinsecticida para el control de *Plodia interpunctella*.

### **3.A.6.b. Objetivos específicos**

- Diseñar y caracterizar fisicoquímicamente NEs de los AE de menta, geranio y palmarosa.
- Optimizar los parámetros de ultrasonido en la formación de dichas NEs.
- Desarrollar NEs con la mayor cantidad de AE y la menor cantidad de surfactante posible.
- Estudiar la estabilidad de las NEs.
- Mejorar la estabilidad de las NEs del AE de palmarosa con el agregado de acetato de linalilo (AL).
- Evaluar la actividad biológica de estas NEs por exposición a superficies tratadas en larvas IV y adultos de *P. interpunctella*.
- Evaluar la actividad biológica de estas NEs combinadas con un insecticida sintético en larvas del IV estadio de *P. interpunctella*.

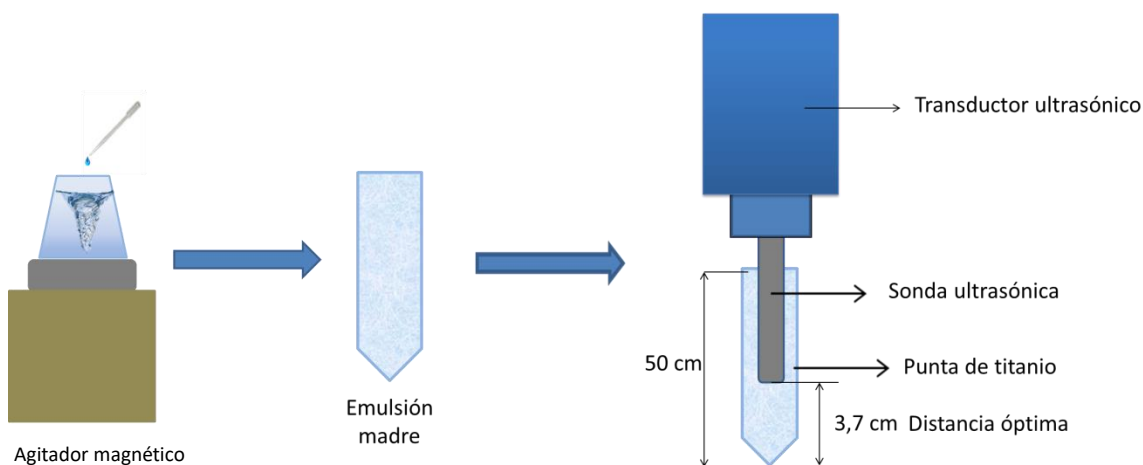
### **3.B. Materiales y Método**

#### **3.B.1. Preparación de MEs y de NEs**

En un estudio preliminar cuyo objetivo fue determinar las cantidades mínimas y máximas de AE y surfactante que son necesarios para el desarrollo de una nanoformulación acuosa, se procedió a la elaboración de MEs cargadas con AE de geranio. Estas MEs se formularon siguiendo la metodología descrita por Montefuscoli et al. (2014) con modificaciones. Para la formulación de las MEs se estudiaron distintas proporciones de AE:Tween 80:etanol (co-surfactante) y su efecto sobre la formación y estabilización de las MEs. Para ello, primero se mezcló el AE con el agente emulsificante y el etanol a 700 rpm por 2 min usando un agitador magnético. Posteriormente, y manteniendo la misma velocidad, se gotearon 25 ml de agua bidestilada para obtener las MEs.

Con el objetivo de optimizar la proporción de AE:surfactante y prescindir del uso de un co-surfactante, se elaboraron NEs utilizando diferentes relaciones de los AE (geranio, menta y palmarosa) con Tween 80. Primero, para la formación de la emulsión madre, el AE y el Tween 80 se colocaron en un vaso de precipitado de 80 ml y se los mezcló a 700 rpm por 2 min usando un agitador magnético. A continuación se gotearon 25 ml de agua bidestilada. Una vez terminado este proceso se traspasó la mezcla a un recipiente plástico de 3 cm diámetro x 50 cm de alto y se aplicó ultrasonido (Fig. 3.1). El equipo usado fue una sonda ultrasónica Sonics Vibra cell, VCX. 130 con una punta de titanio (9,5 mm diámetro, poder nominal de 130 W, frecuencia de 20 kHz). Las condiciones de ultrasonido optimizadas fueron potencia, ciclos, tiempo y distancia de la punta de titanio del ultrasonido a la base del recipiente que contenía la solución madre.

**Figura 3.1.** Representación esquemática del proceso de preparación de las NEs y de los componentes del equipo de ultrasonido.



### 3.B.2. Rol del acetato de linalilo (AL) en la formación de NEs del AE de palmarosa

Las NEs elaboradas con el aceite de palmarosa no fueron estables por sí solas, por lo cual se decidió estudiar el efecto de la incorporación de AL (un compuesto minoritario de este aceite) sobre la estabilidad de las NEs. Para ello, se estudió el comportamiento de diferentes mezclas del AE de palmarosa con AL, en las siguientes proporciones: 0.5:0.5, 0.6:0.4, 0.7:0.3 y 0.8:0.2. A cada una de estas mezclas se añadió Tween 80 para obtener una proporción 1:2. Luego, se incorporó agua bidestilada (25 ml) y se agitó a 700 rpm durante 2 min para lograr una fase homogénea que luego fue llevada a la sonda ultrasónica (parámetros optimizados).

Adicionalmente, se decidió realizar un estudio que involucró al geraniol (el componente mayoritario del AE de palmarosa) y al AL. Con este análisis se buscó determinar el posible efecto de este componente mayoritario en la estabilidad de la NEs del aceite de palmarosa. Para esta parte del trabajo se siguió la misma metodología utilizada en el estudio de las NEs de palmarosa con AL.

### **3.B.3. Caracterización de las MEs y NEs**

#### **3.B.3.a. Tamaño de gota e índice de polidispersión**

Los tamaños promedio de las gotas y el índice de polidispersión (IPD) de las MEs y las NEs se midieron mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un equipo Zetasizer nano instrument ZEN 3690 (Malvern, Reino Unido). Cada medición se realizó a temperatura ambiente y se tomaron tres réplicas por tratamiento.

#### **3.B.3.b Estabilidad de las formulaciones**

Para estudiar la estabilidad de las NEs en función del tiempo se observaron cambios en el tamaño de la gota y en la apariencia visual. Durante este ensayo, las muestras se mantuvieron a 25 °C y se verificaron una vez a la semana. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento.

### **3.B.4. Bioensayo.**

#### **3.B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas**

En este bioensayo se estudió la toxicidad por contacto de las NEs en larvas del IV estadio y adultos de *P. interpunctella*. Para ello, se trataron papeles de filtro (diámetro de 9,4 cm) con 0,7 ml de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL. Las concentraciones abarcaron un rango de 5 a 600  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Luego, los papeles de filtro se colocaron en bases de cajas de Petri (9,4 cm de diámetro x 1,9 cm). A continuación se agregaron 10 larvas o adultos de *P. interpunctella* y se cubrieron con una tela fina tipo voile. Como control se trataron los papeles de filtro con 0,7 ml de una solución de agua y Tween 80. La mortalidad de los adultos se determinó trascurridas 24 h de exposición a los productos y la de las larvas trascurridas 72 h.

#### **3.B.4.b. Ensayo de toxicidad por aplicación tópica**

Para evaluar el efecto combinado de los AE (geranio, menta, y palmarosa con AL) y de sus NEs con la  $\beta$ -cipermetrina se aplicaron alícuotas de cada producto por vía tópica a 10 larvas del IV estadio de *P. interpunctella*. Para llevar adelante el ensayo se realizó un pretratamiento

utilizando soluciones acetónicas de los aceites a la dosis más alta que no generó mortalidad en las larvas y que resultó ser de  $20 \mu\text{g}$  de larva<sup>-1</sup> para los tres aceites. Después de 2 h de aplicado el pretratamiento se topicaron soluciones acetónicas de  $\beta$ -cipermetrina en dosis que fueron desde 0,006 a  $4 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> (valores obtenidos de ensayos previos). En el caso de las NEs se aplicaron a una dosis equivalente a la del AE y luego de las 2 h se procedió a usar el mismo rango de concentraciones de  $\beta$ -cipermetrina que en el ensayo de los AE. Cabe aclarar que previamente se comprobó que a esta dosis las NEs no produjeron efectos letales en las larvas. Para el caso de los controles, uno de ellos se realizó con acetona sola, otro con surfactante solo (en la proporción correspondiente a la usada en la NEs) y un tercero con la aplicación secuencial acetona + surfactante. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y las larvas se mantuvieron a  $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16:8 h L:O. La mortalidad de los insectos se registró después de un periodo de exposición de 72 h.

### **3.B.5. Análisis estadístico.**

Los datos de tamaños de gota e IPD de las MEs y NEs se analizaron por ANOVA y DMS.

En cuanto a los datos de mortalidad de los ensayos por exposición a superficies tratadas se procesaron mediante análisis probit utilizando el software estadístico SPSS 25.0 para obtener los valores de  $CL_{50}$ . Además se estimaron los intervalos de confianza del 95%. Los valores de  $CL_{50}$  se consideraron significativamente diferentes si sus intervalos de confianza del 95% no se superponían. El mismo programa se utilizó para obtener los valores de  $DL_{50}$  y sus intervalos de confianza del 95% en los ensayos por tópico.

### 3.C. Resultados

#### 3.C.1. Resultados preliminares: Tipo de surfactante y MEs

Se utilizó Tween 80 combinado con AE de geranio para para obtener MEs mediante el método convencional de baja energía. Durante este proceso, se analizaron diferentes relaciones de AE:surfactante (desde 1:1 a 1:4) y se mantuvo la proporción constante de etanol como co-surfactante (0,001). Solo se lograron obtener MEs estables con las relaciones 1:4:0,001 y 1:3:0,001 de aceite:Tween 80:etanol. Como se puede observar en la tabla 3.1, las primeras MEs tuvieron un diámetro de gota de 113 nm y un valor de IPD de 0,388, mientras que las segundas mostraron valores similares (tamaño de 122,1 nm y valores IPD de 0,397), no encontrándose diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ). Ambas MEs tuvieron un aspecto macroscópico translúcido. Cabe resaltar que en ausencia del co-surfactante no se lograron obtener MEs.

**Tabla 3.1.** Caracterización de las MEs elaboradas con el AE de geranio y etanol (EtOH) utilizando la técnica convencional. N = 3 réplicas.

AE: Surfactante:EtOH	Tamaño (nm) $\pm$ ES <sup>a</sup>		IPD $\pm$ ES <sup>a</sup>		Aspecto macroscópico
<b>1:4:0,001</b>	113,0 $\pm$ 37,39	A	0,388 $\pm$ 0,015	A	Translúcidas
<b>1:3:0,001</b>	122,1 $\pm$ 38,76	A	0,397 $\pm$ 0,018	A	Translúcidas
<b>1:2:0,001</b>	MEs no formada				
<b>1:1:0,001</b>	MEs no formada				

<sup>a</sup> Los valores seguidos de las mismas letras dentro de la misma fila no muestran diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

Luego de esta primera etapa de experimentos preliminares, y en relación con los objetivos de este trabajo, se incorporó el uso de la técnica de ultrasonido a fin de reducir la concentración de surfactante, prescindir del co-surfactante y mejorar la estabilidad del sistema, por lo cual se prestó atención al diseño de NEs.

### 3.C.2. Preparación de NEs

#### 3.C.2.a. Efectos del ultrasonido.

Para obtener NEs con el mínimo tamaño de gota posible (MTGP) se estudió el efecto de los siguientes parámetros de ultrasonido sobre esta variable: potencia, tiempo de sonicación, ciclos y distancia de la sonda ultrasónica al fondo del recipiente donde se encontraba la emulsión. Se usó como referencia el AE de geranio y el Tween 80 a una proporción 1:2, relación a la cual, anteriormente, no se formaron MEs.

Para comprender el efecto de la potencia del ultrasonido en el tamaño de las gotas de las NEs se analizó un rango que varió desde 26 W a 117 W. Los resultados mostraron que el MTGP se obtuvo con un valor de potencia óptimo fue de 65 W (tabla 3.2).

Con respecto al tiempo necesario para obtener el MTGP, en este trabajo se analizó un rango entre 2 y 5 min, siendo el tiempo de sonicación óptimo de 2 min (tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Análisis de los parámetros de ultrasonido estudiados para la elaboración de las formulaciones del AE de geranio con Tween 80 (1:2)

Variables	Rango estudiado	Valores óptimos
<b>Potencia del ultrasonido</b>	26 W – 117 W	65 W
<b>Tiempo total</b>	2 min – 5 min	2 min
<b>Ciclos</b>	20 on/30 off - 59 on/1 off	30 on/ 20 off
<b>Distancia del ultrasonido</b>	3,5 cm – 5 cm	3,7 cm

Otro factor interesante para la formación de las NEs son los ciclos de trabajo del ultrasonido, ya que el tiempo de cada pulso "on / off" puede cambiar el tamaño de gota. El efecto de los ciclos en la producción de las NEs del AE de geranio se evaluó utilizando pulsos desde 20 on / 30 off a 59 on / 1 off. El ensayo mostró que los ciclos de 30 on/ 20 off fueron los óptimos para alcanzar el MTGP (tabla 3.2).

Finalmente se estudió la distancia óptima de la sonda ultrasónica. Se puede definir a esta variable como la distancia entre el fondo del recipiente que contiene la NE y la punta de la sonda ultrasónica, a la cual se alcanza el MTGP. En la tabla 3.2 se observa que la distancia de la



sonda ultrasónica se varió desde 3,5 cm a 5 cm. Mediante los experimentos se determinó que la distancia óptima de la sonda ultrasónica fue 3,7 cm (Fig. 3.1).

Optimizados los parámetros de ultrasonido con el AE de geranio (potencia: 65 W, ciclos: 30 on/20 off tiempo de sonicación: 2 min y distancia óptima de la sonda ultrasónica: 3,7 cm) se procedió a optimizar la concentración de surfactante, para luego elaborar las NEs del AE de menta y palmarosa.

### **3.C.2.b. Efecto del co-surfactante y del surfactante en la formación de NEs**

La tabla 3.3 muestra el efecto de la concentración de surfactante y la adición de un co-surfactante (etanol) sobre el tamaño de las NEs elaboradas con el aceite de geranio. En todas las emulsiones formadas usando etanol los tamaños de gota fueron superiores a los 500 nm, no encontrándose diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ). La distribución de tamaño de estas formulaciones fue relativamente homogénea aunque se hallaron diferencias significativas entre los valores IPD la emulsión de AE:Tween 80:Etanol (1:1:0.001) y las demás. En referencia al aspecto macroscópico, las emulsiones fueron de color blanco (Fig 3.2 E - Se decidió por cuestiones prácticas colocar una sola imagen a modo representativo). Dadas las características de estos sistemas, no se estudió la estabilidad luego de 72 h. En base a estos resultados y en relación con los objetivos del trabajo se obvió el uso de etanol para la elaboración de las NE de menta y palmarosa.

En el caso de las NEs de geranio elaboradas sin etanol se encontró que el tamaño de las gotas aumentó cuando se redujo la concentración de surfactante lo que afectó el aspecto macroscópico de las mismas.

Usando las proporciones de AE de geranio:Tween 80 de 1:0,5 se formaron emulsiones blanquecinas. Estas mostraron tamaños de partículas de 79,4 nm y tuvieron un valor alto de IPD (0,386) (Fig. 3.2 D). En la Fig. 3.2 C se observa una NE translúcida que corresponde a la relación AE de geranio:Tween 80 de 1:1. Esta formulación mostró un tamaño de gota de 106,4

nm y un valor de IPD de 0,277. A pesar de su mayor tamaño, no se encontraron diferencias significativas en esta variable con las emulsiones a una proporción 1:0,5. Sin embargo el valor de IPD de este sistema fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) y su aspecto translucido. Por otra parte, cuando se realizaron formulaciones con una relación AE de geranio:Tween 80 de 1:1,5, estas tuvieron un aspecto macroscópico translúcido, con un tamaño de gota promedio de 55,9 nm. Estas emulsiones se excluyeron del análisis estadístico, dado que como puede observarse en el gráfico DLS (Fig. 3.2 B) y en el valor de IPD (igual a 1), tuvieron una distribución bimodal (con un pico en 316,9 nm y otro en 15,20 nm). En lo que respecta al color translucido de estas emulsiones, este podría deberse a que la población mayoritaria de nanogotas se encuentra en torno al pico de 15 nm. Es de resaltar que estas tres emulsiones perdieron su estabilidad luego de 72 h de elaboración. Finalmente, se lograron NEs transparentes y estables después de tres días de formuladas, usando una relación de 1:2 de AE:Surfactante (Fig. 3.2 A). Estos nanosistemas midieron 13,58 nm con un valor de IPD de 0,069. Es importante destacar que este valor de tamaño fue significativamente menor al resto de los sistemas elaborados usando el AE de geranio ( $P < 0,05$ ). Además el valor de IPD fue significativamente menor a los demás sistemas elaborados sin etanol.

La tabla 3.4 muestra las diferentes proporciones de AE de menta:Tween 80. En general, cuando se aumentó la concentración del tensioactivo, el aspecto macroscópico de estos nanosistemas tendió a ser transparente y se redujo el tamaño de gota, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ). Las emulsiones blanquecinas se formaron con la relación AE de menta:Tween 80 1:1 (Fig. 3.3 C). Estas emulsiones tuvieron un tamaño promedio de 102,5 nm y un valor IPD de 0,296. Las NEs con relaciones 1:1,5 mostraron un tamaño de 65,11 nm y un valor IPD de 0,479. Además el aspecto macroscópico fue translúcido (Fig. 3.3 B). Ambos nanosistemas perdieron estabilidad a las 72 h. Finalmente, se lograron NEs transparentes usando la relación AE de menta:Tween 80 de 1: 2 (Fig. 3.3 A). Estas NEs tuvieron tamaños de 33,97 nm, valor de IPD de 0,424, y se mantuvieron estables luego de

3 días. Cabe destacar que a la relación de AE:Surfactante 1:0,5 no se formaron nanosistemas estables.

En el caso del AE de palmarosa, no se logró obtener ninguna emulsión estable con las relaciones de AE:Surfactante de 1:0,5, 1:1 y 1:1,5. Con la relación más alta 1:2, solo se obtuvo una emulsión con tamaño de gota =  $300,2 \pm 53,24$  nm, IPD =  $0,148 \pm 0,021$ , de coloración blanca e inestable (Fig. 3.4 E).

Con el objetivo de mantener las condiciones optimizadas del ultrasonido encontradas con el AE de geranio, se procedió a enriquecer el AE de palmarosa con AL, manteniendo constante la proporción de Tween 80, con el fin de estabilizar las formulaciones. La caracterización del tamaño de gota y los valores IPD de las NEs de palmarosa + AL se presentan en la tabla 3.5 y su apariencia y distribución de tamaño de gota se muestran en la Fig. 3.4. Generalmente, en estos sistemas el tamaño de gota disminuyó cuando el contenido de AL aumentó, afectando también el aspecto macroscópico. Cuando la proporción de AL aumentó en un 20%, el aspecto macroscópico de las formulaciones fue blanquecino (Fig. 3.4 D) con un diámetro de gota de 223,3 nm y con valores de IPD de 0,193. Sin embargo, estos sistemas perdieron la estabilidad a las 72 h. No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de la emulsión elaborada con el AE de palmarosa solo y la formulada con palmarosa + 20% de AL ( $P > 0,05$ ). Cuando se incrementó el AL en 30% y 40%, las NEs de palmarosa + AL exhibieron tamaños de gota de 61,79 y 44,73 nm, respectivamente. Ambas formulaciones tuvieron valores de IPD de 1 y además, la apariencia visual de las NEs fue translúcida (Fig. 3.4 C y B). Es importante enfatizar que ambas NEs se excluyeron del análisis estadístico dado que mostraron una distribución bimodal en la población de las gotas. Sin embargo, estos nanosistemas dan cuenta del efecto positivo del AL en la estabilización de las NEs ya que los mismos fueron estables a las 72 h. Finalmente, se lograron NEs transparentes de palmarosa + AL cuando este último alcanzó el 50% (Fig. 3.4 A). Las mismas midieron 14,73 nm y sus valores IPD fueron 0,078. Estos nanosistemas exhibieron el menor tamaño de gota ( $P < 0,05$ ) y fueron estables a las 72 h.

**Tabla 3.3.** Caracterización de formulaciones de AE de geranio elaboradas con o sin el agregado de etanol (EtOH) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm). N = 3 réplicas.

Geranio : Tween 80	EtOH	Tamaño (nm) ± ES <sup>a</sup>	IPD <sup>a</sup>	Estabilidad a las 72 h	Aspecto macroscópico		
<b>1:2</b>	0.001	545,6 ± 13,00	C	0,102 ± 0,023	C	-	Blanco
<b>1:2</b>	No	13,58 ± 2,30	A	0,069 ± 0,007	B	Si	Transparente
<b>1:1,5</b>	0.001	562,4 ± 4,75	C	0,113 ± 0,012	C	-	Blanco
<b>1:1,5</b>	No	55,92 ± 33,62	-	1 ± 0,0	-	No	Translúcido
<b>1:1</b>	0.001	523,7 ± 53,63	C	0,020 ± 0,004	A	-	Blanco
<b>1:1</b>	No	106,4 ± 44,53	B	0,277 ± 0,017	D	No	Translúcido
<b>1:0,5</b>	0.001	588,1 ± 73,323	C	0,097 ± 0,006	C	-	Blanco
<b>1:0,5</b>	No	79,41 ± 44,30	B	0,386 ± 0,015	E	No	Blanquecino

<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

**Tabla 3.4.** Caracterización de formulaciones de AE de menta utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm). N = 3 réplicas.

Menta : Tween 80	Tamaño (nm) ± ES <sup>a</sup>	IPD <sup>a</sup>	Estabilidad a las 72 h	Aspecto macroscópico		
<b>1:1</b>	102,5 ± 56,04	A	0,296 ± 0,015	A	No	Blanquecino
<b>1:1,5</b>	65,11 ± 48,15	A	0,479 ± 0,014	B	No	Translúcido
<b>1:2</b>	33,97 ± 33,16	A	0,424 ± 0,008	B	Si	Transparente

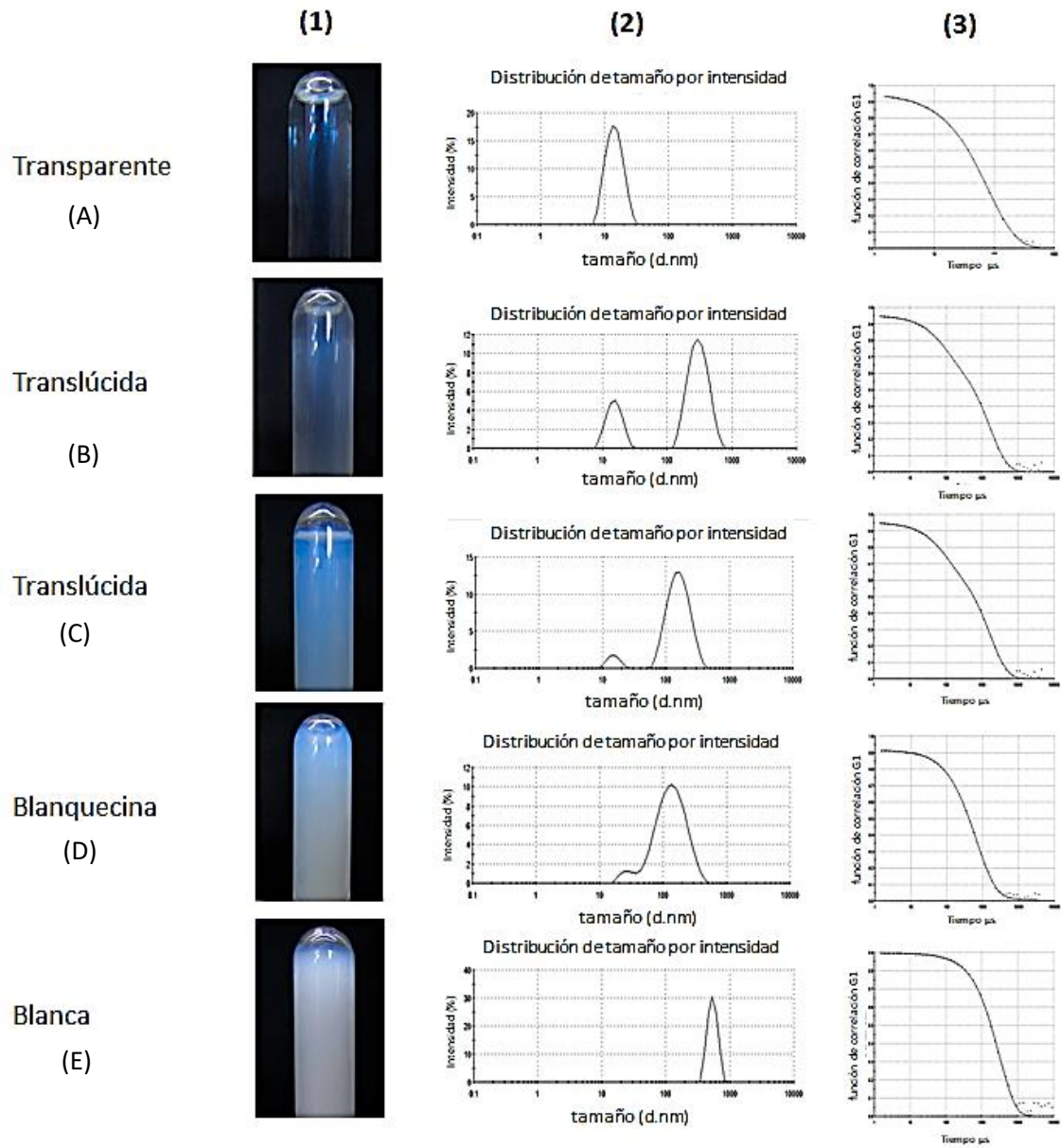
<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

**Tabla 3.5.** Caracterización de formulaciones de AE de palmarosa enriquecidas con acetato de linalilo (AL) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) N = 3 réplicas.

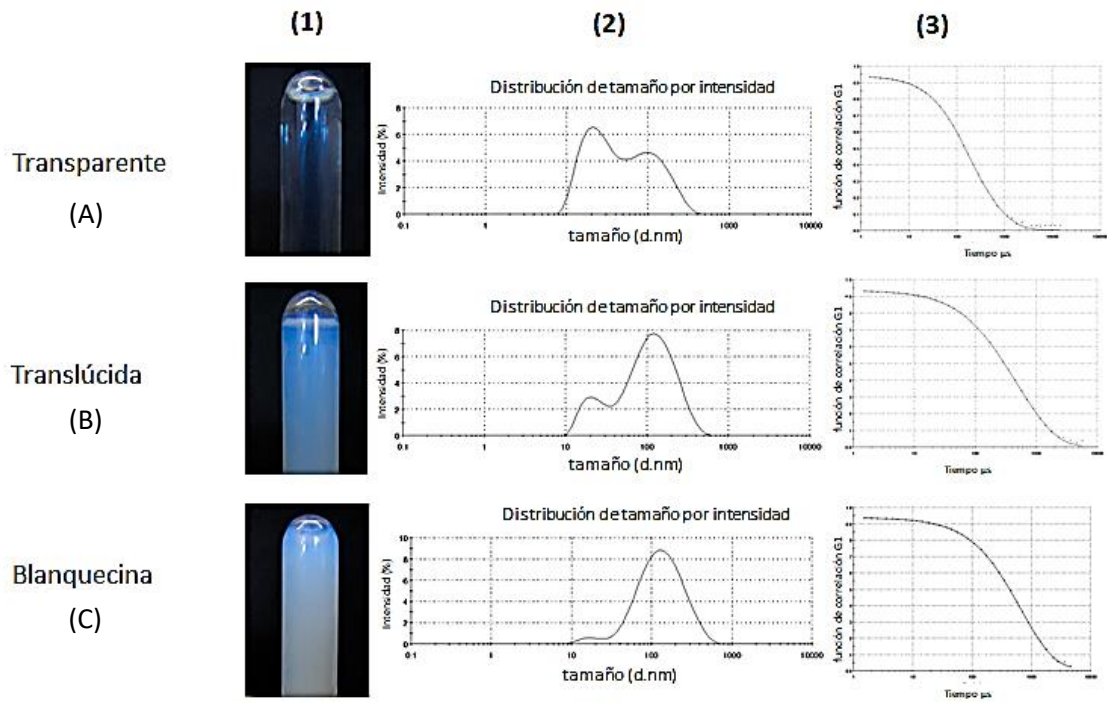
Palmarosa: AL: Tween 80	AL	Tamaño (nm) ± ES <sup>a</sup>	IPD <sup>a</sup>	Estabilidad a las 72 h	Aspecto macroscópico		
<b>0,5:0,5:2</b>	50%	14,77 ± 1,63	A	0,078 ± 0,020	A	Si	Transparente
<b>0,6:0,4:2</b>	40%	44,73 ± 34,25	-	1 ± 0,0	-	Si	Translúcido
<b>0,7:0,3:2</b>	30%	61,79 ± 55,28	-	1 ± 0,0	-	Si	Translúcido
<b>0,8:0,2:2</b>	20%	223,3 ± 50,59	B	0,193 ± 0,017	C	No	Blanco
<b>1:0:2</b>	0%	300,2 ± 53,24	B	0,148 ± 0,021	B	No	Blanco

<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

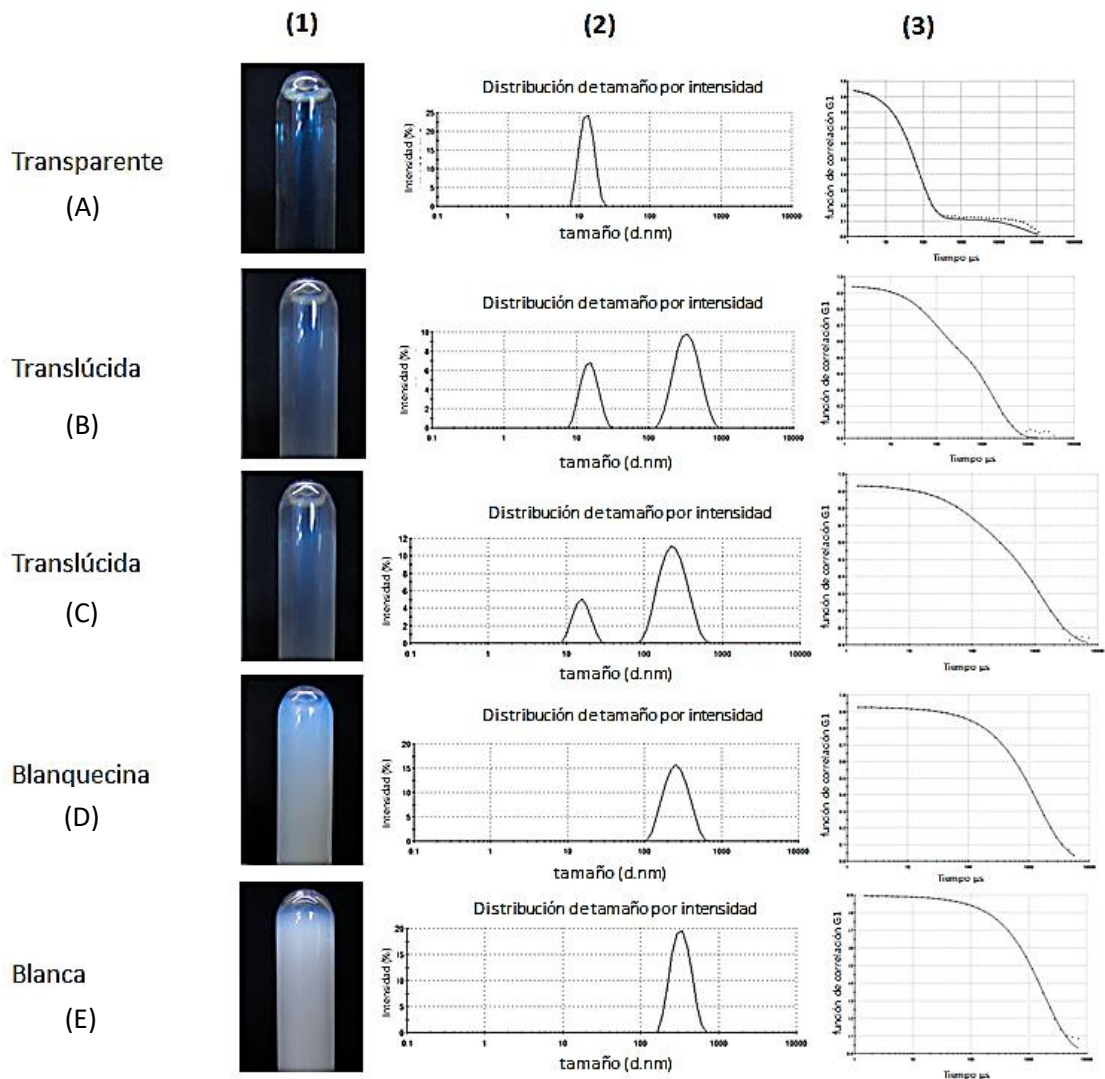
**Figura 3.2.** Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de geranio



**Figura 3.3.** Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de menta



**Figura 3.4.** Aspecto visual (columna 1), distribución de tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs del AE de palmarosa + acetato de linalilo



### 3.C.2.c. Rol del acetato de linalilo (AL) en la estabilización de las NEs de palmarosa

Como se mencionó anteriormente, el AE de palmarosa necesitó la adición de AL para obtener NEs estables. El geraniol es el componente principal de este AE (77%) y por este motivo se hipotetizó que este compuesto podría afectar la formación de las NEs de palmarosa. La tabla 3.6 muestra las características fisicoquímicas de las formulaciones de geraniol solo y en combinación con el AL, mientras que en la Fig. 3.5 se observan los gráficos DLS y la apariencia visual de las mismas. La emulsión de geraniol sin AL (1:0:2) presentó un tamaño de gota de 383,3 nm y un valor IPD de 0,311, con un aspecto macroscópico blanco e inestable a las 72 h (Fig. 3.5 E). Estos datos son comparables a los obtenidos cuando se elaboró la emulsión del aceite de palmarosa solo, la cual tuvo aspecto macroscópico blanco y valores de tamaño e IPD similares al geraniol formulado por sí solo. Cuando los nanosistemas de geraniol se formaron con 20% de AL, el tamaño de gota fue de 154,09 nm (valor significativamente menor al hallado con geraniol solo,  $P < 0,05$ ), IPD de 0,226 y con respecto al aspecto general, la formulación tuvo una coloración blanquecina (Fig. 3.5 D). Al igual que la emulsión anterior, esta perdió la estabilidad a las 72 h. Solo se obtuvieron NEs estables más allá de las 72 h y transparentes, cuando el geraniol se enriqueció al 30%, 40% y 50% con AL (Fig. 3.5 C, B y A). Estas NEs mostraron tamaños de gota similares entre sí, que fueron desde los 13,95 a 15,26 nm ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los valores de IPD, obteniendo el menor valor cuando el AL representó el 50% de la formulación ( $P < 0,05$ ).

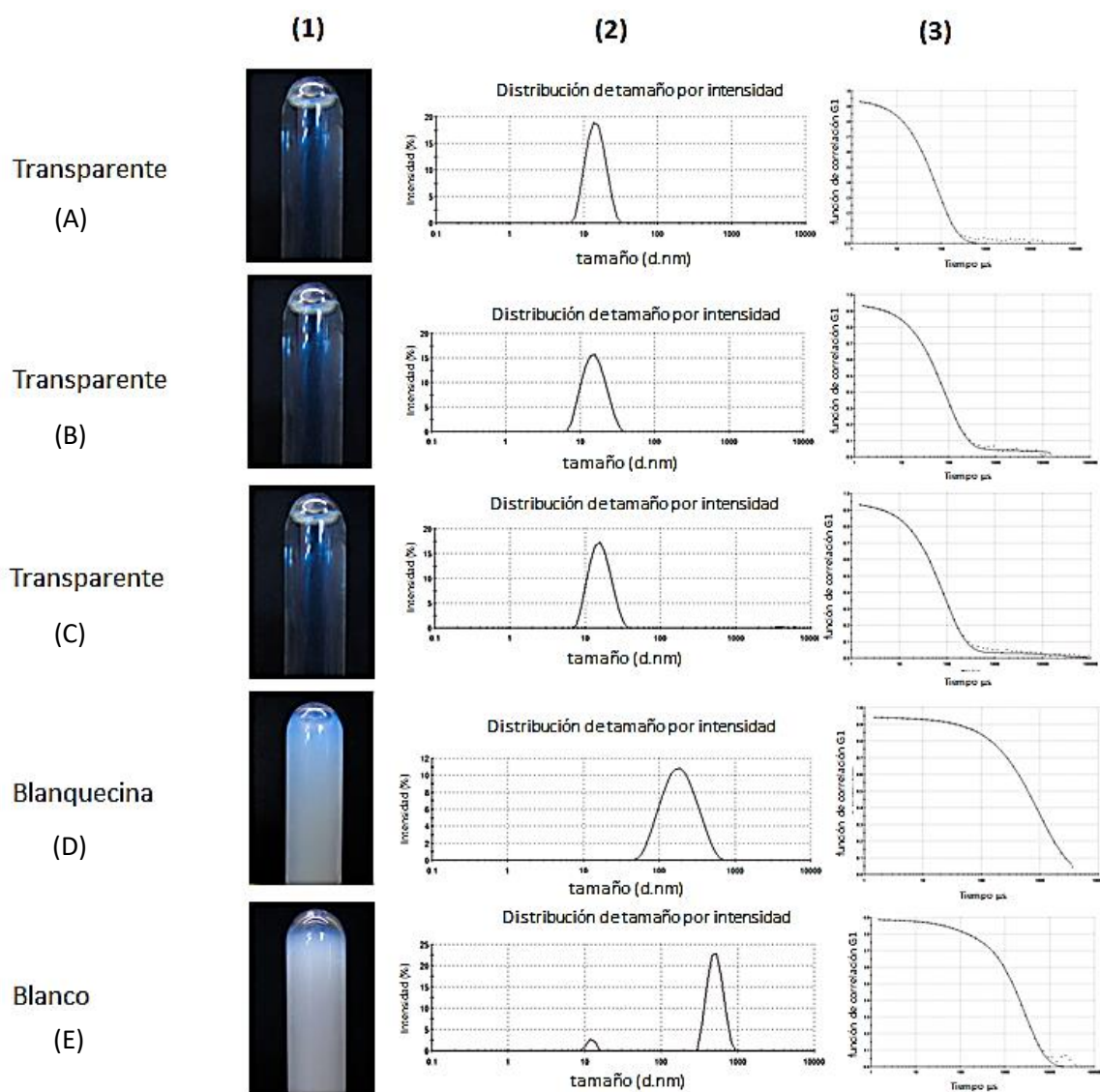


**Tabla 3.6.** Caracterización de formulaciones elaboradas con geraniol (G) + acetato de linalilo (AL) utilizando la técnica de ultrasonido a condiciones optimizadas (65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm).

G : AL: Surfactante	AL	Tamaño (nm) ± ES <sup>a</sup>		IPD ± ES <sup>a</sup>		Estabilidad más de 72Hs	Aspecto macroscópico
<b>0,5:0,5:2</b>	50%	13,95 ± 1,515	A	0,097 ± 0,019	A	si	Transparente
<b>0,6:0,4:2</b>	40%	15,00 ± 3,084	A	0,176 ± 0,017	B	si	Transparente
<b>0,7:0,3:2</b>	30%	15,26 ± 2,902	A	0,156 ± 0,032	B	si	Transparente
<b>0,8:0,2:2</b>	20%	154,09 ± 39,46	B	0,226 ± 0,015	C	no	blanquecina
<b>1:0:2</b>	0%	383,3 ± 63,50	C	0,311 ± 0,023	D	no	Blanca

<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

**Figura 3.5.** Aspecto visual (columna 1), distribución del tamaño (columna 2) y función de autocorrelación (columna 3) de NEs de geraniol + acetato de linalilo.



### 3.C.2.d. Estabilidad de las Nanoemulsiones

Las NEs que resultaron ser estables más allá de los primeros 3 días (relación aceite:surfactante de 1:2) fueron monitoreadas durante 1, 30, 60 y 120 días de almacenamiento a 25 °C, analizando los parámetros tamaño de gota, IPD y aspectos macroscópicos. Como se puede observar en la tabla 3.7 y la Fig. 3.6, en las NEs de geranio, durante los primeros 60 días, no se apreciaron cambios significativos en el tamaño de las gotas ( $P < 0,05$ ), lo que demuestra una excelente estabilidad. Las gotas tuvieron tamaños que rondaron los 14 nm y valores de IPD inferiores a 0,2. Además, el cambio porcentual en el tamaño medio, durante ese periodo, fue inferior al 10% para estas tres muestras, las cuales tuvieron un aspecto macroscópico transparente. A los 120 días de almacenamiento, este sistema disminuyó su estabilidad presentando dos poblaciones definidas de gotas con picos en 14,41 y 247,1 nm, un valor de IPD de 0.486 y un aspecto translúcido.

La tabla 3.7 también muestra la estabilidad de las NEs elaboradas con el AE de menta y Tween 80 (proporción 1:2) a lo largo del tiempo. Durante 30 días, estos sistemas no mostraron cambios significativos en el tamaño de las gotas, aunque al día 1, este valor fue de 33,97 nm, y al final de este periodo de 70,10 nm ( $P > 0,05$ ) (Fig. 3.7). Sin embargo se hallaron diferencias significativas entre los IPD ( $P < 0,05$ ). Durante este periodo el aspecto de las NEs paso de ser transparente a translúcido. A los 60 días el sistema perdió estabilidad y las fases se separaron.

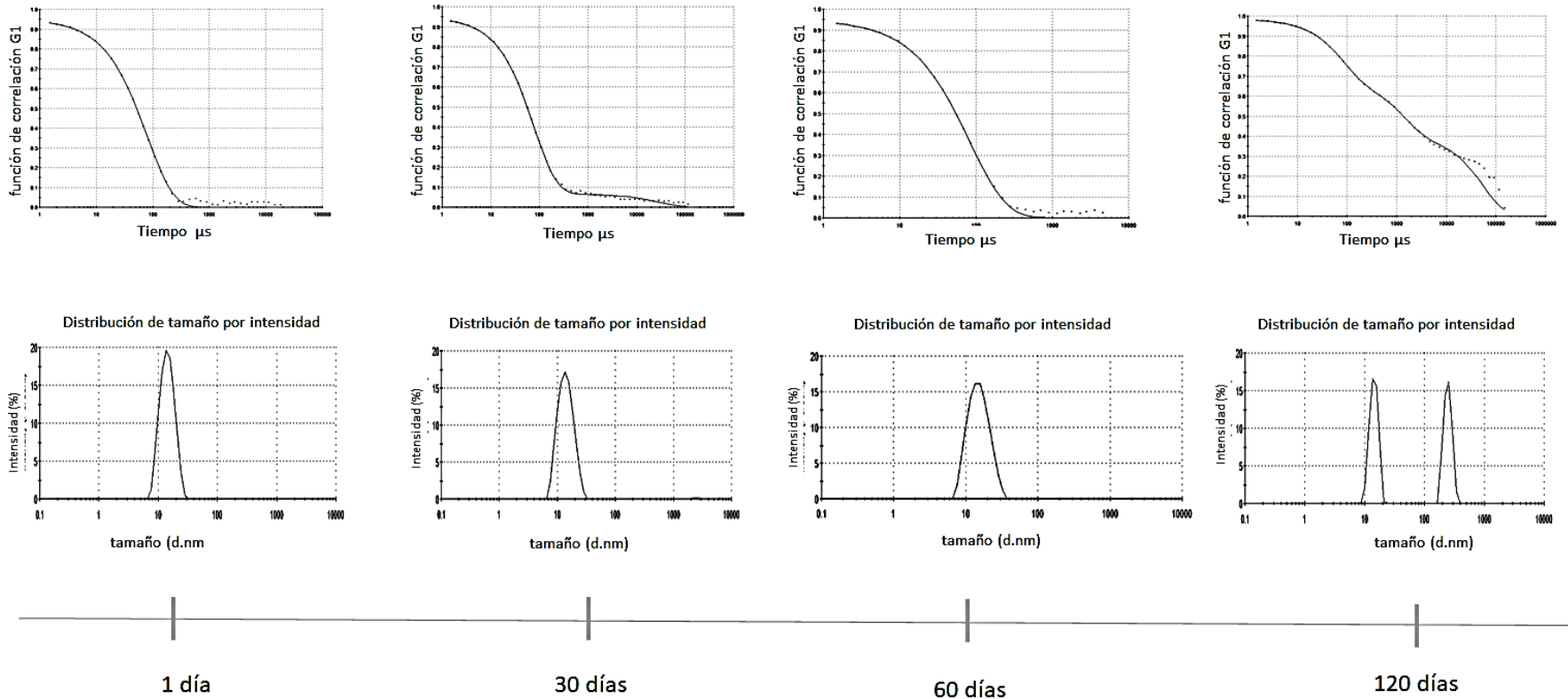
Finalmente, las NEs desarrolladas con el aceite de palmarosa enriquecido con AL al 50% y Tween 80 (proporción 0,5:0,5:2), fueron estables durante 120 días (Fig. 3.8). Para estas NEs no se hallaron diferencias significativas entre los tamaños de gota que fueron desde los 14,73 nm en el día 1 hasta los 18,01 al final de la experiencia ( $P < 0,05$ ). Todas las NEs mantuvieron IPD  $< 0,2$  aunque se observaron diferencias significativas entre alguno de ellos. Durante este tiempo de almacenamiento las NEs mantuvieron su aspecto transparente (tabla 3.7).

**Tabla 3.7.** Diámetro promedio e índice de polidispersión (IPD) para las NEs de geranio, menta y palmarosa + acetato de linalilo durante 120 días de almacenamiento a 25 °C.

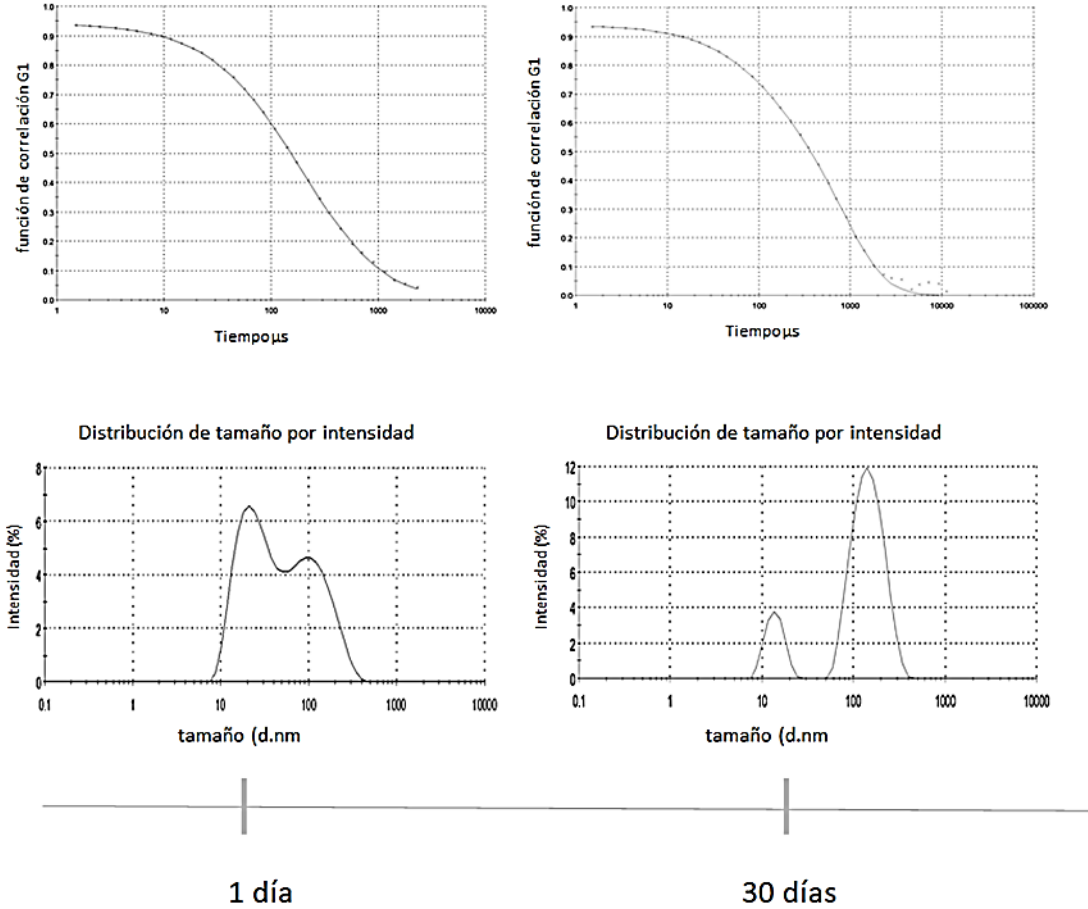
NEs	Días	Tamaño (nm) ± ES <sup>a</sup>		IPD ± ES <sup>a</sup>		Aspecto macroscopico
<b>Geranio</b>	1	13.58 ± 2.30	A	0.069 ± 0.007A	A	Transparente
	30	14.85 ± 3.54	A	0.089 ± 0.011B	B	Transparente
	60	14.91 ± 4.75	A	0.109 ± 0.019B	B	Transparente
	120	Pico 1 = 14.41 ± 1.32      Pico 2= 247.1 ± 21.74	-	0.486 ± 0.027	-	Translúcido
<b>Menta</b>	1	33.97 ± 33.16	A	0.424 ± 0.008	A	Transparente
	30	70.10 ± 33.95	A	0.624 ± 0.016	B	Translúcido
	60	-	-	-	-	Separacion de fases
<b>Palmarosa + acetato de linalilo</b>	1	14.73 ± 1.63	A	0.078 ± 0.020	A	Transparente
	30	14.77 ± 4.67	A	0.124 ± 0.016	B	Transparente
	60	15.00 ± 5.78 ES= error estándar	A	0.176 ± 0.019	C	Transparente
	120	18.01 ± 3.65	A	0.097 ± 0.013	A	Transparente

<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

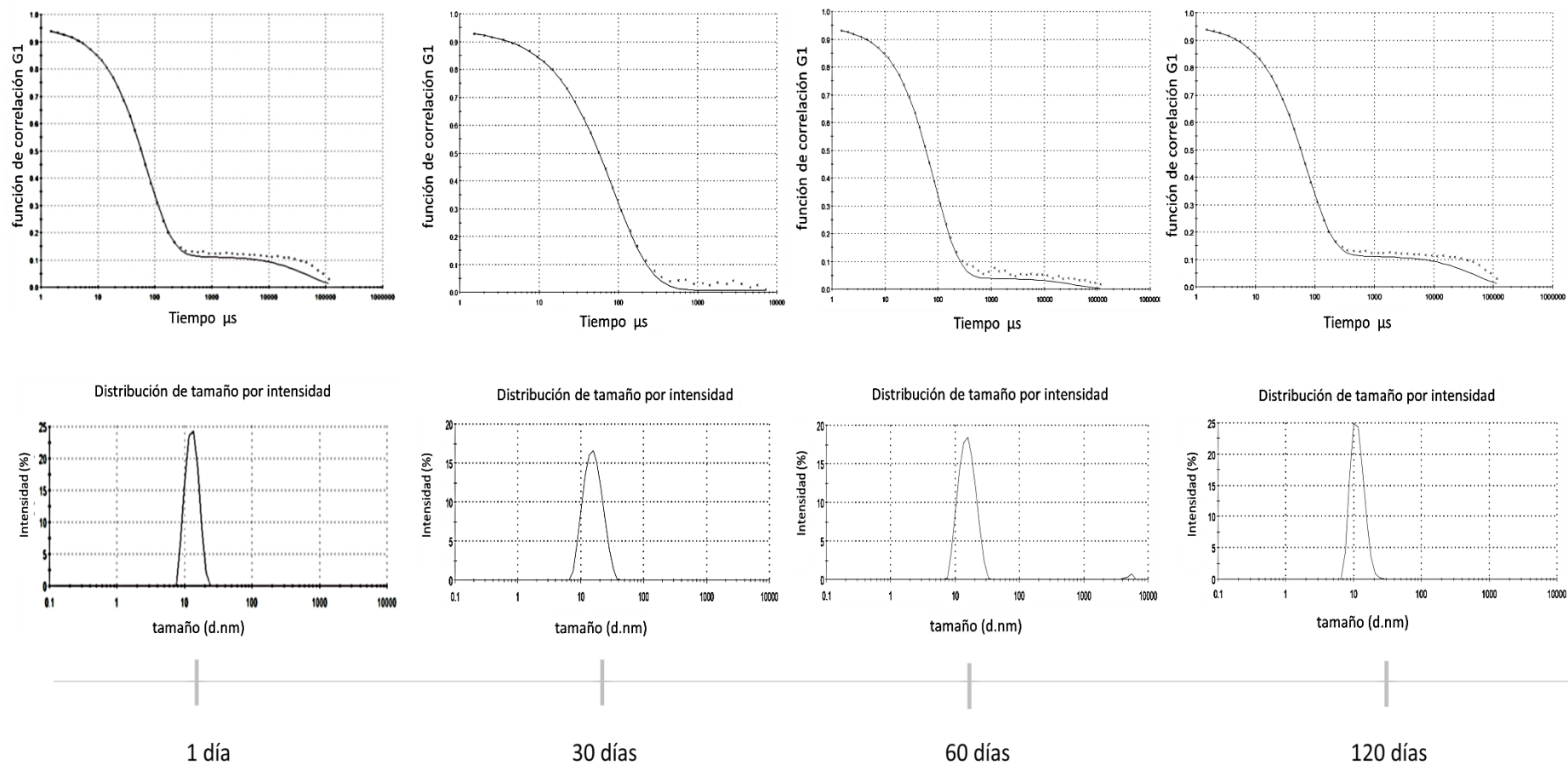
**Figura 3.6.** Estabilidad de las NEs de geranio (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 120 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3).



**Figura 3.7.** Estabilidad de las NEs de menta (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 30 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3).



**Figura 3.8.** Estabilidad de las NEs de palmarosa + acetato de linalilo (condiciones de ultrasonido: 65W, 30on/20off, 2min, 3,7cm) durante 30 días de almacenamiento a 25 °C expresada como la función de autocorrelación y la distribución de tamaños (N=3).



### 3.C.3. Bioensayos

Los ensayos por exposición a superficies tratadas, las NEs no presentaron efectos tóxicos en las larvas de *P. interpunctella*, mientras que para el caso de los adultos a las máximas dosis no se registraron valores de mortalidad significativos.

La Fig. 3.9 detalla la actividad insecticida por aplicación tópica de la  $\beta$ -cipermetrina sola o combinada con los AE o sus NEs ( $20 \mu\text{g}$  de compuestos activos larva<sup>-1</sup>) en larvas IV de *P. interpunctella*. El valor de DL<sub>50</sub> para la  $\beta$ -cipermetrina sola fue de  $0,89 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> ( $0,72 - 1,08$ ). En el caso del AE de geranio +  $\beta$ -cipermetrina, el valor de esta variable se redujo significativamente a  $0,16 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> ( $0,12 - 0,19$ ) ( $P < 0,05$ ); por lo tanto la actividad insecticida del AE +  $\beta$ -cipermetrina fue 5,62 veces mayor que la  $\beta$ -cipermetrina sola. Por otra parte, con la aplicación secuencial de la NE elaborada con el AE de geranio y la  $\beta$ -cipermetrina se observó una disminución significativa en el valor de DL<sub>50</sub> alcanzando  $0,07 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> ( $0,02 - 0,11$ ) ( $P < 0,05$ ). En particular, estas NEs +  $\beta$ -cipermetrina incrementaron la actividad insecticida 12,23 veces, con respecto al piretroide solo. Además se destaca que la nanoformulación aumentó 2,17 veces la actividad insecticida del AE geranio +  $\beta$ -cipermetrina.

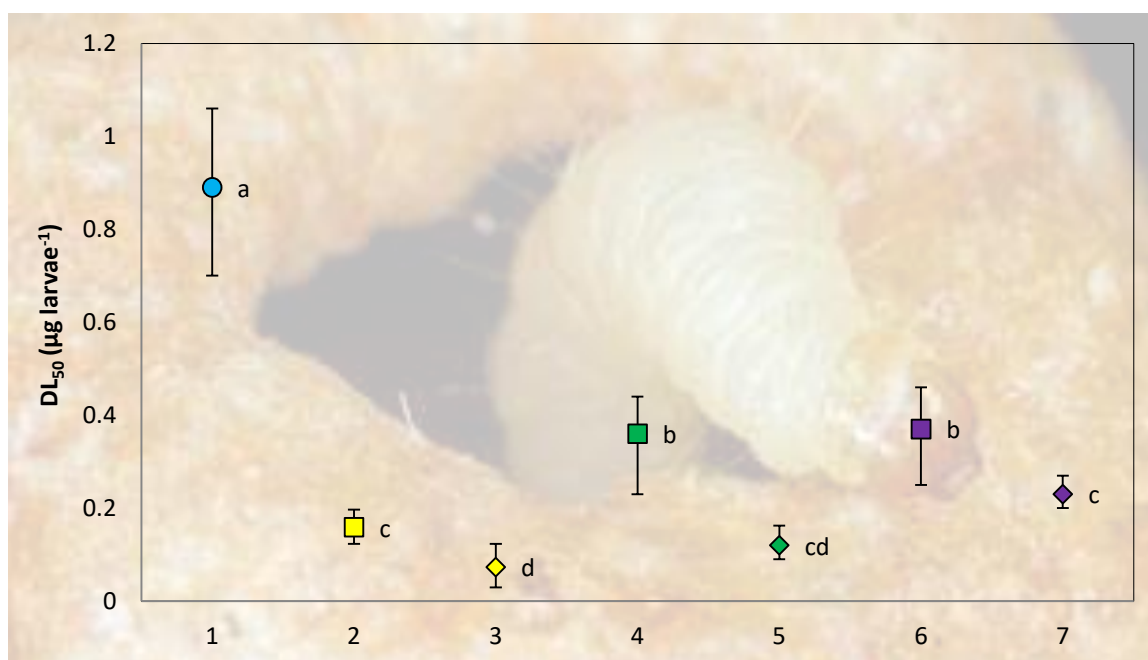
Por otra parte, cuando las larvas fueron tratadas con el AE menta +  $\beta$ -cipermetrina, el valor de DL<sub>50</sub> fue de  $0,36 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> ( $0,28 - 0,49$ ), siendo este significativamente menor que el efecto del insecticida solo ( $P < 0,05$ ). El efecto tóxico promovido por la aplicación tópica del AE de menta y la  $\beta$ -cipermetrina fue 2,47 veces mayor que el promovido por la  $\beta$ -cipermetrina por sí misma. En comparación con este último tratamiento, las NEs cargadas con el aceite de menta +  $\beta$ -cipermetrina mostraron un valor significativamente menor que fue de  $0,12 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> ( $0,078 - 0,15$ ) ( $P < 0,05$ ). La mortalidad causada por las NEs de menta +  $\beta$ -cipermetrina fue 7,41 veces más altas que la registrada para la  $\beta$ -cipermetrina sola. Las NEs aumentaron 3,08 veces la actividad insecticida del AE de menta+  $\beta$ -cipermetrina.



Cuando las larvas fueron tratadas con el AE de palmarosa + AL en combinación con la  $\beta$ -cipermetrina, el valor de  $DL_{50}$  fue de  $0,37 \mu\text{g larva}^{-1}$  ( $0,28 - 0,49$ ), el cual fue significativamente menor que el hallado para el piretroide solo ( $P < 0,05$ ). De esta manera se incrementó el efecto tóxico 2,41 veces. Por su parte, con la aplicación de las NEs elaboradas con el AE de palmarosa + AL junto a la  $\beta$ -cipermetrina se encontró un valor de  $DL_{50}$  de  $0,23 \mu\text{g de larvas}^{-1}$  ( $0,19 - 0,26$ ), que fue significativamente menor que el promovido por el tratamiento anterior. En particular, para estas NEs combinadas con la aplicación del piretroide se observó un incremento de 3,78 veces de la actividad insecticida con respecto a la  $\beta$ -cipermetrina sola, y de 1,56 veces con respecto al tratamiento del AE de palmarosa + AL en combinación con la  $\beta$ -cipermetrina.

Es importante resaltar que tanto el control con Tween 80 como con acetona, no se registró mortalidad.

**Figura 3.9.** Actividad biológica de la  $\beta$ -cipermetrina sola y combinada con los AE o sus NEs en larvas del IV estadio de *P. interpunctella*.



Diferentes letras indican diferencias estadísticas (superposición de IC,  $P < 0.05$ )

- |   |  |
|---|--|
| 1. $\beta$ -cipermetrina sola                         | 5. $\beta$ -cipermetrina combinada con NEs de menta          |
| 2. $\beta$ -cipermetrina combinada con AE de geranio  | 6. $\beta$ -cipermetrina combinada con AE de palmarosa + AL  |
| 3. $\beta$ -cipermetrina combinada con NEs de geranio | 7. $\beta$ -cipermetrina combinada con NEs de palmarosa + AL |
| 4. $\beta$ -cipermetrina combinada con AE de menta    |  |

### 3.D. Discusión

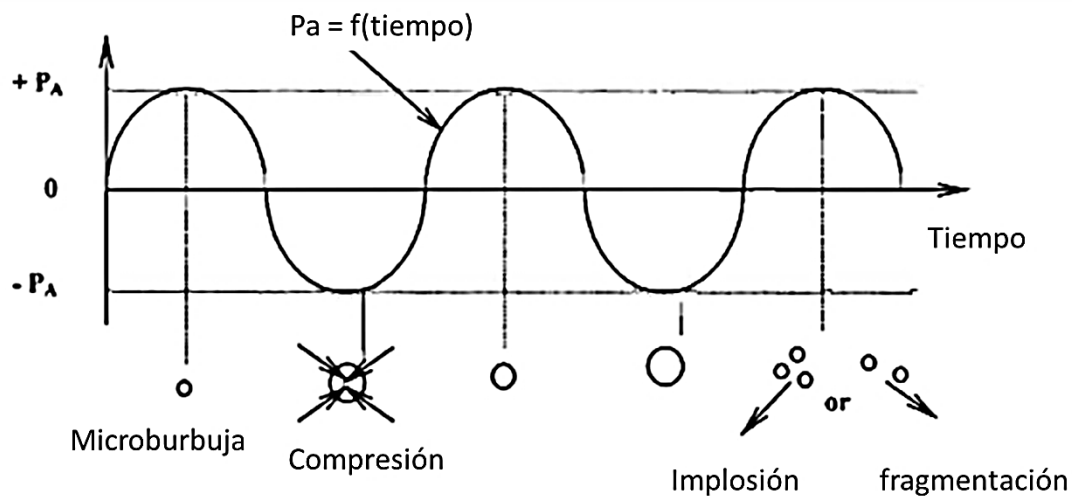
Al momento de elaborar NEs asistidas por ultrasonido, el control de los parámetros del equipo es un factor clave para lograr la estabilidad de las formulaciones. Optimizar las variables de modo tal de obtener el mínimo tamaño de gota posible (MTGP) permite minimizar la pérdida de energía y el costo de producción a una escala industrial (Abbas et al., 2017). El primer parámetro que se optimizó fue la potencia del equipo, con el fin de obtener el MTGP. En este trabajo se estableció que la potencia óptima del ultrasonido fue de 65 W siendo este valor más bajo que los reportados en otros estudio. Por ejemplo, Sugumar et al. (2014, 2015) elaboraron NEs con los AE de eucaliptus y naranja, respectivamente y Tween 80 mediante una sonda ultrasónica a una potencia de 300 W. Por otra parte Periasamy et al. (2016) formularon NEs basadas en el AE de *Nigella sativa* L. (Ranunculales, Ranunculaceae) con Tween 80 y usando una potencia de ultrasonido de 750 W. Lo que se puede observar es que en estos trabajos las potencias que se aplicaron fueron entre 4,5 y 11,5 veces mayores, que la utilizada para la obtención de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL. El fenómeno de "sobrepesamiento" es un problema que suele ocurrir cuando se establecen mayores niveles de energía más allá del punto óptimo del sistema, con la intención de reducir el tamaño de gota. Generalmente, la energía necesaria que requiere el sistema para alcanzar el MTGP está determinada por las características propias del mismo como son, para el sistema en estudio, el tipo de AE, de surfactante, las concentraciones de estas dos sustancias, la cantidad de agua, entre otros factores (Agrawal et al., 2017). Atendiendo a estas circunstancias, aplicar más potencia al sistema más allá de su punto óptimo se vuelve innecesario e improductivo, ya que consumiría energía adicional sin modificar sustancialmente el tamaño de gota.

Otro parámetro importante es el tiempo total de aplicación del ultrasonido. Como se sabe los tiempos largos producen un tamaño de gota más pequeño (Ghosh et al., 2013). Sin embargo, una vez que se alcanza el tiempo óptimo que permite obtener el MTGP, el tamaño de gota no cambia. Aplicar ultrasonido por mayor tiempo puede generar un procesamiento

excesivo de la muestra que derivaría en la degradación de los compuestos bioactivos (Abbas et al., 2017). En comparación con los trabajos encontrados en la bibliografía, en donde los tiempos de sonicación son de 10 min (Pascual Villalobos et al., 2017), 15 min (Mishra et al., 2019), 30 min (Sugumar et al., 2014, 2015) y 60 min (Periasamy et al., 2016) en esta tesis el tiempo óptimo fue de tan solo 2 min.

Como bien se conoce, se pueden identificar dos tipos de equipos de ultrasonido: los que trabajan de manera continua y aquellos que trabajan por ciclos, como es el caso del usado en esta tesis. Para los experimentos, el ciclo de ultrasónico que se fijó fue de 30 on / 20 off. En estos equipos que trabajan por ciclos, durante el tiempo de pulso "encendido (*On*)", las burbujas de cavitación crecen mientras que durante el tiempo de pulso "apagado (*Off*)", las burbujas se disuelven (Ashokkumar, 2011). Para entender esto es necesario comprender el fenómeno de cavitación. Tal fenómeno se produce en aquellas regiones de un líquido, que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente (debidas a las ondas de energía ultrasónica). Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a fuerzas de tensión, mientras que durante la mitad positiva, experimenta fuerzas de compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta varias veces en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original, aportando estabilidad al sistema. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y locales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado (Robles y Ochoa, 2012).

**Lamina 3.3.** Evolución de las burbujas durante el proceso de cavitación, según Canselier et al. (2002)



El control de los ciclos de “on” y “off” del equipo son claves debido a que un tiempo mayor de encendido puede generar que el tamaño de las gotas aumenta y que los compuestos bioactivos se degraden, así como también tiempos menores de exposición podrían generar entonces NEs que perdieran su estabilidad rápidamente (Ashokkumar, 2011).

Además de la optimización de los parámetros de la sonda ultrasónica, son clave en la formación de NEs estables las cantidades y proporciones que se establecen entre el tipo de surfactante, el AE y el agua. Una de las características más apreciadas de las NEs es su aspecto visual translucido, algo muy buscado por diferentes industrias, especialmente la alimenticia (Sugumar et al., 2015). La apariencia visual depende, básicamente, del tamaño de la gota y de su interacción con la luz visible. Se sabe que cuando el diámetro de las gotas es inferior a 20 nm, el sistema es transparente, ya que no existe una interacción con la luz (Barzegar et al., 2018). Mientras que, cuando el diámetro de la gota es mayor, las partículas pueden interactuar con la luz produciendo efectos ópticos. De esta manera, las formulaciones adquieran coloraciones que van desde un aspecto transparente hasta el blanco (Agrawal et al., 2017). Como ya se mencionó oportunamente, uno de los objetivos al momento de elaborar

NEs era prescindir del uso de un co-surfactante. Según los resultados obtenidos, la incorporación de etanol no permitió una apropiada formación de NEs. La variación en la concentración de etanol puede alterar la formación de NEs, ya que un aumento del mismo produce un incremento en el tamaño del diámetro de gota y en los valores de IPD (Saberri et al., 2013). Esto deriva en la pérdida de la estabilidad de las NEs así como también genera un aspecto macroscópico blanquecino. En base a los resultados se descartó el uso de etanol como co-surfactante en las formulaciones estudiadas en este trabajo.

En la formación de las NEs, la concentración de surfactante juega un papel crítico en la disminución del tamaño de las gotas, ya que esta sustancia reduce la tensión interfacial entre el agua y el aceite, evitando a su vez la fusión de las nanogotas. Esto se relaciona con un mecanismo de autoestabilización que evita la coalescencia de las gotas, denominado efecto Marangoni, cuya magnitud depende de la concentración de tensioactivo presente en la fase continua. Este efecto ayuda a lograr una distribución más uniforme de la tensión superficial de la gota, es decir, de la fuerza que une las moléculas del líquido. Dicho fenómeno se produce cuando las moléculas del tensioactivo se mueven desde las zonas con baja tensión superficial a las áreas con mayor tensión, estabilizando de esta manera la nanogota (Agrawal et al., 2017). Tal lo observado en el presente trabajo, el aumento de la proporción aceite-surfactante desde 1:0,5 a 1:2, redujo el tamaño del diámetro de las gotas en las NEs. Además de este cambio de tamaño promovido por el aumento de la concentración de surfactante, también se observó una modificación de la apariencia visual de las emulsiones desde blanco al transparente, causado por la reducción de tamaño. Al trabajar con diferentes formulaciones de AE de menta se demostró que el tamaño de gota aumenta con la disminución de la concentración de Tween 80 (Heydari et al., 2019). En el presente trabajo, los tamaños de las NEs elaboradas con una proporción 1:2 AE:surfactante fueron desde aproximadamente 14 nm (las elaboradas con AE de geranio y de palmarosa enriquecido con acetato de linalilo 50%) hasta 33 nm (elaboradas con AE de menta). Estos valores son comparables a los encontrados por Barzegar et al. (2018),

quienes trabajaron con AE de menta y Tween 80 mediante la técnica de emulsificación espontánea y obtuvieron tamaños de gotas que rondaron los 50 nm. Por otra parte, Salvia-Trujillo et al. (2015) elaboraron NEs de geranio y palmarosa utilizando un ultrahomogenizador, arginato de sodio y Tween 80 como surfactantes. De esta manera obtuvieron NEs con tamaños de gota de 29 y 33 nm, aproximadamente. Mediante la técnica de ultrasonido, Periasamy et al. (2016) elaboraron NEs de AE de *N. sativa* L. y Tween 80 con un tamaño de 46 nm. Sugumar et al. (2015), empleando la misma técnica y el mismo surfactante, desarrollaron NEs de AE de naranja con tamaños de gota de 30 nm. Con respecto a los valores de IPD, las NEs elaboradas con el AE geranio y el AE de palmarosa + AL al 50% mostraron valores bajos ( $< 0,2$ ), es decir fueron monodispersas. Esta gran uniformidad de las NEs puede explicarse, en parte, por el aumento de la concentración de surfactante el cual también influye en la uniformidad del nanosistema (Heydari et al., 2019). Sin embargo, en el caso de las NEs de menta, estas tuvieron valores de IPD superiores a 0,4 por lo que fueron consideradas como polidispersas.

Lograr la estabilización de las NEs de palmarosa fue uno de los objetivos centrales planteados en esta tesis. Cuando las NEs de palmarosa se formularon sin la adición de ningún otro componente, se obtuvieron tamaños de gota muy grandes ( $> 300$  nm), por lo cual se buscó reducirlos sin adicionar más surfactante a la mezcla y sin modificar las condiciones optimizadas del ultrasonido. Con base en la idea de que los componentes principales de los AE pueden influir en la formación de las NEs, y teniendo en cuenta que el geraniol representa el 77% de la composición del AE de palmarosa, se planteó la hipótesis de que este producto podría impedir la formación de las NEs estables y con tamaños de gota pequeños. Tomando como base lo mencionado por Salvia-Trujillo et al. (2015), quienes indicaron que ciertas propiedades de las NEs elaboradas con AE podrían ser modificadas mediante el enriquecimiento con algunos compuestos presentes en el mismo AE; se planteó la posibilidad de adicionar AL (un componente menor del aceite de palmarosa) como un factor que ayudara para la estabilización de estas NEs. Como se pudo apreciar en los resultados, a medida que las

concentraciones de AL se incrementaron, el tamaño de gota de las NEs se redujo así como también los valores de IPD, logrando que estos fueran los más bajos cuando el AL representó el 50% de la formulación.

Ziani et al., (2012) plantean la existencia de diferentes fenómenos fisicoquímicos que pueden actuar en la estabilidad de las NEs. El primero se refiere a la velocidad de transferencia de masa de los compuestos hidrofóbicos a las micelas de surfactante durante la formación de la NEs. Esta velocidad podría verse modificada en función del tipo de compuestos que constituyen un AE. El segundo fenómeno es la acción como co-tensioactivos de ciertos compuestos de un aceite que alteran el tamaño óptimo de la micela. Por último, estos autores plantean que la posibilidad de que el aceite se introduzca en una micela tensioactiva depende de su solubilidad en agua, de la composición y del peso molecular de cada uno de sus compuestos, por lo cual la modificación de estas relaciones con el agregado de otros componentes puede mejorar la estabilidad de las nanogotas. En base a lo anterior, es posible suponer que un compuesto con peso molecular relativamente bajo o alta solubilidad en agua tiende a mantenerse por más tiempo en la fase acousa. Sin embargo, los compuestos con peso molecular relativamente alto o baja solubilidad en agua tienden a incorporarse más fácilmente en el interior hidrofóbico de la micela, mejorando la estabilidad del nanosistema. Teniendo en cuenta que el geraniol tiene un peso molecular de 154.25 g / mol y la solubilidad en agua es de 100 mg / L a 25 °C y el AL tiene un peso molecular de 196.29 g / mol y una solubilidad en agua de 8.2 mg / L a 25 °C, es posible, que al enriquecer las NEs con este compuesto, se haya generado una mayor velocidad de transferencia de masas. Adicionalmente, el AL puede haber actuado como un co-tensioactivo estabilizando de esta manera los nanosistemas. Estas ideas podrían explicar las observaciones halladas, en donde un aumento en la relación geraniol:AL de 1:0 a 0,5:0,5 reduce el tamaño del diámetro de la gota. Teniendo en cuenta lo dicho en un principio, que el AE de palmarosa está constituido mayoritariamente por geraniol, se puede interpretar que los fenómenos fisicoquímicos que actúan en la formación de las NEs de

geraniol y AL, serían los mismos que promueven de la estabilización de las NEs basadas en el AE de palmarosa + AL.

Por otra parte, en el presente trabajo se estudió la estabilidad de las NEs a lo largo del tiempo. El hecho de conseguir una nanoformulación estable de un bioinsecticida resulta ser un factor importante a la hora de lograr que un producto que tenga aplicaciones comerciales (Yang et al., 2017). Se demostró que la concentración de tensioactivo en una solución acuosa juega un rol crítico en la reducción del tamaño de la gota y esto conlleva a una mejor estabilidad de las NEs (Basak y Guha, 2017). Probablemente, esta sea la razón por la cual la estabilidad de las NEs fue mejor con las proporciones de AE:Tween 80 de 1:2.

Las tres formulaciones realizadas en esta tesis resultaron tener comportamientos distintos a lo largo del tiempo, observándose que las NEs de geranio y palmarosa + AL fueron las más estables. En el caso de las NEs de menta, estas resultaron ser las que presentaron una menor estabilidad, separándose las fases a los 60 días. La baja estabilidad de estas NEs, en contrapartida con las otras dos, podría explicarse en parte debido al mayor tamaño de gota que presentaron al ser formuladas ( $\approx 33$  nm). Un detalle importante con respecto a estas formulaciones es que también se pudo apreciar un cambio en la coloración de las muestras, lo que revela que los tamaños de gota aumentaron notoriamente pasando de un aspecto transparente a uno translúcido en el día 30. Por otra parte, las NEs elaboradas con el AE de geranio mantuvieron aproximadamente el diámetro medio de gota durante 60 días ( $\approx 14$  nm) y un aspecto transparente. Además, después de 120 días de almacenamiento las NEs disminuyeron su estabilidad (se observaron dos poblaciones de nanogotas y el sistema pasó a ser translúcido) aunque no mostraron un principio de separación de fases. Finalmente, las NEs formuladas con el AE de palmarosa y combinadas con AL demostraron ser estables durante 120 días, sin cambios en el tamaño de gota ni en su aspecto macroscópico. En la bibliografía se encuentran algunos trabajos que estudiaron la estabilidad de las NEs en periodos similares a los dispuestos en los ensayos de esta tesis. Así se desarrollaron NEs de los AE de orégano,



tomillo, limón y mandarina mediante un microfuidizador y utilizando Tween 80 (Guerra Rosas et al., 2016). Las NEs de limón y mandarina mantuvieron el tamaño nanométrico (18 nm) durante 56 días, mientras que en ese mismo periodo las NEs de orégano y tomillo perdieron estabilidad alcanzando tamaños de gota de 1000 nm. En otro trabajo, también se elaboraron NEs de tomillo con tamaños menores a 70 nm y que mantuvieron su estabilidad a lo largo de 30 días de almacenamiento (Ryu et al., 2018 y Chang et al., 2015). Moraes-Lovison et al. (2017) formularon NEs de orégano que mostraron tamaños de gota entre 35 y 55 nm y que a su vez fueron estables a lo largo de 45 días. Por otra parte, se elaboraron NEs de clavo de olor e hinojo usando quitosano, Pluronic F68 y Cremophor RH 40 mediante distintos métodos de baja y alta energía (Barrada et al., 2017). Tales nanosistemas fueron estables a lo largo de 3 meses con tamaños de gota que rondaron los 100 nm. Finalmente se puede citar el trabajo de Duarte et al. (2015), quienes desarrollaron NEs con efecto larvicida usando Tween 20 y aceite de *R. officinalis* para el control de *A. aegypti*. En este trabajo se observó un aumento en el tamaño medio de gota de 50 a 180 nm después de 30 días de haber sido preparadas las NEs.

Con respecto a los estudios de estabilidad en NEs es importante seguir profundizándolos en búsqueda de optimizar y extender el tiempo de vida útil de estos productos con el fin de incrementar su uso comercial. Algunos autores también postulan que las formulaciones basadas en AE pueden actuar como insecticidas de bajo costo en comparación con otros pesticidas botánicos, como el piretro y el neem (Park et al., 2011). Por lo tanto, el desarrollo de formulaciones basadas en AE que presenten una gran estabilidad resultan ser un paso clave al momento de diseñar un producto insecticida que pueda tener aplicación comercial, ya que prolongar la vida útil de estos le daría un valor agregado.

En los últimos años, los avances en nanotecnología han ofrecido nuevas herramientas que posicionaron a los AE como alternativas más concretas para su uso en las estrategias de MIP (Ikbal y Pavela, 2019). En este trabajo se evaluó el efecto insecticida de las NEs elaborados con

menta, geranio y palmarosa + AL aplicadas en forma conjunta con un piretroide en larvas IV de *P. interpunctella*. Como se puede apreciar a través de los resultados, los AE solos, siempre potenciaron el efecto insecticida de la  $\beta$ -cipermetrina. Además las NEs potenciaron aún más este efecto, demostrando la eficiencia de la nanoformulación por sobre el AE libre.

Como es de conocimiento general, se considera que los AE son productos relativamente seguros para el ambiente y la salud humana, y además pueden tener efectos sobre el metabolismo, la fisiología y el comportamiento de los insectos (de Oliveira et al., 2018). Varios trabajos han sugerido la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y el bloqueo del sistema colinérgico, octopaminérgico y GABAérgico, como un posible modo de acción de los AE sobre los insectos (Gaire et al., 2019; Pavela y Benelli, 2016; Upadhyay et al., 2018). También se demostró que los AE aumentan los efectos de algunos insecticidas sintéticos (Gross et al., 2017; Joffe et al., 2012). Esta mejora en la eficacia podría deberse a que el aceite aumentaría la penetrabilidad del insecticida sintético y contribuiría a la inhibición de los sistemas enzimáticos de detoxificación (Gross et al., 2017). En este contexto, otros autores mostraron que el AE de geranio interfiere con los procesos de detoxificación en *A. aegypti* lo que conduciría a una mayor biodisponibilidad del piretroide aplicado tópicamente (Norris et al., 2019). Por lo tanto, en base a esto los AEs usados en este estudio podrían generar un efecto similar en larvas de *P. interpunctella*.

Los resultados obtenidos en esta tesis han puesto de manifiesto la posibilidad de obtener nuevas formulaciones de AE con actividad insecticida desarrolladas por ultrasonido para el control de *P. interpunctella*. Dado lo novedoso del método, en la literatura existen escasos antecedentes sobre la utilización del ultrasonido en el desarrollo de NEs con actividad insecticida. Sin embargo podemos citar a: Sugumar et al. (2014), quienes diseñaron NEs de Tween 80 con diferentes proporciones de AE de eucaliptus y con actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera, Culicidae). Similares NEs con Tween y este AE fueron diseñadas por Pant et al. (2014) con el objetivo de desarrollar un bioinsecticida para el manejo de *T.*

*castaneum*. Hashem et al. (2018) emplearon a este mismo insecto para probar el efecto de las NEs basadas en AE de anís. El AE de Neem también fue nanoemulsionado para desarrollar un insecticida para el control de larvas de *Cx. quinquefasciatus* (Anjali et al. 2012). Finalmente Pascual-Villalobos et al. (2017) elaboraron diferentes NEs a partir de diez AE de distintas plantas para obtener un producto que pueda ser usado para el manejo de pulgones. Las NEs que mostraron mayor actividad repelente fueron las diseñadas con los AE de anís, menta y limón.

En lo que respecta al modo de acción de las NEs, probablemente, el tamaño nanométrico de las gotas condujo a una mayor tasa de penetración del AE a través de la cutícula, lo cual resulta ser un punto crítico en la actividad insecticida de cualquier producto (Oosandlo et al., 2017). Además, las NEs podrían aumentar la afinidad entre el AE y el órgano blanco dada su estabilidad química y su solubilidad de las NEs, lo que permitiría de esta manera aumentar la exposición a los ingredientes activos (Shahzad et al., 2019). Finalmente, se demostró que las NEs podrían estar produciendo un daño extenso en la cutícula y provocando un daño histológico que potencie a su vez el efecto del insecticida de síntesis aplicado posteriormente (Hashem et al., 2018).

### 3.E. Conclusiones

- ✓ Los parámetros optimizados de la sonda ultrasónica para la elaboración de NEs fueron: Potencia = 65W, ciclos = 30on/20off, tiempo de sonicacion = 2min, distancia desde la punta de la sonda hasta el fondo del recipiente de la emulsion = 3,7cm.
- ✓ Las NEs de geranio formuladas con una relación AE:Tween 80 de 1:2 tuvieron tamaños de gota de  $\approx 14$  nm, fueron monodispersas, de aspecto transparente y estables durante 60 días. A los 120 días la estabilidad disminuyó, obteniéndose dos picos de tamaño y una NE translúcida.
- ✓ Las NEs de menta elaboradas con una relación AE:Tween 80 de 1:2 mostraron tamaños de gota  $\approx 33$  nm, fueron polidispersas y de aspecto macroscópico transparente. A los 30 días las NEs no mostraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tamaño, pero si incrementaron el IDP y esto se reflejó en que el aspecto fue translúcido. Finalmente a los 60 días se observó una separación de fases.
- ✓ Con la relación AE:Tween 80 de 1:2 no se obtuvieron NEs estables ni translúcidas, utilizando solamente el AE de palmarosa . Al agregar AL al 50% se obtuvieron NEs con tamaños de gota de  $\approx 14$  nm, monodispersas y de aspecto macroscópico transparente. Las NEs fueron estables durante 120 días.
- ✓ Las NEs de geranio combinadas con  $\beta$ -cipermetrina potenciaron la actividad insecticida 12,23 veces, con respecto al piretroide solo en larvas del IV de *P.interpuctella*. Además se destaca que la nanoformulación aumentó 2,17 veces la actividad insecticida del AE geranio +  $\beta$ -cipermetrina.
- ✓ El efecto tóxico por la aplicación tópica de las NEs de menta +  $\beta$ -cipermetrina fue 7,41 veces más alto que la registrada para la  $\beta$ -cipermetrina sola. Es de destacar, que las NEs aumentaron 3,08 veces la actividad insecticida del AE de menta+  $\beta$ -cipermetrina.
- ✓ Las NEs elaboradas con el AE de palmarosa + AL junto a la  $\beta$ -cipermetrina incrementaron la actividad insecticida con respecto al piretroide solo 3,78 veces y 1,56

veces con respecto al tratamiento del AE de palmarosa + AL en combinación con la  $\beta$ -cipermetrina.

Las NEs analizadas en el presente capítulo podrían incorporarse como herramientas complementarias en las estrategias de control de *P. interpuctella*, especialmente aquellas formulaciones elaboradas con el AE de geranio. Los trabajos futuros relacionados con el desarrollo de estas NEs deberán centrarse en obtener mayor información acerca del modo de acción de estos nanosistemas, así como también deben buscar incrementar la estabilidad y actividad insecticida de los mismos.

## 4. El final es en donde partí<sup>1</sup>: Ecotoxicología de las nanoformulaciones

---

### 4.A.1. Introducción

En 1935, Tansley utilizó el término “ecosistema” para comprender y describir las complejas interacciones entre factores bióticos y abióticos. En ese momento, el autor resaltó la idea del ecosistema como “una unidad básica de la naturaleza” (Armenteras et al., 2016).

Un ecosistema puede ser equiparado a un ser vivo con equilibrio homeostático que puede estar potencialmente amenazado por la irrupción no habitual de factores biológicos, químicos o físicos. A estas amenazas que pueden afectar las condiciones del biotopo o de la biocenosis se las denomina polución. Por lo tanto, esta puede interferir en el equilibrio de un ecosistema, alterando los mecanismos homeostático del mismo (Margalef, 1995). Comúnmente suele considerarse a la actividad humana como la única fuente de polución; sin embargo, los fenómenos naturales como las tormentas de arena y las erupciones volcánicas son también fuentes de ella. Cabe destacar que las actividades humanas son las que han influido mayoritariamente en la contaminación ambiental (Capó, 2007).

En la actualidad, la población humana se encuentra en una fase de crecimiento exponencial que ha generado drásticas consecuencias ambientales. Por un lado los bosques se han utilizado para la construcción de viviendas o con fines agrícolas, deteriorando el equilibrio ambiental y por otro lado, el crecimiento de los contaminantes tales como desechos domésticos, efluentes no tratados o semi-tratados de industrias y diferentes productos químicos, así como los pesticidas utilizados en el sector agrícola (Mustapha, 2008; Naeem et al., 2010; Abu-Darwish et al., 2011).

Como respuesta a la necesidad de estudiar los efectos de la actividad humana sobre el ecosistema, surge la disciplina de la ecotoxicología. La misma se define como: la ciencia que

---

<sup>1</sup> Referencia al título de la canción del grupo argentino conocido como “*La Renga*”, de su disco “Despedazado en mil partes” (1996).

estudia la polución, su origen, su evolución e interacción con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas y sus acciones y efectos sobre los seres vivos que los habitan (Sáenz Sánchez, 1974). A esta definición se puede sumar otra que afirma que la ecotoxicología es la rama de la toxicología que se ocupa del estudio de la exposición incidental de los organismos a productos contaminantes del ambiente, de los alimentos o del agua. Es así, que esta disciplina evalúa las relaciones causa-efecto junto con las condiciones y los límites de seguridad de tal “exposición” (Loomis, 1982).

El estudio del impacto de los pesticidas sobre los enemigos naturales de los insectos plaga tiene una historia relativamente reciente. La implementación de medidas prácticas tendientes a minimizar los efectos adversos de estos productos sobre el ambiente aún es más reciente. Algunos esfuerzos para mitigar los efectos secundarios de los pesticidas en este grupo de organismos fueron instituidos en la era anterior a la invención de los insecticidas orgánicos sintéticos, pero tales esfuerzos se diluyeron con el uso masivo de estos productos, principalmente los neurotóxicos (es decir, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides) (Croft et al., 1998). Sin embargo a comienzos de los años 60, la bióloga Rachel Carson publicó el libro “Primavera Silenciosa” (*Silent Spring*). En este, se detalla un escenario de un futuro silencioso sin los cantos de los pájaros y con otras terribles consecuencias si se continuaba con el proceso degradativo producido por la contaminación ambiental. Especialmente en aquella época estaba en pleno uso el pesticida conocido como DDT, el cual generó pérdidas significativas de las poblaciones del ave emblemática de los Estados Unidos, el águila calva. El libro fue una revolución en sí misma. Se considera que la Primavera Silenciosa inspiró la movilización ecologista que consiguió que el departamento de agricultura de los Estados Unidos revisara su política sobre pesticidas y prohibiera el DDT (Calvente, 2007). Esto sentó las bases para que en los años posteriores aumentara el interés en relación con los efectos secundarios del insecticida sobre los seres vivos. Es por esto, que las nuevas estrategias de MIP buscan desarrollar formulaciones para el control de insectos plaga que se

encuadren en el marco de las “prácticas verdes”. Es así que la llamada “síntesis verde” de insecticidas tiene como objetivo diseñar procesos con bajo impacto ambiental, evitando los subproductos nocivos y minimizando la contaminación y producción de residuos (Chaudhary y Masram, 2020).

En las últimas décadas se ha impulsado la búsqueda no solo de nuevas alternativas para la protección de plantas y productos agrícolas, sino también la de sustancias insecticidas que sean inocuas y brinden protección a las personas y al ganado frente a los parásitos y vectores. Esto se debe principalmente a los riesgos ambientales y para la salud humana asociados con las aplicaciones frecuentes de pesticidas sintéticos (Pavela y Sedlák, 2018). Esta búsqueda debe ir acompañada de estudios que certifiquen que los productos son seguros para el ambiente y los seres vivos.

Los trabajos ecotoxicológicos relacionados con el impacto de los insecticidas son de vital importancia ya que, estas sustancias generalmente suelen carecer de especificidad, afectando de modo indiferente a organismos blanco y no blanco (Stanley y Preetha, 2016). Es por esto que tales estudios han involucrado a diferentes organismos. Por ejemplo se han evaluado los efectos de neonicotinoides en abejas, mariposas, caballitos del diablo y microcrustáceos (Hladik et al., 2018). Stanley et al. (2018) estudió la actividad biológica del diafenthiurón en abejas, lombrices de tierra y gusanos de seda. Además se han llevado adelante trabajos de ecotoxicología que evalúan los efectos de los insecticidas en enemigos naturales de los diferentes artrópodos plaga. Por ejemplo, se estudió la actividad del clorantraniliprol, ciantraniliprol, spinosad y spinetoram en *Bracon nigricans* Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae), un parasitoide de *T. absoluta* (Abbes et al., 2015). Se ha reportado también los efectos de insecticidas como lambda-cihalotrina, spinosad y fenitrotion en *T. evanescens* (Ndakidemi et al., 2016).



Teniendo en cuenta lo antes mencionado y para generar un perfil ecotoxicológico completo de las nanoformulaciones de los AE de esta tesis, fue de interés evaluar sus efectos sobre modelos de organismos no blanco de ambientes terrestres y acuáticos así como también estudiar sus posibles efectos adversos a nivel celular. De esta manera el trabajo realizado en este capítulo se enmarcó en tres tipos de análisis diferentes. El primero de ello se centró en el abordaje de los efectos tóxicos de las nanoformulaciones sobre *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), seleccionado como organismo no blanco modelo de ambientes terrestres. Existen varios trabajos que ponderan el valor biológico de este insecto como un organismo importante encargado del reciclado de biomasa y analizan el impacto de los insecticidas en esta especie (Gregory et al., 1994; George et al., 2009; 2010; Tavares et al., 2013). El segundo se abocó a evaluar los efectos de las nanoformulaciones en *Artemia salina* L. (Anostraca, Artemiidae), organismo no blanco modelo de ambientes acuáticos. Varios autores proponen a *A. salina* como una especie clave dentro de las redes tróficas de los cuerpos de agua continentales y a su vez puede actuar como un importante bioindicador de agentes contaminantes (Duarte et al., 2019; Onbasili y Duman, 2010; Wang et al., 2011). Con el objetivo de obtener valores de referencia sobre la toxicidad de las nanoformulaciones en ambiente acuáticos, se seleccionó un insecto plaga representante de este tipo de medio, como es *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae). Tales valores fueron utilizados para comparar los efectos de estos productos sobre *A. salina*. Cabe aclarar que este mosquito ha demostrado tener un papel fundamental en la transmisión de la filariasis linfática causada por *Wuchereria bancrofti* y otros importantes arbovirus (Gopalakrishnan y Veer, 2018). Por último y a modo de completar los estudios toxicológicos se evaluaron los efectos de las nanofomulaciones en células de fenotipo osteoblástico como modelo celular de mamíferos.

#### **4.A.2. Organismos en estudio:**

##### **4.A.2.a. Clasificación *Tenebrio molitor***

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Coleoptera

**Familia:** Tenebrionidae

**Género:** *Tenebrio*

**Especie:** *Tenebrio molitor* L.

*T. molitor*, también conocido como gusano de la harina, pertenece a la familia Tenebrionidae, de la cual se conocen cerca de 14.600 especies que presentan diferentes características en cuanto a su morfología, tamaño y coloración (Díaz Gámez, 2014). *T. molitor* es una especie autóctona de Europa y actualmente se distribuye por todo el mundo (Azagoh et al., 2016).

El ciclo de vida del *T. molitor* es variable, aproximadamente dura entre 280 – 600 días. Las hembras pueden depositar entre 250 a 1000 huevos. Estos huevos son incubados, en condiciones óptimas de temperatura (18 a 20 °C), durante aproximadamente 10 a 12 días. Al cabo de este tiempo eclosionan las larvas que pasaran por varios estadios, durante un periodo que puede abarcar de 3 a 4 meses, incluso puede llegar a durar hasta 18 meses dependiendo de las condiciones de cría (Makkar et al., 2014). La siguiente etapa es la de pupa que, a una temperatura de 25 °C, tiene una duración de 7 a 9 días o en su defecto puede llegar hasta 20 días a temperaturas más bajas. Finalmente, transcurrido este tiempo alcanzan el estado adulto que puede durar desde dos a tres meses (Azagoh et al., 2016; Makkar et al., 2014).

#### Lámina 4.1. Características morfológicas de *Tenebrio molitor*

**Adultos:** miden aproximadamente 18 mm de largo y 4 mm de ancho. Al eclosionar de la pupa, los adultos son de color blanquecino. Conforme pase el tiempo irán adquiriendo un tono marrón. En una semana ya adquieren el color negro-marrón propio del adulto y son sexualmente maduros. Además presentan un cuerpo compacto con bordes paralelos (Azagoh et al., 2016).



**Huevos:** son ovalados, de color blanco y con forma de riñón, se los suele encontrar aisladamente o bien en una disposición de racimo. Presentan un tamaño aproximado de 1 mm (Medrano Vega, 2019)

**Larvas:** pueden llegar a transcurrir hasta por 15 estadios y estas etapas se irán

diferenciando por el tamaño y la coloración. Las larvas de los primeros estadios son blancas y van adquiriendo un color amarillento a medida que aumentan su tamaño desde 1 hasta los 20 o 30 mm. Las larvas maduras promedio de los últimos estadios poseen un color marrón claro, y una longitud de 20 mm con un peso de 160 mg, aproximadamente (Díaz Gámez, 2014).



**Pupas:** son de tipo libre, de color blanco en un principio y se tornan marrones conforme maduran (Makkar et al., 2014).



#### **4.A.2.b. Clasificación *Culex pipiens pipiens***

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Diptera

**Familia:** Culicidae

**Género:** *Culex*

**Especie:** *Culex pipiens pipiens* L.

Es una especie de amplia distribución en el mundo, encontrándose desde los trópicos a las regiones templadas (Foster y Walker, 2019). La familia de este insecto involucra alrededor de 3.450 especies descritas en el mundo y su gran mayoría se concentra en las zonas tropicales y subtropicales (Cetin et al., 2012).

Los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo de vida: huevo - larva - pupa - adulto. Los estados inmaduros son acuáticos, en tanto que los adultos son de vida terrestre. Los huevos del género *Culex* son colocados en la superficie del agua en masas (Dehghan et al., 2010). El desarrollo embrionario varía de acuerdo a factores externos como la temperatura; en épocas cálidas, el período de incubación es generalmente de 2 o 3 días. Cuando las condiciones ambientales son favorables, el estado larval dura de 8 a 10 días, y posee cuatro estadios. En general, la duración del estado pupal es de alrededor de 2 días en condiciones favorables, siendo la pupa del macho de menor tamaño que la de la hembra (Kiarie-Makara et al., 2015). El ciclo completo de huevo a adulto, en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, ocurre en aproximadamente 10 días. Generalmente, el período de vida de las hembras es de aproximadamente 2 semanas a un mes (siendo más longevas que los machos) y pueden llegar a colocar entre 100 y 300 huevos (Salomón, 2005).

#### Lámina 4.2. Características morfológicas de *Culex pipiens pipiens*

**Adultos:** son pequeños (aproximadamente 6 mm), de cuerpo delgado y patas largas. En cuanto al color, el cuerpo es castaño claro, casi amarillento en el tórax con patas oscuras y abdomen claro ventralmente y oscuro en el dorso, con bandas claras transversales. Generalmente, los machos son de menor tamaño que las hembras. Tienen alas angostas, cubiertas de escamas (Salomón, 2005).



más claro. En la cabeza se distinguen las manchas oculares, antenas y piezas bucales filtradoras. En el extremo posterior del abdomen poseen un sifón respiratorio y 4 pares de cerdas (Vinogradova, 2003).



**Pupas:** presentan dos regiones corporales: el cefalotórax, que lleva las trompetas respiratorias, y el abdomen, que termina en las paletas natatorias (Salomón, 2005).



**Huevos:** son alargados, en general, elípticos y de color claro al momento de ser colocados, pero se oscurecen después de algunas horas. El tamaño varía pero en términos generales miden unos 0,6 a 0,8 mm (Vinogradova, 2000).

**Larvas:** presentan la cabeza de color castaño oscuro y el resto del cuerpo algo

#### **4.A.2.c. Clasificación *Artemia salina***

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Crustacea

**Clase:** Branchiopoda

**Orden:** Anostraca

**Familia:** Artemiidae

**Género:** *Artemia*

**Especie:** *Artemia salina* L.

*Artemia salina* es una especie cosmopolita, propia de aguas salobres continentales. Como mecanismo adaptativo a los cambios ambientales que pueden sucederse en este tipo de ambiente, estos crustáceos pueden entrar en anabiosis durante el estado de huevo. Se originan así, de forma característica, estructuras de resistencia denominadas quistes que pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos (Kumar y Babu, 2015).

El ciclo de vida comienza con la hidratación de los quistes y su posterior eclosión luego de unas 48 h. La primera larva es de tipo nauplius y suele permanecer en este estadio unas 30 h, pasando posteriormente a un estadio de metanauplius. *A. salina* suele atravesar por unas 15 mudas hasta alcanzar la adultez, proceso que lleva alrededor de 2 semanas en total (Shaala et al., 2015).

**Lámina 4.3. Características morfológicas de *Artemia salina* (Criel y Macrae, 2002)**

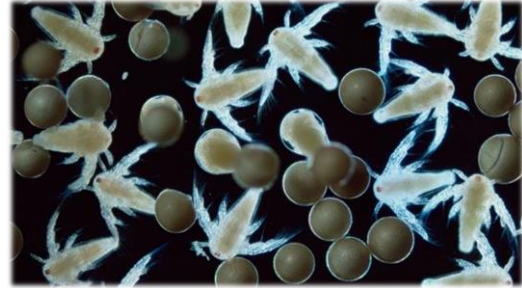
**Adultos:** son pequeños (10 mm de longitud) con una coloración anaranjada translúcida. En la cabeza se hallan un par de ojos compuestos pedunculados, apéndices bucales y antenas que varían según el sexo. El tórax posee filopodios que posibilitan la movilidad y el abdomen lleva los órganos reproductivos (en el caso de la hembra un saco ovigero).



**Huevos:** suelen tener una coloración anaranjada, son de forma oval y tal lo mencionado frente a condiciones adversas constituyen estructuras de resistencia denominadas quistes.

**Nauplii:** son el primer estadio larvario, translúcido y mide aproximadamente unas 250 micras. Además, en la cabeza, entre las anténulas tienen un único ocelo de color

rojo. No se alimenta ya que su aparato digestivo no es funcional.



**Metanauplii:** Es el siguiente estadio larvario que se caracteriza por la presencia de filopodios. El tamaño en esta fase se incrementa notablemente. En este estadio el aparato digestivo ya es funcional y el segundo par de antenas filtra partículas alimenticias.

**Pre – adultos:** En este estadio comienzan a aparecer las diferentes características que van a identificar a los machos y hembras. El principal carácter distintivo son las antenas, que en las hembras son muy pequeñas, mientras que en los machos son más grandes y tienen forma de pinzas o tenazas.

### 4.A.3. Hipótesis

A partir de lo expuesto con anterioridad, se formularon las siguientes hipótesis de trabajo:

- Las NPAE y las NEs cargadas con los AE de geranio, menta y palmarosa no presentan efectos tóxicos en *T. molitor* (organismo modelo terrestre).
- Las NPAE y las NEs cargadas con los AE de geranio, menta y palmarosa potencian la actividad larvívica de los AE en *Cx. p. pipiens*.
- Las nanoformulaciones no presentan efectos nocivos en *A. salina* a dosis comparables a las usadas en *Cx. p. pipiens*.
- Las NEs no reducen la viabilidad en células de fenotipo osteoblástico.

#### 4.A.4.a. Objetivo general

El objetivo general es evaluar los efectos toxicológicos de las NPAE y NEs en organismos no blanco como *T. molitor*, *A. salina* y en células de fenotipo osteoblástico.

#### 4.A.4.b. Objetivo específicos

- Evaluar la toxicidad de las NPAE de los AE de geranio, menta y palmarosa en larvas de *T. molitor*.
- Estudiar los efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL combinadas con  $\beta$ -cipermetrina en larvas de *T. molitor*.
- Obtener valores toxicológicos de referencia de las NPAE y las NEs en larvas de *Cx. p. pipiens*.
- Estudiar el efecto tóxico de las NPAE y de las NEs en *A. salina*.
- Evaluar los efectos de las NEs en la viabilidad de las células de fenotipo osteoblástico.



## **4.B. Materiales y métodos**

### **4.B.1. Cría de *Cx. p. pipiens***

Con el objetivo de obtener valores de referencia para evaluar los efectos de las NPAE y de las NEs en organismos acuáticos y en células de mamíferos se realizaron ensayos de toxicidad de estos productos en larvas de *Cx. p. pipiens*. Las larvas de mosquito se recolectaron de un área de agua estancada y se aclimataron durante 48 h en una sala de cría del laboratorio de Zoología de Invertebrados II de la UNS, a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **4.B.2. Cría de *T. molitor* y *A. salina***

Como modelo de organismo no blanco terrestre se utilizaron larvas de *T. molitor*. Las colonias de este insecto se mantuvieron en una cámara de cría en oscuridad. Las larvas se desarrollaron en contenedores de plástico de 20 cm × 20 cm × 30 cm (largo x ancho x alto). Cada uno de estos contenedores contenía una mezcla de harina de trigo, harina de maíz y avena (2: 1: 1 p / p).

Por otra parte, como modelo de organismo no blanco acuático se emplearon larvas nauplis de *A. salina* de 48 h. Para ello los quistes se colocaron en agua destilada durante 24 h para hidratarlos. Posteriormente, se trasladaron a un recipiente con agua de mar sintética (salinidad: 33 ppm), con iluminación y aireación continua mantenido a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Luego de la eclosión, las nauplius se mantuvieron en estas condiciones durante 48 h hasta su utilización en los bioensayos.

### **4.B.3. Cultivo celular**

Para evaluar la toxicidad de los AE y sus nanoformulados en células de mamíferos se realizaron experimentos *in vitro* empleando cultivos primarios de células de fenotipo osteoblástico de rata neonata. Las células se obtuvieron por decapitación de ratas Wistar (3-5 días de edad) pertenecientes al bioterio de la Universidad Nacional del Sur (UNS), según los protocolos ya descritos en Katz et al. 2008 y de acuerdo a las normativas de la Guía para el

Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, NIH) y al protocolo aprobado por el Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la UNS (CICUAE). Luego de la extracción del cráneo se apartó la piel y el tejido de la base y se extrajo la parte superior de la caja craneana. El tejido óseo se lavó con PBS 1X conteniendo EDTA 4 mM y se disoció enzimáticamente por agitación en solución salina con colagenasa 200U/ml (37 °C, 10 min), procedimiento que se repitió 3 veces. Las células de fenotipo osteoclástico disociadas en la primera digestión enzimática se descartaron, mientras que aquellas correspondientes a los períodos posteriores de digestión, de fenotipo osteoblástico, se recolectaron por centrifugación (Bellows et al. 1986). Tales células se cultivaron en placas de vidrio en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina y estreptomina hasta alcanzar 80% de confluencia (a 37 °C en atmósfera humidificada, con 5,5% de CO<sub>2</sub>). Luego, se desprendieron con tripsina (0,25% PBS 1X) y se resuspendieron en  $\alpha$ -MEM 10% SFB para el recuento en el hemocitómetro. Para ello, se cargó la cámara de Neubauer con la suspensión celular y se llevó a cabo el conteo en los cuatro cuadrantes externos para obtener el número total de células (Número Total = promedio de células ubicadas en los cuatro cuadrantes x 10.000 x volumen final). Seguidamente, las células se criopreservaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en N<sub>2</sub> líquido hasta el momento de su utilización.

#### **4.B.4. Bioensayos ecotoxicológicos con *T. molitor***

En primer lugar se estudió el efecto de las NPAE de los AE de geranio, menta y palmarosa en larvas de *T. molitor* (con un peso similar a las larvas del IV estadio de *P. interpunctella*). Para ello se trataron papeles de filtro (diámetro de 9,4 cm) con las NPAE que se esparcieron directamente sobre estos a concentraciones comparables a las usadas en el ensayo de *P. interpunctella* (capítulo 2). Las concentraciones abarcaron un rango de entre 25 y 600  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (teniendo en cuenta la eficiencia de cargado de cada NP). Luego, los papeles de filtro se colocaron en bases de cajas de Petri (9,4 cm de diámetro x 1,9 cm). A continuación se

agregaron 10 larvas de *T. molitor* y se cubrieron con una tela fina tipo voile. En cuanto al control, en este caso se utilizó PEG-6000 procesado según 2.B.1 sin agregado de AE. Por cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas. Los insectos se mantuvieron en condiciones controladas a  $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16:8 h L:O. La mortalidad de los insectos se determinó trascurridas las 72 h de exposición a los productos.

El segundo ensayo fue el estudio del efecto combinado de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL con  $\beta$ -cipermetrina en *T. molitor*. El primer paso entonces fue realizar un pretratamiento con las NEs a una dosis  $20 \mu\text{g}$  de larva<sup>-1</sup> (equivalente a la dosis evaluada para larvas de *P. interpunctella*). Luego de trascurridas 2 h de este tratamiento se aplicaron soluciones acetónicas de  $\beta$ -cipermetrina en dosis que variaron desde 0,003 a  $0,06 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup>. Para el caso de los controles, uno de ellos se realizó con acetona sola, otro con surfactante solo y un tercero con la aplicación secuencial acetona + surfactante. Luego de la aplicación de los productos, los insectos se acondicionaron en frascos de vidrio de 25 ml y se mantuvieron a  $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16:8 h L:O. Por cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas. La mortalidad de los insectos se determinó trascurridas las 72 h de exposición a los productos. Cabe mencionar que por medio de un ensayo preliminar se determinó que las NEs a dosis de 20, 40 y  $80 \mu\text{g}$  larva<sup>-1</sup> no generaron efectos letales en larvas de *T. molitor*.

#### **4.B.5. Ensayos preliminares de toxicidad en *Cx. p. pipiens***

Los bioensayos se llevaron a cabo bajo los protocolos propuestos por la OMS (2005), utilizando larvas del IV estadio de *Cx. p. pipiens*. Para evaluar la toxicidad de los AE de geranio, menta, palmarosa y la mezcla AE palmarosa:AL (1:1), cada uno se agregó a 250 ml de agua corriente que contenía Tween 80 (1% p / v); para el caso de las NPAE y las NEs, las mismas se adicionaron a 250 ml de agua corriente sola. Las mezclas se mantuvieron bajo agitación magnética durante 15 minutos y se trasvasaron 50 ml de las mismas a un recipiente plástico. Las concentraciones empleadas variaron desde 10 a 250 ppm. Como control se utilizó agua

sola (o agua + Tween 80 (1% p / v); además se evaluó el efecto del PEG 6000 y el Tween 80 solos (en la proporción correspondiente a la usada para la elaboración de las nanoformulaciones) a la máxima concentración. A cada recipiente se le agregaron 20 larvas de *Cx. p. pipiens* que se mantuvieron en condiciones controladas ( $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16: 8 h L: D fotoperíodo). Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado (n = 80). Después de 24 h de exposición se registró la mortalidad.

#### **4.B.6. Bioensayos ecotoxicológicos con *A. salina***

En el presente trabajo, las nauplis de *A. salina* de 48 horas de edad fueron expuestas a las NPAE y las NES. Distintas cantidades de las nanoformulaciones se mezclaron bajo agitación magnética (15 min) con 30 ml de agua de mar sintética recién preparada a fin de obtener concentraciones que variaron desde 25 a 100 ppm. 6 ml de estas mezclas se trasvasaron a viales de vidrio a los que se les agregaron 20 nauplius que se mantuvieron en condiciones controladas ( $27 \pm 2$  °C, 45-50% HR. y 16: 8 h L: D fotoperíodo). Se realizaron dos controles, uno sin tratamiento alguno y el otro que contenía PEG-6000 o Tween 80 (en la proporción correspondiente a la usada para la elaboración de las nanoformulaciones) a una concentración máxima. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Después de 24 h de exposición se registró la mortalidad.

#### **4.B.7. Ensayo de viabilidad celular**

Para los experimentos, las células de fenotipo osteoblástico se descongelaron y sembraron en placas de vidrio de 10 cm de diámetro hasta alcanzar 80% de confluencia. Luego, se desprendieron con tripsina, se sembraron en multiwells (Costar, 48 pocillos) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 2-3 días en  $\alpha$ -MEM 10% SFB. De este modo, cada lote de células empleado en los experimentos tiene dos pasajes o repiques. Este procedimiento evita posibles transformaciones del fenotipo celular debido a sucesivos pasajes

(Towler y Arnaud, 2002). Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, las células se expusieron a  $\alpha$ -MEM 1% SFB durante 16 h antes de comenzar los tratamientos.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando las NEs de Tween 80 elaboradas según lo descrito en el capítulo 3, las cuales se adicionaron directamente al medio que contenía a las células de fenotipo osteoblástico. Dadas las características del medio de cultivo, que es líquido, se decidió evaluar el efecto de las NEs a las dosis de 50 ppm para el caso de menta y palmarosa + AL y a 75 ppm para el de las NEs de geranio. Estas dosis son equivalentes a los valores de  $CL_{90}$  registrados en el ensayo con *Cx. p. pipiens* (NEs de geranio = 74,21 ppm; NEs de menta = 46,73 ppm; NEs de palmarosa + AL = 47,25 ppm). También se analizaron tres condiciones de control: una que contiene el medio solo, otra que contenía el medio + Tween 80 en la proporción correspondiente a las NEs menta y palmarosa + AL y la última que contenía el medio + Tween 80 en la proporción correspondiente a las NEs de geranio. Se realizaron tres ensayos independientes a fin de evaluar la viabilidad celular 24, 72 y 168 h. En el último caso, el medio de cultivo con el tratamiento se renovó cada 48 h.

En cuanto a la determinación de la viabilidad celular, ésta se llevó a cabo mediante la tinción con Rojo Neutral según Repetto et al. (2008). Al finalizar el período experimental, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el colorante en  $\alpha$ -MEM por 3 h a 37 °C. Luego, se removió el exceso de colorante con PBS 1X y se fotografió en un microscopio invertido. Se extrajo el colorante mediante una solución removedora (50:49:1; etanol, agua, ácido acético) y esta solución se cuantificó a 540 nm. Paralelamente se realizó un blanco de reactivos.

En lo que respecta a los ensayos ecotoxicológicos de las NPAE en células de fenotipo osteoblástico, los mismos estaban programados para ser llevados a cabo durante el presente año (2020). Sin embargo, ante la situación de pánico relacionado al virus Sars cov 2 y tal como establecido por el decreto del gobierno nacional que dictó “el distanciamiento social preventivo y obligatorio” (Decreto 297/2020), estos ensayos no pudieron ser llevados a

cabo. Por tal motivo, se decidió que los mismos se realizaran una vez retomadas las actividades en el laboratorio. Para llevar adelante el futuro ensayo las NPAE se sembrarán por separado en medio de cultivo con células de fenotipo osteoblástico, a las dosis de referencia tomadas de los datos de  $CL_{90}$  del ensayo con *Cx. p. pipiens* (NPAE de geranio = 82,39 ppm; NPAE de menta = 133, 92 ppm; NPAE de palmarosa = 106,82 ppm). También se analizarán dos condiciones de control: una que contendrá el medio solo y la otra que tendrá el medio + PEG-6000 (PEG-6000 procesado según 2.B.1 sin agregado de AE). La viabilidad celular se registrará durante 24 h, 72 h y 168 h. En este último caso, los medios de tratamiento se renovarán cada 48 h. Cabe destacar que esta parte de la investigación que involucra los estudios de los efectos de las nanoformulaciones en la viabilidad celular se realizó bajo la supervisión de las doctoras Valería Gilli y Graciela Santillan, pertenecientes al INBIOSUR (Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur – CONICET-UNS).

#### 4.B.8. Análisis estadístico

En el caso de los ensayos llevados a cabo con *Cx. p. pipiens* y *A. salina* la mortalidad fue registrada luego de 24 h de exposición, mientras que para *T. molitor*, la mortalidad fue registrada a las 72 h con el objetivo de obtener los valores de  $CL_{50}/CL_{90}$  o  $DL_{50}/DL_{90}$ . En el caso de *Cx. p. pipiens* y *A. salina*, el tiempo de exposición se determinó en base al periodo (breve) que los organismos transcurren en ese estadio larval específico. Para el caso de *T. molitor* se seleccionó un tiempo de exposición igual al utilizado en los bioensayos con larvas del IV estadio de *P. interpunctella*. El análisis estadístico fue llevado adelante empleando el software SPSS 25.0. Los valores  $CL_{50}/CL_{90}$  o  $DL_{50}/DL_{90}$  fueron considerados diferentes si sus intervalos de confianza del 95% no se superponían.

Por otra parte, para el caso del bioensayo de viabilidad celular, los datos se analizaron usando el programa InfoStat. Se eligió ANOVA como método para determinar diferencias estadísticas entre los valores medios de los tratamientos. Estos valores se compararon utilizando el test *post hoc* para múltiples comparaciones de Bonferroni.

#### 4.C. Resultados

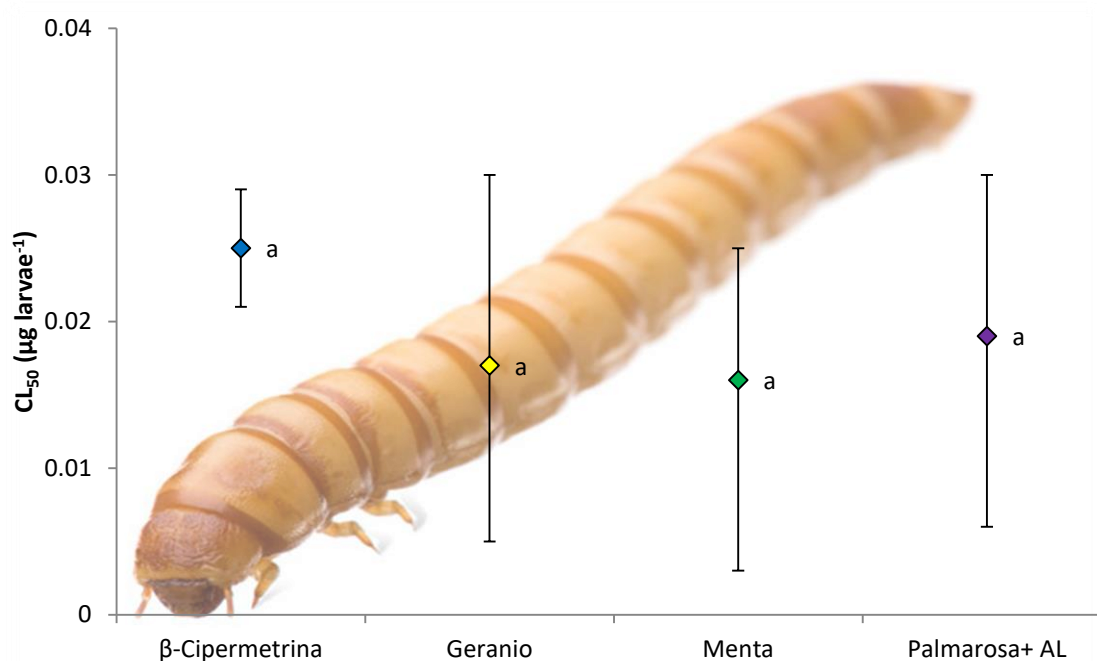
##### 4.C.1. Bioensayos ecotoxicológicos con NPAE y NEs en larvas de *T. molitor*.

En lo que respecta al estudio biológico de las NPAE en organismos no blanco terrestres, los ensayos llevados a cabo en *T. molitor* demostraron que ninguna de las tres NP formuladas tuvieron efecto alguno por contacto en este insecto, incluso a la máxima dosis evaluada ( $600 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Tampoco se registró mortalidad en el control con PEG- 6000.

En este capítulo también se analizó el efecto de las NEs en *T. molitor*. El ensayo llevado a cabo fue el mismo que se empleó para evaluar la toxicidad en larvas de *P. interpunctella*, por lo cual se analizó el efecto combinado de las NEs y la  $\beta$ -cipermetrina. En el caso de las NEs de geranio, el valor de  $DL_{50}$  fue  $0,017 \mu\text{g larvas}^{-1}$  (0,009 - 0,030). Para las NEs de menta combinadas con  $\beta$ -cipermetrina, el valor de  $DL_{50}$  fue de  $0,016 \mu\text{g larvas}^{-1}$  (0,003 - 0,025) y finalmente, para las NEs de palmarosa + AL combinados con  $\beta$ -cipermetrina, el valor de  $DL_{50}$  fue  $0,019 \mu\text{g larvas}^{-1}$  (0,006 - 0,030). Al evaluar el efecto de la cipermetrina sola se obtuvo una  $DL_{50} = 0,025 \mu\text{g larvas}^{-1}$  (0,021-0,029). No se observaron diferencias significativas entre el efecto del piretroide solo o en combinación con las NEs ( $P > 0,05$ ). Cabe resaltar que no se registró mortalidad en el control. Esto demuestra que las NEs no potencian la actividad insecticida de la cipermetrina en este insecto, motivo por lo cual pueden considerarse relativamente seguras para estos organismos no blanco.



**Figura 4.1.** Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en larvas de *T. molitor*.



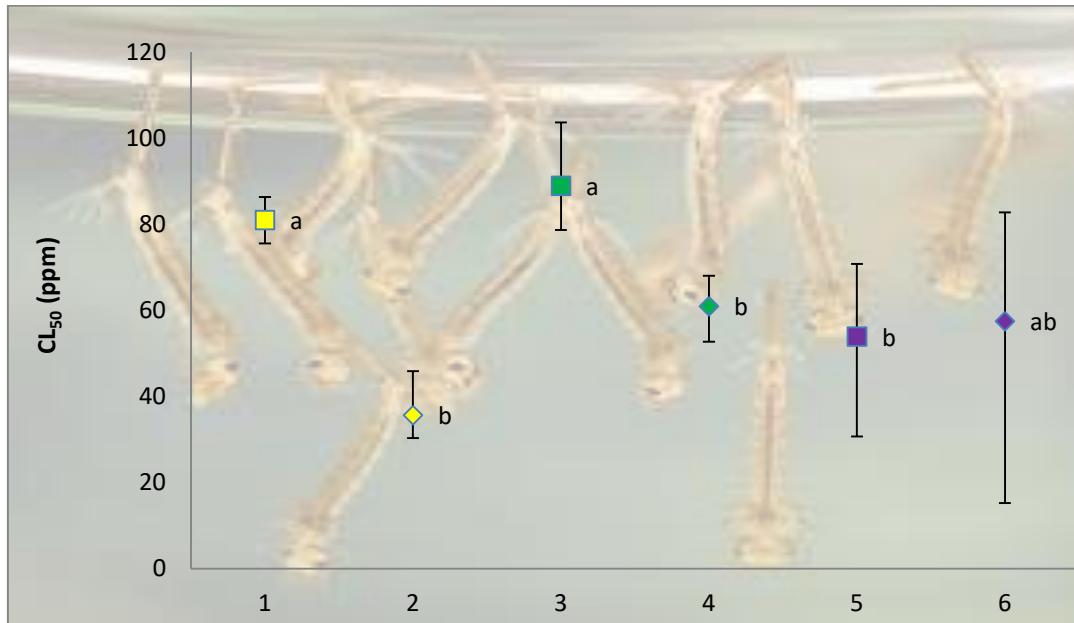
\*Letras similares indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

#### 4.C.2. Bioensayos ecotoxicológicos en organismos acuáticos.

##### 4.C.2.a. Ensayos previos de toxicidad con NPAE y NEs en *Cx. p.pipiens*

En la Fig. 4.2 se detallan los valores de toxicidad de CL<sub>50</sub> de los AE y sus NPAE en larvas IV de *Cx. p.pipiens*. Como primer resultado es importante resaltar que se encontraron diferencias significativas entre los valores de CL<sub>50</sub> de los AE de geranio y menta y los hallados para sus respectivas NPAE y el aceite de palmarosa ( $P < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el efecto larvicida del AE de palmarosa y sus NPAE ( $P > 0,05$ ). En el caso del AE de geranio, el valor de CL<sub>50</sub> fue de 80,97 ppm (75,49 - 86,29) y de sus NPAE fue de 35,64 ppm (30,34 - 45,95). Por lo tanto las NPAE potenciaron el efecto larvicida unas 2,27 veces. En el caso del AE de menta, el valor CL<sub>50</sub> fue 88,90 ppm (78,68 - 103,61), mientras que para las NPAE fue de 60,92 ppm (37,71 - 77,80); lo que demuestra que las NPAE incrementaron la actividad insecticida del AE unas 1,45 veces. Finalmente, el AE de palmarosa mostró un valor de CL<sub>50</sub> de 53,91 ppm (45,68 - 61,01), y sus NPAE tuvieron una CL<sub>50</sub> de 57,45 ppm (35,283 - 79,75). En estos bioensayos no se registró mortalidad en los controles.

**Figura 4.2.** Toxicidad de los AE de geranio, menta y palmarosa y sus NPAE en larvas IV de *Cx. p. pipiens*.

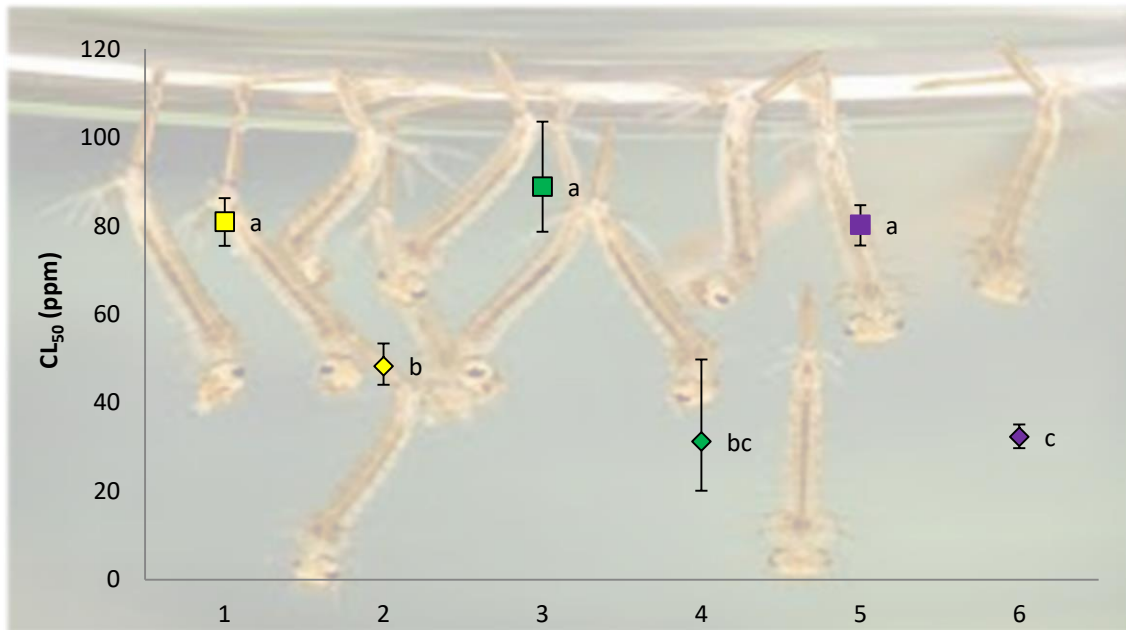


\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (superposición de IC,  $P < 0.05$ ).

- |                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| 1. AE de geranio   | 4. NPAE de menta     |
| 2. NPAE de geranio | 5. AE de palmarosa   |
| 3. AE de menta     | 6. NPAE de palmarosa |

La Fig. 4.3 muestra los valores de toxicidad de los AE de geranio, menta y palmarosa + AL y de sus NEs para las larvas del IV estadio de *Cx. p. pipiens*. Es importante resaltar que no se encontraron diferencias significativas entre la actividad larvicida de los AE ( $P > 0,05$ ), pero si las hubo entre los AE y sus NEs ( $P < 0,05$ ). Con respecto a las NEs se hallaron diferencias significativas entre los valores de  $CL_{50}$  de las NEs de geranio y palmarosa ( $P < 0,05$ ); sin embargo no hubo diferencias entre estas NEs y las elaboradas con el AE menta ( $P > 0,05$ ). Como se mencionó, para el AE de geranio el valor obtenido de  $CL_{50}$  fue de 80,97 ppm (75,49 - 86,29) y en el caso de las NEs fue de 48,27 ppm (44,09 - 53,39). En consecuencia, las NEs potenciaron el efecto larvicida unas 1,67 veces. En el caso del AE de menta, el valor  $CL_{50}$  fue de 88,90 ppm (78,68 - 103,61), mientras que para las NEs tal valor fue de 31,24 ppm (20,11 - 49,76). Por lo tanto, las NEs aumentaron la actividad insecticida 2,84 veces. Finalmente, para el AE de palmarosa + AL el valor de  $CL_{50}$  encontrado fue de 80,29 ppm (75,58 - 84,71), y en las NEs, 32,30 ppm (29,71 - 35,09), por lo que las NEs potenciaron la bioactividad 2,49 veces.

**Figura 4.3.** Toxicidad de los AE de geranio, menta y palmarosa y sus NEs en larvas IV de *Cx. p.pipiens*.



\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (superposición de IC,  $P < 0.05$ ).

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1. AE de geranio  | 4. NEs de menta                           |
| 2. NEs de geranio | 5. AE de palmarosa + acetato de linalilo  |
| 3. AE de menta    | 6. NEs de palmarosa + acetato de linalilo |

Las NEs y las NPAE, con excepción de las palmarosa, potenciaron la actividad larvicida de los AE. A su vez, estos estudios preliminares aportaron los valores aproximados para realizar la comparación de toxicidad de estos dos productos en organismos acuáticos como *A. salina*. Finalmente, mediante este ensayo, también se obtuvieron los valores de  $CL_{90}$  que serán empleados para realizar los ensayos de toxicidad en cultivos celulares de mamíferos.

#### 4.C.2.b. Ensayos ecotoxicológicos con NPAE y NEs en *A. salina*.

En los ensayos ecotoxicológicos de las NPAE en *A. salina* se observó variabilidad en los resultados entre las NPAE (tabla 4.1). Por ejemplo, con las NPAE de geranio, no se registró mortalidad incluso a la máxima dosis (75 ppm). Para el caso de las NPAE de menta el valor de  $CL_{50}$  que se obtuvo fue de 18,45 ppm (5,48 - 26,86), mientras que las NPAE de palmarosa fueron muy tóxicas incluso a bajas concentraciones, por lo cual no se pudo obtener un valor de  $CL_{50}$ . No se observó mortalidad en el control. Por los resultados registrados, las NPAE de menta y palmarosa demostraron no ser un producto seguro para su aplicación en ambientes

acuáticos, por lo que se recomienda el uso de las NPAE de geranio, que no mostraron tales efectos en organismos de estos ambientes.

**Tabla 4.1.** Efectos de las NPAE de geranio, menta y palmarosa en larvas naupli de 48 h de *A. salina*.

NPAE	CL <sub>50</sub> (ppm)	Intervalo de confianza
<b>Geranio</b>	No calculado (no se registra mortalidad a 75 ppm)	
<b>Menta</b>	18,45	(5,48 – 26,86)
<b>Palmarosa</b>	No calculado (100% mortalidad a 25 ppm)	

Los resultados de los ensayos de toxicidad en *A. salina* mostraron que las NEs de menta se observó un valor de CL<sub>50</sub> de 63,96 ppm (61,26 - 67,01), mientras que en las NEs de palmarosa + AL el valor de CL<sub>50</sub> fue de 42,57 ppm (40,26 - 44,68) (Tabla 4.2). Los valores de CL<sub>50</sub> hallados para *A. salina* fueron significativamente más altos que los valores de CL<sub>50</sub> de *Cx. p. pipiens*, al comparar cada tipo de NEs entre sí (P < 0,05). Esto demuestra que ambas NEs son formulaciones que actúan específicamente y por lo tanto resultan ser más amigables con el ambiente. Es importante resaltar que no se pudo obtener un valor de CL<sub>50</sub> de las NEs de geranio, ya que a dosis bajas (50 ppm) se producía el 100% de mortalidad en las larvas naupli. No se observó mortalidad en el control.

**Tabla 4.2.** Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + acetato de linalilo (AL) en larvas naupli de 48 h de *A. salina*.

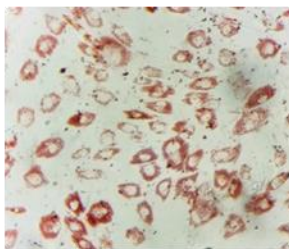
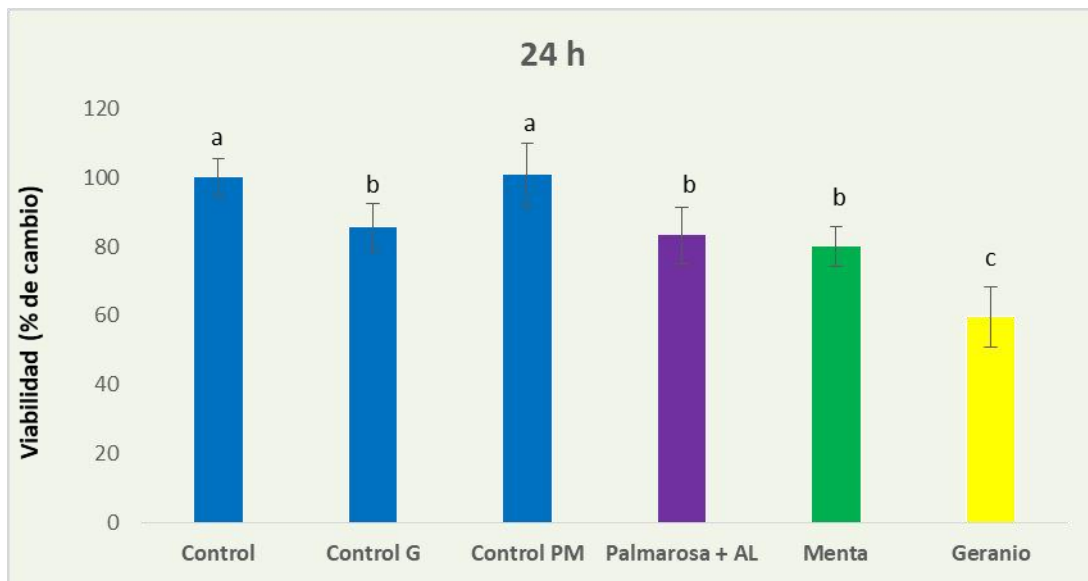
NEs	CL <sub>50</sub> (ppm) <sup>a</sup>	Intervalo de confianza
<b>Geranio</b>	No calculado (100% mortalidad a 50 ppm)	
<b>Menta</b>	63,96 A	(61,26 - 67,01)
<b>Palmarosa + AL</b>	42,57 B	(40,26 - 44,68)

<sup>a</sup> Los valores seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas (P < 0,05).

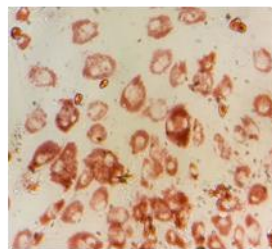
#### 4.C.3. Ensayo de viabilidad en células tratadas con NEs

En la Fig. 4.4 se muestran los resultados del ensayo de viabilidad con células de fenotipo osteoblástico tratadas con las NEs a las 24 h. Como se puede observar todas las NEs disminuyeron significativamente la viabilidad celular, especialmente la NEs de geranio en comparación con el control solo y con Tween 80 ( $P < 0,05$ ). Al analizar el efecto de estos nanosistemas a las 72 h, se puede observar que los controles con Tween 80 y las NEs de menta y palmarosa + AL, produjeron un incremento estadísticamente significativo en la viabilidad celular en comparación con el control ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, las NEs de geranio tuvieron el efecto contrario, reduciendo significativamente la viabilidad celular ( $P < 0,05$ ) (Fig. 4.5). En lo que respecta al tratamiento de las células con las NEs a las 168 h (Fig. 4.6), en comparación con los grupos control, las NEs de menta y palmarosa + AL no produjeron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), mientras que las NEs de geranio redujeron marcadamente la viabilidad celular ( $P < 0,05$ ). Estos resultados demuestran que las NEs de menta y palmarosa + AL, pueden ser consideradas como productos con una toxicidad baja o nula en células de mamíferos.

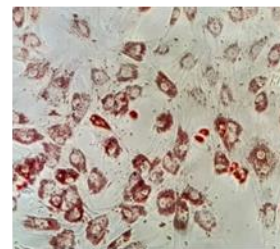
**Figura 4.4.** Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 24 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm.



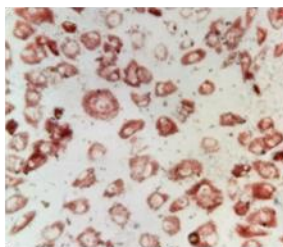
Control



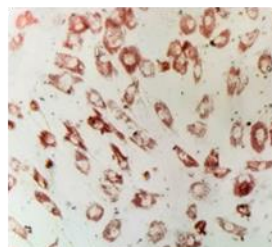
Control G



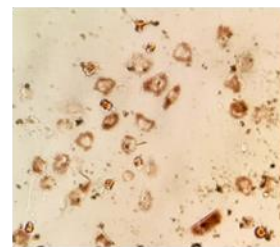
Control PM



NEs de  
palmarosa + AL



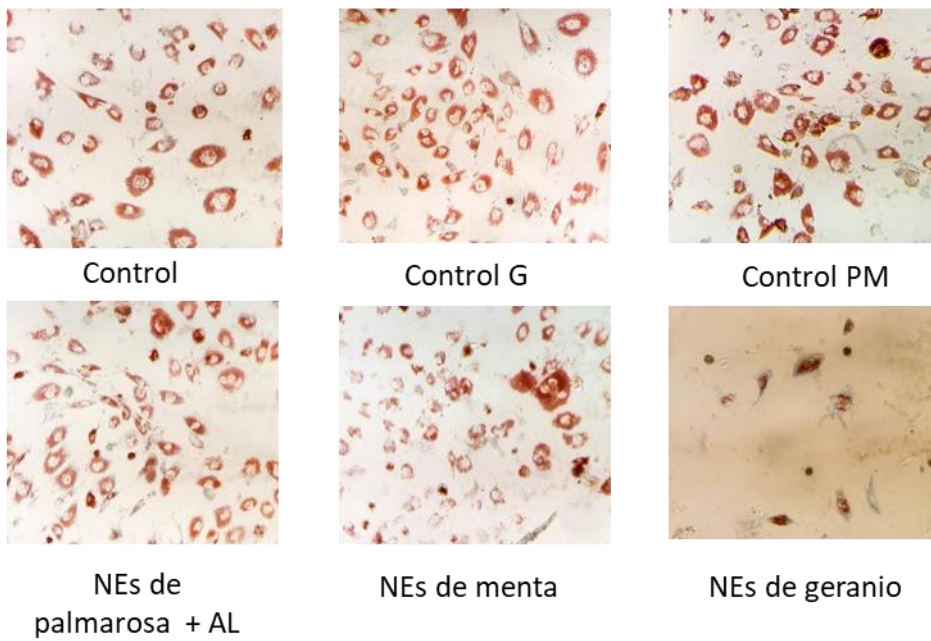
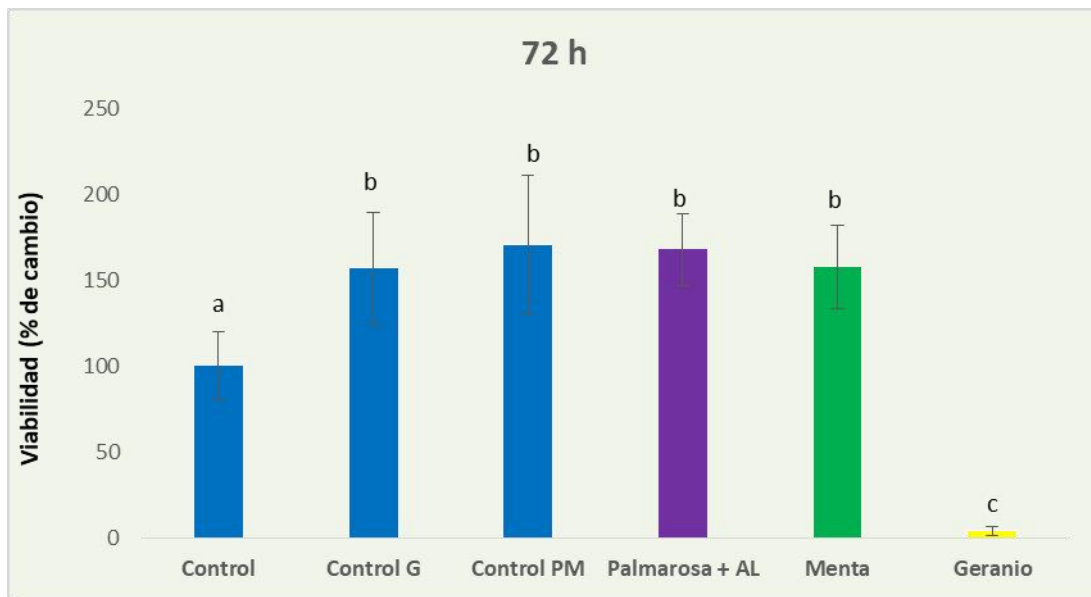
NEs de menta



NEs de geranio

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

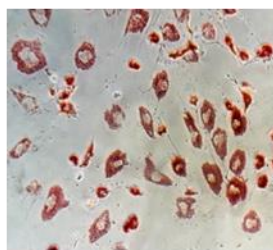
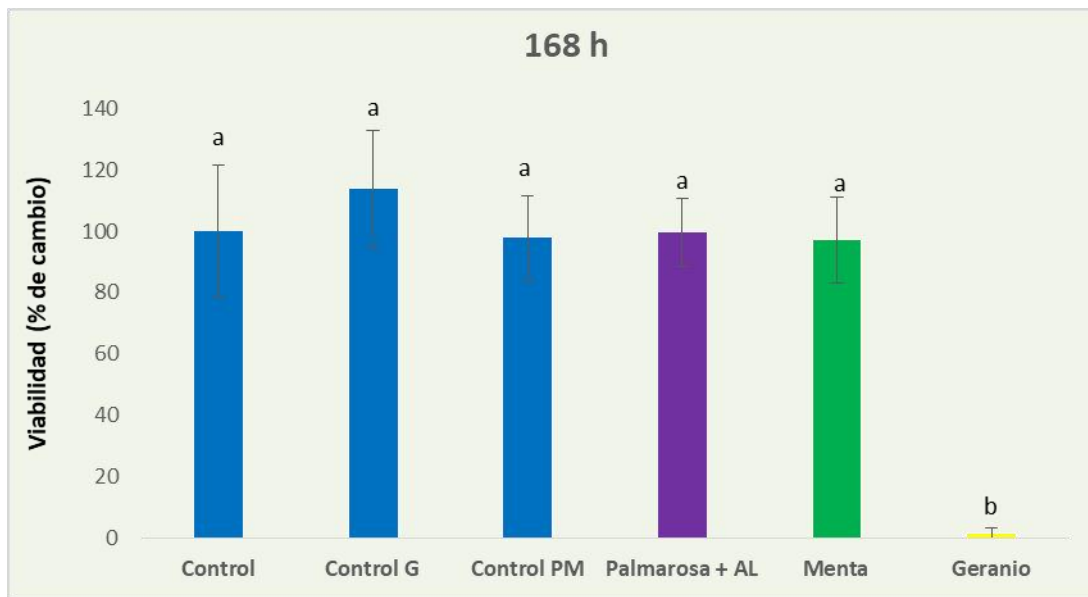
**Figura 4.5.** Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 72 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm.



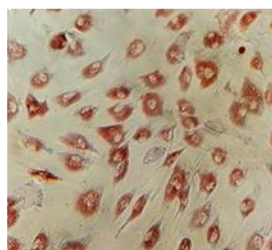
\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )



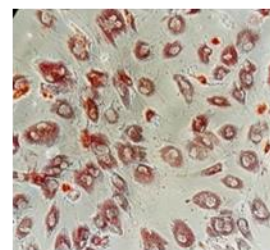
**Figura 4.6.** Efectos de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL en la viabilidad celular a las 168 h de exposición. Control G: Tween 80 a 75 ppm; Control PM: Tween 80 a 50 ppm.



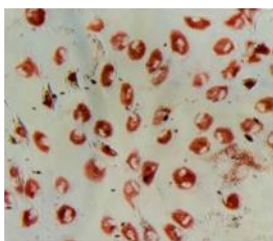
Control



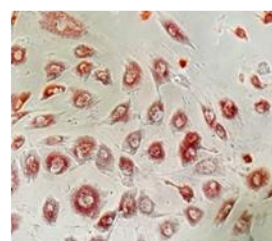
Control G



Control PM



NEs de palmarosa + AL



NEs de menta



NEs de geranio

\*Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )



#### 4.D. Discusión

En estos últimos 20 años se ha promulgado el uso de los AE en el control de insectos plaga como un método alternativo de manejo. Uno de los aspectos más prometedores del uso de estos productos es su baja toxicidad en los mamíferos y su inocuidad para el ambiente en comparación con los insecticidas sintéticos (Osanloo et al., 2017). El perfil de seguridad de los AE está garantizado por el hecho de que la mayoría han sido reconocidos como sustancias seguras por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos (Pavoni et al., 2019). Como ya se ha comentado en los capítulos anteriores los supuestos que sustentan estas ideas son la especificidad y biodegradabilidad de los AE; el primero permitiría que su aplicación en el medio no promueva efectos adversos sobre organismos beneficios y no blanco (Gaire et al., 2019; Hasegawa et al., 2018; Shahzad et al., 2019; Sun et al., 2020). El segundo supuesto implicaría que sus residuos generen impactos mínimos en el suelo y ecosistemas acuáticos (Balta et al., 2017).

Tomando entonces como punto de partida la seguridad de los AE surge consecuentemente el interrogante sobre el impacto que podrían generar sus nanoformulaciones sobre el entorno en el cual podrían ser aplicados. Su elucidación será abordada en este apartado. Como es de suponer el desarrollo de la nanotecnología ha introducido importantes cantidades de nanomateriales en el ambiente, incluidos los que se encuentran en el aire y el agua. Con el fin de proteger la salud humana y la vida silvestre de los posibles efectos adversos de estos materiales, un número creciente de estudios se han centrado en la evaluación de la toxicidad de los nanomateriales más comúnmente utilizados en el sector industrial (Kumar et al., 2012; Peralta-Videa et al., 2011; Yang y Watts, 2005). En este marco, es de destacar que tanto las NPAE como las NEs elaboradas en esta tesis están desarrolladas con productos biodegradables (PEG-6000 y Tween 80) y debido a esta propiedad es posible suponer *a priori* que no presentarían efectos ecotoxicológicos adversos en el ambiente (Biswal et al., 2008; Oliveira et al., 2019) A su vez, las nanofomulaciones se llevaron a cabo en ausencia de solventes, que

muchas veces son usados para mejorar la solubilidad de los AE, pero que pueden incrementar el impacto ambiental de una nanoformulación (de Oliveira et al., 2014).

Existen muchos organismos, de diferentes ambientes, que pueden utilizarse en las pruebas de ecotoxicidad. Es interesante también, seleccionar especies de diferentes niveles (desde productores primarios hasta depredadores) ya que algunos contaminantes ambientales pueden acumularse dentro de la red trófica (biomagnificación). A su vez, otro criterio de selección es en función de los hábitats específicos (superficial, subterráneo profundo, ambientes aireados o anóxicos, etc.) o funciones ecológicas (desnitrificación, bioperturbación, etc.) que desempeña cada especie. Otro factor a tener en cuenta para la elección de organismos acuáticos o terrestres es por su importancia para llevar adelante un proceso ecológico; por ejemplo, si el individuo resulta clave en alguno de los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Rana y Kalaichelvan, 2013).

Como se mencionó anteriormente, *T. molitor* suele ser utilizado como un organismo modelo para evaluar los efectos insecticidas de ciertos productos en ambientes terrestres. Según los resultados obtenidos, las nanoformulaciones de geranio, menta y palmarosa (NEs =palmarosa + AL) no mostraron efectos tóxicos en las larvas de esta especie. Trabajos previos demostraron que el AE de palmarosa no posee efectos tóxicos por contacto en adultos de *T. molitor* (George et al., 2009). Por otra parte, al estudiar los efectos de varios AE en las larvas de *T. molitor*, se comprobó que los AE de geranio y menta no presentan efectos repelentes (Martynov et al., 2019). Más aún, se informó que, en ensayos utilizando un túnel de viento, los adultos de *T. molitor* son atraídos por el AE de menta (Wang et al., 2016). Cabe destacar que los resultados recabados en esta tesis son alentadores para el uso de este tipo de nanoformulaciones dado que en la bibliografía se registran efectos tóxicos de nanomateriales en otros modelos de organismos no blanco de ambientes terrestres. Estos trabajos dan cuenta de que la actividad de los nanomateriales no siempre es segura para los ambientes terrestres y

por lo tanto es importante resaltar que tanto las NPAE como las NEs elaboradas en esta tesis, no afectaron al organismo modelo utilizado.

Pese a que el principal objetivo de los bioensayos en larvas *Cx. p. pipiens* fue obtener valores de referencia de toxicidad para los estudios de ecotoxicología acuática, se considera importante hacer mención a los resultados obtenidos para este insecto plaga de importancia sanitaria. Tanto las NPAE (excepto la formulada con AE de palmarosa) como las NEs potenciaron el efecto larvicida de los principios activos. Varios son los trabajos que demuestran efectos similares en larvas de mosquitos utilizando NP, NEs y diversos NM desarrollados con productos naturales de origen vegetal (Benelli, 2016; Elemike et al., 2017; Montefuscoli et al., 2014; Lucia et al., 2020; Pavoni et al., 2019).

En lo que respecta a los ensayos ecotoxicológicos con *A. salina*, estos demostraron que al nanoformular los AE utilizando diferentes matrices, se observan distintas respuestas. Por un lado, se obtuvo que las NPAE del AE de geranio resultaron ser inocuas, mientras que las NEs de este AE tuvieron una alta toxicidad en *A. salina*, incluso a bajas dosis. El caso contrario fue el de las NPAE de menta y palmarosa que resultaron ser muy tóxicas a bajas dosis. Sin embargo, las NEs de menta y palmarosa + AL mostraron valores de  $CL_{50}$  muchos más altos que los encontrados en el ensayo con *Cx. p. pipiens*, lo que demuestra la especificidad de estos productos. Estos resultados indican que a la hora de pensar una nanoformulación con actividad insecticida, no solo es necesario tener en cuenta el componente activo, sino también la matriz utilizada para la elaboración del nanoinsecticida. Atendiendo a esto, se puede observar que la aplicación del AE de geranio en ambientes acuáticos sería recomendable mediante las NPAE, mientras que el resto de los AE podría ser aplicado como NEs. Otros autores también han confirmado la selectividad de los AE en organismos no blanco acuáticos, como los peces y algunos invertebrados (Castilhos et al., 2018; Govindarajan, 2017; Pavela, 2014; 2018; Pavela et al. 2019; Pavela y Ribeiro et al., 2018). Sin embargo son escasos los trabajos que estudiaron los efectos de toxicidad de los nanomateriales en *A. salina*.

Específicamente, estos trabajos se centraron en nanopartículas metálicas y en aquellas destinadas a la administración de fármacos (Ashtari et al., 2012; Ates et al., 2013; Cornejo-Garrido et al., 2011; Pretti et al., 2014). En cuanto a la elaboración de NEs basada en AE, Swathy et al. (2018) nanoformularon el aceite de pimienta negra y evaluaron sus efectos tóxicos en *A. salina*, obteniendo una  $CL_{50}$  de 2,398 ppm. Cabe resaltar que este valor es significativamente menor a los hallados con las NEs de menta y palmarosa + AL, demostrando la baja toxicidad de estas formulaciones convirtiéndolas en productos con bajo impacto en los ambientes acuáticos.

Los riesgos asociados al uso de estos nuevos nanobioinsecticidas se relacionan también con su potencial toxicidad al interactuar con las células vivas. Es por esto que se evaluó la viabilidad de células de fenotipo osteoblástico tratadas con las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL. Como se pudo observar, luego de 24 h las NEs de menta y palmarosa + AL redujeron la viabilidad celular levemente, siendo este efecto aún más pronunciado con las NEs de geranio. Es importante enfatizar el hecho de que existen pocos estudios sobre los efectos citotóxicos de las NEs cargadas con AE a las 24 h de exposición. Entre estos, es posible citar el trabajo de Nuchuchua et al. (2009) quienes elaboraron NEs basadas en citronela, albahaca y aceite de vetiver y demostraron efecto citotóxico dosis dependiente frente a fibroblastos a las 24 h de exposición. Además, se reportó que las NEs de aceite de neem fueron tóxicas para linfocitos con estos tiempos de tratamiento (Jerobin et al., 2012).

Luego de 72 h, las células expuestas a Tween 80 y a las NEs de menta y palmarosa + AL, exhibieron un aumento significativo en la viabilidad celular en comparación con las células del control. Por otra parte, las NEs de geranio redujeron significativamente la viabilidad celular. El aumento promovido por el Tween 80 y las NEs de menta y palmarosa + AL en esta variable podría explicarse teniendo en cuenta el trabajo de Taoka et al. (2011). En este estudio se postula que el Tween 80 aumenta la permeabilidad de la membrana celular, mejorando el aporte nutricional del medio a la célula. Es de suponer que este efecto mediado por el

surfactante requiere de un cierto tiempo mínimo de exposición (en nuestro caso 72 h) para ser observado. Dado que el aumento en la viabilidad celular promovido por el Tween 80 y las NEs de menta y palmarosa + AL no difiere en su magnitud, es de suponer que los efectos tóxicos de principios activos serían compensados por la actividad promotora de la viabilidad celular que posee el surfactante. En contraposición, en el caso de las NEs de geranio, es posible que el efecto del surfactante no haya podido compensar el efecto nocivo del aceite.

Finalmente a las 168 h, solo las NEs de geranio redujeron significativamente la viabilidad celular. Cabe destacar que con estos tiempos de exposición no se hallaron diferencias significativas entre los demás tratamientos y controles. Es probable que el aumento en la viabilidad celular promovido por el Tween 80 no pueda ser apreciado a este tiempo de exposición, ya que la tasa de crecimiento que exhiben las células en esta etapa del cultivo podría ser superior al efecto del surfactante. En este contexto se encontró que las NEs de albahaca no reducen la viabilidad celular a dosis de 100 a 6000 ppm, con tiempo de exposiciones similares a los evaluados en este estudio (Da Silva et al., 2018). Nanosistemas basados en Tween 80 / etanol / agua y AE de *Cymbopogon citratus* Stapf (Poales, Poaceae) produjeron baja toxicidad en las células humanas (Li et al., 2019).

En lo que respecta específicamente a la bioactividad de las NEs de geranio (observada tanto a las 24, 72 como a las 168 h), existen antecedentes que demuestran el efecto nocivo de este aceite sobre líneas celulares de leucemia (Fayed, 2009). Además se ha postulado que dicho efecto sería promovido por sus componentes principales; en este sentido se demostró que el citronelol posee efectos antitumorales que inhiben el desarrollo celular (Kobayashi, et al. 2016).

Cabe mencionar que el estudio sobre los efectos de las nanoformulaciones sobre organismos no blanco y modelos celulares es de fundamental importancia ya que, por un lado

aporta nuevos conocimientos para desarrollar programas de MIP, y por otro genera la información necesaria para la aprobación y registro de un nuevo producto insecticida.

#### 4.E. Conclusiones

- ✓ Las NPAE de geranio, menta y palmarosa no mostraron efectos tóxicos en larvas de *T. molitor*, incluso a las máximas concentraciones.
- ✓ La aplicación tópica de las NEs de geranio, menta y palmarosa + AL no potenciaron el efecto de la  $\beta$ -cipermetrina en larvas *T. molitor*.
- ✓ Las NPAE de menta y palmarosa resultaron mas tóxicas para larvas nauplis de *A. salina* que en larvas de *Cx. p. pipiens*. Por el contrario, las NPAE de geranio no afectaron al organismo no blanco, incluso a la máxima concentración.
- ✓ Las NEs de menta y palmarosa + AL fueron menos tóxicas en larvas nauplis de *A. salina* que en larvas de *Cx. p. pipiens*. Sin embargo, en el caso de las NEs de geranio estas fueron tóxicas, incluso a bajas concentraciones (< 25 ppm).
- ✓ En el ensayo de viabilidad celular las NEs de menta y palmarosa + AL no afectaron la viabilidad (72 y 168 h), mientras que las NEs de geranio redujeron significativamente esta variable a todos los tiempos de exposición.

Por lo expuesto anteriormente, y analizando en forma conjunta los datos de bioactividad sobre *P. interpunctella* y *T. molitor*, se puede concluir que las NPAE y las NEs presentan una toxicidad selectiva, no afectando al organismo no blanco. Además, al comparar la toxicidad sobre organismos plaga acuáticos (*Cx. p. pipiens*) y no blanco (*A. salina*), se observó que las NEs de menta y palmarosa + AL también presentaron selectividad. Por último, estas nanformulaciones no afectaron la viabilidad celular en un modelo de mamífero.

## 5. Consideraciones Finales

---

Como corolario de esta tesis, se plantean a continuación algunas recomendaciones acerca del uso y aplicación de las nanoformulaciones desarrolladas en este trabajo como nanobioinsecticidas.

El primer punto a tener en cuenta son los procesos para la obtención de las nanoformulaciones. En el caso de las NPAE, el método de fusión-dispersión resultó ser un método práctico y efectivo para incrementar la actividad insecticida de los AE seleccionados para el manejo de *P. interpunctella*. Si bien en este trabajo se usó una relación AE:PEG-6000 ya estudiada y probada, sería interesante desarrollar nuevos estudios que permitan optimizar aún más esta relación. Tal investigación debe buscar reducir los niveles de PEG-6000 usados, tratando de incrementar o mantener la eficiencia de cargado y la actividad insecticida de las NPAE desarrolladas. En lo que respecta a las NEs, la aplicación de ultrasonido mejoró considerablemente la estabilidad de estas formulaciones y permitió reducir las cantidades de surfactante (Tween 80) usadas para su elaboración. Por otra parte, y si bien se encontraron en las NEs resultados de estabilidad un tanto variables o se requirió el agregado de co-activos (como es el caso de las NEs de palmarosa + AL), se logró optimizar los parámetros de ultrasonido de modo tal que estos sean aplicables para todas las nanoformulaciones. Esta característica es algo muy útil, pensando en las facilidades que puede ofrecer esta técnica para la escalabilidad de un producto. Los futuros trabajos en el área de las NEs deberán estar destinados a desarrollar un método fisicoquímico que permita determinar la eficiencia de cargado de las mismas, lo que a su vez permitiría re-definir mejoras en las condiciones de elaboración y optimización de otros parámetros.

En referencia a la actividad insecticida de las NPAE y tomando en cuenta los datos obtenidos en los ensayos de ecotoxicidad, son varios los puntos a analizar. En primer lugar se demostró que la nanoformulación de los AE por medio de NP poliméricas, permite potenciar

su actividad insecticida en adultos de *P. interpunctella*. Además, la disminución de la temperatura del ambiente en que estas son aplicadas incrementa aún más el efecto tóxico por contacto. De las NPAE formuladas, las NP del AE de palmarosa fueron las más tóxicas por contacto, específicamente cuando estas se aplicaron a una temperatura ambiental de 17 °C. Sin embargo, la aplicación fumigante de las NPAE no resulta ser tan efectiva, incluso variando la temperatura. Adicionalmente, dados los resultados ecotoxicológicos, se demostró que la aplicación de las NPAE en modelos terrestres (larvas de *T. molitor*) resulta ser segura. No obstante el uso de estas NPAE (menta y palmarosa) no es recomendable para los ambientes acuáticos, ya que afectaron a organismos no blanco como *A. salina*. Por lo tanto para el uso efectivo de las NPAE de palmarosa en una estrategia MIP para el control de *P. interpunctella*, se recomienda su aplicación por contacto a 17 °C. Probablemente la mejor estrategia sería incorporar algún tipo de sustancia atrayente que conduzca a los adultos hacia una trampa en donde estuvieran aplicadas estas NP. Una vez usadas las mismas, deberían ser descartadas de manera segura, evitando que entren en contacto con cursos de agua dado que podrían afectar los componentes bióticos de estos ambientes. Cabe aclarar que para el caso del AE de geranio, las NPAE no fueron tóxicas en los organismos no blanco acuáticos, por lo que el manejo de los residuos de estos nanobioinsecticidas podría ser más seguro y simple.

En lo que respecta a la actividad insecticida de las NEs, se demostró que estas son muy eficientes al ser combinadas con un insecticida de síntesis como la  $\beta$ -cipermetrina, incrementando varias veces su efecto en larvas de *P. interpunctella*. Teniendo en cuenta los ensayos ecotoxicológicos en organismos terrestres, se demostró que estas NEs presentan selectividad, ya que su aplicación consecutiva con el insecticida piretroide no incrementó la toxicidad en larvas de *T. molitor*. Los resultados en *P. interpunctella* arrojaron que las NEs de geranio fueron las más efectivas. Sin embargo, los estudios ecotoxicológicos demostraron que estas NEs son muy tóxicas para los organismos no blanco acuáticos como *A. salina* y a su vez reducen notablemente la viabilidad celular. Estos efectos no fueron percibidos en las NEs de



menta y palmarosa + AL. Ahora bien, aunque las NEs de menta fueron mucho más efectivas que las de palmarosa + AL para el manejo de *P. interpunctella*, estas últimas fueron mucho más estables (1 mes vs 4 meses). Por lo cual al momento de seleccionar la NEs con mayor potencial para su aplicación práctica, sería interesante analizar los costos-beneficios y el objetivo perseguido. En el campo de las NEs quedan muchos interrogantes por resolver y bastos caminos a ser transitados. Es necesario profundizar en estudios tendientes a aumentar la estabilidad de las NEs, para convertirlas en un producto con mayores posibilidades de escalabilidad y aplicación comercial. Finalmente, otro trabajo a futuro debe estar orientado a la obtención de una NEs mixta que conjugue en una misma formulación un insecticida de síntesis con un AE. De esta manera se podría potenciar el efecto del insecticida sintético disminuyendo la cantidad de principio activo necesario, mitigando el impacto de estos pesticidas en el ambiente. El desarrollo de una NEs de esta índole deberá estar acompañado por los estudios ecotoxicológicos pertinentes.

Para concluir, si bien este trabajo ha contribuido al desarrollo de nuevos nanobioinsecticidas, sentando algunas bases de su formulación y aplicación, es importante destacar que como todo trabajo científico ha generado nuevas preguntas por responder. Por ejemplo: “¿Es posible mejorar la eficiencia de cargado de las NPAE, reduciendo la cantidad de PEG-6000 utilizado? ¿Se puede aumentar la toxicidad de los AE con NPAE que tengan menor cantidad de PEG-6000? ¿Se puede obtener una NEs mixta que conjugue un insecticida de síntesis con un AE? ¿Qué surfactantes y parámetros de ultrasonido serán necesarios para elaborar tal NEs? ¿Qué impacto en el ambiente podría tener esta nueva formulación?. Esto abre puertas para transitar nuevos caminos que permitan obtener formulaciones comerciales con actividad insecticida y que sean a su vez más amigables con el ecosistema.

## 6. Bibliografía

---

- Abadía, M.B., Urcola, H.A., Ferrari, M.C., Bartosik, R.E. (2019). Is the argentine postharvest system ready to handle more and better grains?. *Journal of Stored Products Research*, 83, 218-226.
- Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W.W., Zhang, X. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics sonochemistry*, 21, 1265-1274.
- Abbes, K., Biondi, A., Kurtulus, A., Ricupero, M., Russo, A., Siscaro, G., Zappalà, L. (2015). Combined non-target effects of insecticide and high temperature on the parasitoid *Bracon nigricans*. *PLoS One*, 10, e0138411.
- Abd-Elsalam, K.A., Khokhlov, A.R. (2015). Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. *Applied Nanoscience*, 5, 255-265.
- Abu-Darwish, M.S., Al-Fraihat, A.H., Al-Dalain, S.Y., Afifi, F.M.U., Al-Tabbal, J.A. (2011). Determination of Essential Oils and Heavy Metals Accumulation in *Salvia officinalis* Cultivated in three Intra-row Spacing in Ash-Shoubak, Jordan. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13, 981-985.
- Adnan, M. (2019). Bioactive potential of essential oil extracted from the leaves of *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 213-216.
- Afshar, F.H., Maggi, F., Iannarelli, R., Cianfaglione, K., Isman, M.B. (2017). Comparative toxicity of *Helosciadium nodiflorum* essential oils and combinations of their main constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera). *Industrial Crops and Products*, 98, 46-52.
- Agrawal, N., Maddikeri, G.L., Pandit, A.B. (2017) Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques, *Ultrasound Sonochemistry*, 36 367–374.
- Ahmadi, Z., Saber, M., Akbari, A., Mahdavinia, G.R. (2018b). Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 111-119.
- Ahmadi, Z., Saber, M., Bagheri, M., Mahdavinia, G.R. (2018a). *Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*. *Journal of Pest Science*, 91, 837-848.
- Akinkulore, R.O., Boyer, S., Chen, H., Zhang, H. (2009). Parasitism and host-location preference in *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae): role of refuge, choice, and host instar. *Journal of Economic Entomology*, 102, 610-615.
- Ali, A.M., Mohamed, D.S., Shaurub, E.S.H., Elsayed, A.M. (2017). Antifeedant activity and some biochemical effects of garlic and lemon essential oils on *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3, 1476-1482.

- Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 601-611.
- Al-Shuneigat, J.M., Al-Sarayreh, S.A., Al-Qudah, M.A., Al-Saraireh, Y.M. (2020). Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil of *Achillea biebersteinii* and its mode of action. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8, 155-166.
- Alzogaray, R.A., Picollo, M.I., Zerba, E.N. (1998). Independent and joint action of cis-and trans-permethrin in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 37, 225-230.
- Ammar, H.O., Salama, H. A., Ghorab, M., Mahmoud, A.A. (2009). Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. *Aaps Pharmscitech*, 10, 808-819.
- Ammendola, M., Rodrigo Gomez, R., Garcia Valls, R. (2019). Perfume encapsulation via vapor induced phase separation. *Processes*, 7, 865- 875.
- Anderson, C. B., Roulier, C., Pizarro, J. C. (2017). Perspectivas de actores clave respecto del acuerdo binacional entre Argentina y Chile sobre la erradicación del castor norteamericano y la restauración de los ecosistemas afectados. *Bosque (Valdivia)*, 38, 555-562.
- Anjali, C.H., Sharma, Y., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012). Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion—a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest management science*, 68, 158-163.
- Ansari, M.S., Moraiet, M.A., Ahmad, S. (2014). Insecticides: impact on the environment and human health. In *Environmental deterioration and human health*. Akhtar, R., Grohmann, E., Malik, A. (Eds). Springer, Dordrecht, Holanda. 99-123 pp.
- Anton, N., Vandamme, T.F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of pharmaceutics*, 377, 142-147
- Anton, N., Vandamme, T.F. (2010). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical research*, 28, 978-985.
- Armenteras, D., González, T. M., Vergara, L.K., Luque, F.J., Rodríguez, N., Bonilla, M.A. (2016). Revisión del concepto de ecosistema como “unidad de la naturaleza” 80 años después de su formulación. *Revista Ecosistemas*, 25, 83-89.
- Arteaga, A.F (2006). Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W. Editorial de la Universidad de Granada.
- Arthur, F.H., Liu, S., Zhou, B., Phillips, T.W. (2009). Residual Efficacy of Pyriproxyfen and Hydroprene Applied to Wood, Metal and Concrete for Controlling Stored-Product Insects. *Pest Management Science*, 65, 791–797.

- Arthur, F.H., Yang, Y., Wilson, L.T., Siebenmorgen, T. J. (2008). Feasibility of automatic aeration for insect pest management for rice stored in east Texas. *Applied Engineering in Agriculture*, 24, 345-350.
- Artioli, G., Angelini, I., Polla, A. (2008). Crystals and phase transitions in protohistoric glass materials. *Phase Transitions*, 81, 233-252.
- Ashokkumar, M. (2011). The characterization of acoustic cavitation bubbles—an overview, *Ultrasound Sonochemistry* 18, 864–872.
- Ashtari, K., Khajeh, K., Fasihi, J., Ashtari, P., Ramazani, A., Vali, H. (2012). Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study. *International journal of biological macromolecules*, 50, 1063-1069.
- Assadpour, E., Jafari, S.M. (2019). Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications. In *Nanomaterials for food applications*. Amparo López Rubio, A., Fabra Rovira, M.J., Martínez Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. (Eds). Elsevier. Amsterdam, Netherlands. pp. 35-61.
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O. (2013). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 3339-3348.
- Athanassiou, C.G., Rani, P.U., Kavallieratos, N.G., 2014. The use of plant extracts for stored product protection. In: Singh, D. (Ed.), *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, India, pp. 131-147.
- Ayvaz, A., Sagdic, O., Karaborklu, S., Ozturk, I. (2010). Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science* 10, 21-13.
- Azagoh, C., Ducept, F., Garcia, R., Rakotozafy, L., Cuvelier, M.E., Keller, S., Mezdour, S. (2016). Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*, 88, 24-31.
- Badreddine, B. S., Olfa, E., Samir, D., Hnia, C., Lahbib, B.J.M. (2015). Chemical composition of Rosmarinus and Lavandula essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8, 98-103.
- Balasubramani, V., Mohan, S., Ragumoorthi, K.N. (2003) *Storage Entomology an Introduction*; Tamil Nadu Agricultural University: Coimbatore, Tamil Nadu, p 100.
- Bali, A.S., Batish, D.R., Singh, H.P. (2016). Allelopathic Effect of Aromatic Plants: Role of Volatile Essential Oils. *Journal of Global Biosciences*, 5, 4386-4395.
- Balta, I., Brinzan, L., Stratakos, A.C., Linton, M., Kelly, C., Pinkerton, L., Corcionivoschi, N. (2017). Geraniol and linalool loaded nanoemulsions and their antimicrobial activity. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74, 157-161.

- Banks, J.H., Fields, P.G. (1995). Physical Methods for Insect Control in Stored-Grain Ecosystems. In *Stored-Grain Ecosystems*; Jayas, D. S., White, N. D. G., Muir, W. E., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, 353–409.
- Barradas, T.N., Senna, J.P., Cardoso, S.A., Nicoli, S., Padula, C., Santi, P., Mansur, C.R.E. (2017). Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 116, 38-50.
- Bartholomaeus, A.R., Haritos, V.S. (2005). Review of the Toxicology of Carbonyl Sulfide, a New
- Barzegar, H., Mehrnia, M. A., Nasehi, B., Alipour, M. (2018). Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: effect of preparing conditions on droplet size. *Flavour Fragrance Journal*, 33, 351–356.
- Basak, S., Guha, P. (2017). Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 616–623.
- Beckett, S.J., Fields, P.G., Subramanyam, B.H. (2007). Disinfestation of Stored Products and Associated Structures Using Heat. In *Heat Treatment for Postharvest Pest Control: Theory and Practice*; CAB Int.: Wallingford, UK, pp 182–237.
- Behi, F., Bachrouch, O., Fekih, I. B., Boukhris-Bouhachem, S. (2017). Insecticidal and synergistic activities of two essential oils from *Pistacia lentiscus* and *Mentha pulegium* against the green peach aphid *Myzus persicae*. *Tunis J Plant Prot*, 12, 53-65.
- Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., Antosz, M.E. (1986). Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcified tissue international*, 38, 143-154.
- Benelli, G. (2016). Green synthesized nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases and cancer—a brief review. *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 58-68.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Maggi, F. (2017). Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitology international*, 66, 166-171.
- Betancur Corredor, B., Pino Rodríguez, N.J., Peñuela Mesa, G.A., Cardona Gallo, S. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. 16, 119-135.
- Bett, P.K., Deng, A.L., Ogendo, J.O., Kariuki, S.T., Kamatenesi-Mugisha, M., Mihale, J.M., Torto, B. (2017). Residual contact toxicity and repellence of *Cupressus lusitanica* Miller and *Eucalyptus saligna* Smith essential oils against major stored product insect pests. *Industrial Crops and Products*, 110, 65-74.

- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2, 49-55.
- Bilal, H., Akram, W., Hassan, S.A., Zia, A., Bhatti, A.R., Mastoi, M.I., Aslam, S. (2015). Insecticidal and repellent potential of citrus essential oils against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 47, 997-1002
- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. ID 651593.
- Biswal, S., Sahoo, J., Murthy, P.N. (2008). Enhancement of dissolution rate of gliclazide using solid dispersions with polyethylene glycol 6000. *AAPS PharmSciTech*. 9, 563–570.
- Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M.F.L., Cabral, C., Pires, I.M. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 3149362
- Bohinc, T., Vayias, B., Bartol, T., Trdan, S. (2013). Assessment of insecticidal efficacy of diatomaceous earth and powders of common lavender and field horsetail against bean weevil adults. *Neotropical entomology*, 42, 642-648.
- Bolzonella, C., Lucchetta, M., Teo, G., Boatto, V., Zanella, A. (2019). Is there a way to rate insecticides that is less detrimental to human and environmental health?. *Global Ecology and Conservation*, 20, e00699.
- Borges, R.S., Ortiz, B.L.S., Pereira, A.C.M., Keita, H., Carvalho, J.C.T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 29-45.
- Borrero-Landazabal, M.A., Duque, J. E., Mendez-Sanchez, S.C. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 229, 108664.
- Boukhatem, M.N., Kameli, A., Ferhat, M.A., Saidi, F., Mekarnia, M. (2013). Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 8, 1-7.
- Boulamtat, R., Lhaloui, S., Sabraoui, A., El-Fakhouri, K., Oubayoucef, A., Mesfioui, A., El-Bouhssini, M. (2020). Antifeedant and larvicidal activities of *Mentha pulegium* on chickpea pod borer *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 40, 151-156.
- British Standards Institution, London, United Kingdom. (2011). PAS 71:2011, Nanoparticles. Vocabulary. <http://shop.bsigroup.com/ProductDetail/?pid=000000000030214797> (accessed July 17, 2017)

- Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline?. *Scientific reports*, 3, 1135-1139.
- Buteler, M., López García, G.P., Pochettino, A.A., Stefanazzi, N., Ferrero, A.A., Stadler, T. (2014). Insecticidal activity of volcanic ash against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Ecología austral*, 24, 17-22.
- Cabral, H., Miyata, K., Osada, K., Kataoka, K. (2018). Block copolymer micelles in nanomedicine applications. *Chemical reviews*, 118, 6844-6892.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Calvente, A. (2007). El concepto moderno de sustentabilidad. *Universidad Abierta Interamericana*, 3, 1-7.
- Campolo, O., Cherif, A., Ricupero, M., Siscaro, G., Grissa-Lebdi, K., Russo, A., Biondi, A. (2017). Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. *Scientific reports*, 7, 1-10.
- Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., Zappalà, L. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. *Journal of Food Quality*, Article ID 6906105, 18 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/6906105>.
- Campos, E.V., de Oliveira, J.L., Pascoli, M., de Lima, R., Fraceto, L.F. (2016). Neem oil and crop protection: from now to the future. *Frontiers in plant science*, 7, 1494-1501.
- Campos, E.V., Proença, P.L., Oliveira, J.L., Bakshi, M., Abhilash, P.C., Fraceto, L. F. (2019). Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. *Ecological Indicators*, 105, 483-495.
- Campos, M., Phillips T.W. (2010). Contact toxicity of insecticides for attract-and-kill applications against adult *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Management Science* 66, 752-761.
- Canselier, J.P., Delmas, H., Wilhelm, A.M., Abismail, B. (2002). Ultrasound emulsification—an overview. *Journal of dispersion science and technology*, 23, 333-349.
- Capó, M. (2007). *Principios de ecotoxicología*. Editorial Tebar. 320 pp.
- Castilhos, R.V., Grützmacher, A.D., Coats, J.R. (2018). Acute toxicity and sublethal effects of terpenoids and essential oils on the predator *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical entomology*, 47, 311-317.
- Cetin, H., Tufan-Cetin, O., Turk, A.O., Tay, T., Candan, M., Yanikoglu, A., Sumbul, H. (2012). Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Natural product research*, 26, 350-355.

- Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D. J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food chemistry*, 172, 298-304.
- Chapman, A.D. (2009). Number of living species in Australia and the World 2<sup>nd</sup>. ed. Canberra: Australian Biological Resources Study (ABRS). 84 pp.
- Chaudhary, K., Masram, D.T. (2020). Biological Activities of Nanoparticles and Mechanism of Action. In: Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles. Siddhardha, B., Dyavaiah, M., Kasinathan, K. (Eds.) Springer, Singapore, Singapore. 19-35 pp.
- Chen, H., Akinkulore, R.O., Zhang, H. (2011). Fumigant activity of plant essential oil from *Armoracia rusticana* (L.) on *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *African Journal of Biotechnology* 10, 1200-1205.
- Chevalier, Y., Bolzinger, M.A. (2019). Micelles and Nanoemulsions. In: Nanocosmetics. Cornier, J. Keck, C.M., Van de Voorde, Marcel (Eds.). Springer, Cham, Switzerland. pp. 47-72
- Cornejo Arostegui, A.L. (2017). Desarrollo de micro y nanoemulsiones de liberación sostenida. Tesis de Grado. Universidad Complutense, Madrid, España.
- Cornejo-Garrido, H., Kibanova, D., Nieto-Camacho, A., Guzmán, J., Ramírez-Apan, T., Fernández-Lomelín, P., Garduño M.L, Cervini-Silva, J. (2011). Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. *Chemosphere*, 84, 1329-1335.
- Criel G.R.J., Macrae T.H. (2002). Artemia Morphology and Structure. In: Abatzopoulos T.J., Beardmore J.A., Clegg J.S., Sorgeloos P. (eds) Artemia: Basic and Applied Biology. Biology of Aquatic Organisms, Springer, Dordrecht, Países Bajos 1-37 pp.
- Croft, B.A., Jepson, P.C., Heneghan, P.A. (1998) Issues associated with pesticide toxicology and arthropod natural enemies in the pre- and postregistration stages of chemical development. In: Ecotoxicology: pesticides and beneficial organisms. Haskell, P.T., McEwen, P. (Eds.). Springer Science + Business Media, Cardiff, UK. 7-22 pp.
- D'souza, A.A., Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13, 1257–1275.
- da Silva Gündel, S., Velho, M.C., Diefenthaler, M. K., Favarin, F.R., Copetti, P.M., de Oliveira Fogaça, A., Ourique, A.F. (2018). Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 378-383.
- da Silva, J.K.R., Pinto, L.C., Burbano, R.M., Montenegro, R.C., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S. (2016). Composition and cytotoxic and antioxidant activities of the oil of *Piper aequale* Vahl. *Lipids in health and disease*, 15, 1-6.



- Daglish G.J., Nayak M.K., Arthur F.H., Athanassiou C.G. (2018) Insect Pest Management in Stored Grain. In: Athanassiou C., Arthur F. (eds) Recent Advances in Stored Product Protection. Springer, Berlin, Alemania. pp 45-63.
- Dainese, M., Schneider, G., Krauss, J., Steffan-Dewenter, I. (2017). Complementarity among natural enemies enhances pest suppression. *Scientific reports*, 7, 1-8.
- Dal Bello, G., Padín, S. (2006). Olfatómetro simple para evaluar la actividad biológica de aleloquímicos vegetales en *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Agrociencia*, 10,23-26.
- Das, M., Needham, P.H. (1961). Effect of time and temperature on toxicity of insecticides to insects: I. Tests of DDT on larvae of *Aedes aegypti* L. *Annals of Applied Biology*, 49, 32-38.
- Das, M., Roy, S., Guha, C. Saha, A. K., Singh, M. (2020). In vitro evaluation of antioxidant and antibacterial properties of supercritical CO<sub>2</sub> extracted essential oil from clove bud (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00566-9>
- de Andrade Dutra, K., de Oliveira, J. V., Navarro, D. M. D. A. F., & Santos, J. P. O. (2016). Control of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in *Vigna unguiculata* (L.) WALP. with essential oils from four *Citrus spp.* plants. *Journal of Stored Products Research*, 68, 25-32.
- de Oliveira E.F., Paula H.C.B., and de Paula R.C.M. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146–151.
- de Oliveira, J.L, Ramos Campos, E.V., Fraceto, L.F. (2018). Recent developments and challenges for nanoscale formulation of botanical pesticides for use in sustainable agriculture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 66, 8898-8913.
- de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Bakshi, M., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F. (2014). Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. *Biotechnology advances*, 32, 1550-1561.
- de Oliveira, R. J., Brown, P., Correia, G. B., Rogers, S. E., Heenan, R., Grillo, I., Eastoe, J. (2011). Photoreactive surfactants: a facile and clean route to oxide and metal nanoparticles in reverse micelles. *Langmuir*, 27, 9277-9284.
- Dehghan, H., Sadraei, J., Moosa-Kazemi, S.H. (2010). The morphological variations of *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae) in Yazd Province, central Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 4, 42-49
- Devi K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107–115.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W. (2016). Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3, 25-41

Díaz Gámez, G.M. (2014). Uso de la larva de Tenebrio (*Tenebrio molitor*) como aditivo proteico, en la alimentación de codornices (*Coturnix coturnix japonica*) (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Dizaj, S.M. (2013). Preparation and study of vitamin A palmitate microemulsion drug delivery system and investigation of co-surfactant effect. *Journal of nanostructure in chemistry*, 3, 59-65.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1908–1914

Donsì, F., Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology*, 233, 106-120.

Drechsler, M. (1978). Erwin Müller and the early development of field emission microscopy. *Surface Science*, 70,1-18.

Du, Z., Wang, C., Tai, X., Wang, G., Liu, X. (2016). Optimization and characterization of biocompatible oil-in-water nanoemulsion for pesticide delivery. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4, 983-991.

Duarte, G.K.G.F., Menezes, A.C.S., Naves, P.L.F., Bueno, O.C., Santos, R.G., Silva Junior, W.M.D. (2019). Toxicity of *Esenbeckia pumila* Pohl (Rutaceae) on *Artemia salina* and *Atta sexdens rubropilosa*. *Revista Caatinga*, 32, 101-112.

Duarte, J.L., Amado, J.R., Oliveira, A.E., Cruz, R.A., Ferreira, A. M., Souto, R.N., Fernandes, C.P. (2015). Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 189-192.

Elemike, E.E., Onwudiwe, D.C., Ekennia, A.C., Sonde, C.U., Ehiri, R.C. (2017). Green synthesis of Ag/Ag<sub>2</sub>O nanoparticles using aqueous leaf extract of *Eupatorium odoratum* and its antimicrobial and mosquito larvicidal activities. *Molecules*, 22, 674.

Enrico, C. (2018). Nanotheranostics and theranostic nanomedicine for diseases and cancer treatment. In *Design of Nanostructures for Theranostics Applications*. William Andrew Publishing. UK. pp. 41-68.

Fanfair, D., Desai, S., Kelty, C. (2007). The early history of nanotechnology. *Connexions*, 6, 1-15.

Fattahi, A., Karimi-Sabet, J., Keshavarz, A., Golzary, A., Rafiee-Tehrani, M., Dorkoosh, F.A. (2016). Preparation and characterization of simvastatin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS) with trifluoromethane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 469-478.

Fayed, S.A. (2009). Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulata* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential oils. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5, 740-747.

Ferreira, C.D., Nunes, I.L. (2019). Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. *Nanoscale research letters*, 14, 9.

- Fields, P. (1994). Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems. Stored-grain ecosystems, Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds). Marcel Dekker Inc., New York, USA. pp 353-411.
- Flores, F.C., De Lima, J.A., Ribeiro, R.F., Alves, S.H., Rolim, C.M.B., Beck, R.C.R., Da Silva, C.B. (2013). Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, 175, 281-286.
- Foster, W.A., Walker, E.D. (2019). Mosquitoes (Culicidae). In Medical and veterinary entomology Academic press, London, UK. 261-325 pp.
- Fouad, H.A., da Camara, C.A. (2017). Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 73, 30-36.
- Fundación I.N.A.I., (2017). Escenario de Referencia agroindustrial mundial y argentino al 2026/2027. ERAMA 2026/2027. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>.
- Gaire, S., Scharf, M.E., Gondhalekar, A.D. (2019). Toxicity and neurophysiological impacts of plant essential oil components on bed bugs (Cimicidae: Hemiptera). *Scientific reports*, 9, 1-12.
- Gamboa, N. (2014). DDT, una revisión histórica. *Revista de Química*, 28, 10-13.
- Gangwar, K. S., Singh, K. K., Sharma, S. K., Tomar, O. K. (2006). Alternative tillage and crop residue management in wheat after rice in sandy loam soils of Indo-Gangetic plains. *Soil and Tillage Research*, 88, 242-252.
- George, D.R., Sparagano, O.A.E., Port, G., Okello, E., Shiel, R.S., Guy, J.H. (2009). Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*. *Veterinary Parasitology*, 162, 129-134.
- George, D.R., Sparagano, O.A.E., Port, G., Okello, E., Shiel, R.S., Guy, J.H. (2010). Toxicity of plant essential oils to different life stages of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, and non-target invertebrates. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 9-15.
- Gezici, S. (2018). Promising anticancer activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. *Annals of Phytomedicine*, 7, 38-45.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20, 338-344.
- Golob, P. (1997) Current Status and Future Perspectives for Inert Dusts for Control of Stored Product Insects. *Journal of Stored Product Research*, 33, 69–79.
- Gomes, C., Moreira, R.G., Castell-Perez, E. (2011). Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *Journal of Food Science*, 76, 16-24.

- Gómez Vega, A.G. (2014). Formulación y caracterización de nano-emulsiones de aceite de parafina tipo agua-en-aceite (W/O). Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica de Tula-Tepeji. Monterrey, México.
- Gopalakrishnan, R., Veer, V. (2018). Bioecology, Insecticide Susceptibility and Management of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823: A Major Vector of Lymphatic Filariasis in India. In Lymphatic Filariasis; Tyagi, B., (Ed.). Springer, Singapore, Singapore, 199–210 pp.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Benelli, G. (2016).  $\delta$ -Cadinene, calarene and  $\delta$ -4-carene from *Kadsura heteroclita* essential oil as novel larvicides against malaria, dengue and filariasis mosquitoes. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 19, 565-571.
- Grain Fumigant. *Journal of Food Chemical Toxicology*. 43, 1687–1701.
- Gregory, D.A., Johnson, D.L., Thompson, B.H. (1994). The toxicity of bran baits, formulated with carbaryl, chlorpyrifos and dimethoate, on yellow mealworms (*Tenebrio molitor* L.). *Journal of Agriculture Entomology*, 11, 85-94.
- Gross, A.D., Norris, E.J., Kimber, M.J., Bartholomay, L.C., Coats, J.R. (2017) Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Medical Veterinary Entomology*, 31, 55–62.
- Guerra-Rosas, M.I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L.A., Salvia-Trujillo, L., Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12, 2826-2841.
- Hackett, S.C., Bonsall, M.B. (2019). Insect pest control, approximate dynamic programming, and the management of the evolution of resistance. *Ecological Applications*, 29, e01851.
- Haghirsadata, F., Amoabedinyb, G., Naderinezhad, S., Helder, M.N., Kharanaghie, E.A., Zandieh-Doulabid, B. (2017). Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (noisome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *Name International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67, 383-400.
- Hajimohammadi, B., Raeisi, M., Eftekhar, E., Mohebat, R., Saffari, A. (2019). Studying the effect of *Allium sativum* and *Bunium persicum* essential oils on histamine production in Mahyaveh, an Iranian seasoned fish sauce. *Journal of Food Safety*, 39, e12590.
- Hallman, G., Denlinger, D. (1999). Introduction. In: *Temperature Sensitivity In Insects And Application In Integrated Pest Management*, Hallman, G., Denlinger, D. (Eds). CRC Press, Boca Raton, USA. pp 5-10.
- Hallman, G.J., Phillips, T.W. (2008). Ionizing Irradiation of Adults of Angoumois Grain Moth (Lepidoptera: Gelichiidae) and Indianmeal Moth (Lepidoptera: Pyralidae) to Prevent Reproduction, and Implications for a Generic Irradiation Treatment for Insects. *Journal of Economic Entomology*, 101, 1051–1056.

- Halverson, S.L., Nablo, S.V. (2000) Radiation Alternatives to Pesticides. In *Stored Product IPM*; Subramanyam, B., Hagstrum D. W., Eds.; Kluwer Academic Press: Boston, MA, pp 381–400.
- Hammer K.A., Carson C.F. (2011). Antibacterial and antifungal activities of EOs. In: Thormar H (ed). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Wiley, Oxford, UK, pp 255–306
- Hanan, A. (2013). Evaluation of insecticidal activities of *Mentha piperita* and *Lavandula angustifolia* essential oils against house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Journal of Entomology and Nematology*, 5, 50-54.
- Hanif M.A., Nisar S., Khan G.S., Mushtaq Z., Zubair M. (2019) Essential Oils. In: *Essential Oil Research*, Malik S. (eds). Springer, Cham, Alemania. pp. 3-17.
- Hansen, L.S., Wakefield, M. (2007). European network on biological control of pests in stored products- COST Action 842, WG 4. In *Working Group 30*, 21-23.
- Harris, C.R., Kinoshita, G.B. (1977). Influence of posttreatment temperature on the toxicity of pyrethroid insecticides. *Journal of economic entomology*, 70, 215-218.
- Harwood, A.D., You, J., Lydy, M.J. (2009). Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: toxicokinetic confirmation. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28, 1051-1058.
- Hasegawa, T., Fujimori, S., Havlík, P., Valin, H., Bodirsky, B.L., Doelman, J.C., Fellmann, T., Kyle, P., Koopman, J.F.L., Lotze- Campen, H., Mason-D’Croz, D., Ochi, Y., Pérez Domínguez, I., Stehfest, E., Sulser, T.B., Tabeau, A., Takahashi, K., Takakura, J. Y., van Meijl, H., van Zeist, W. J., Wiebe, K., Witzke, P. (2018) Risk of increased food insecurity under stringent global climate change mitigation policy. *Nature Climate Change*, 8, 699–703.
- Hashem, A.S., Awadalla, S.S., Zayed, G. M., Maggi, F., Benelli, G. (2018). *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 18802-18812.
- Hayes, R.A., Rice, S.J., Amos, B.A., Leemon, D.M. (2015). Increased attractiveness of honeybee hive product volatiles to adult small hive beetle, *Aethina tumida*, resulting from small hive beetle larval infestation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155, 240-248.
- Heiligtag F.J., Niederberger, M. (2013). The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*, 16, 262-271.
- Herman, A., Tambor, K., Herman, A. (2016). Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Current microbiology*, 72, 165-172.
- Heydari, M., Amirjani, A., Bagheri, M., Sharifian, I., Sabahi, Q. (2019). Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: preparation, physicochemical properties, and its aphicidal activity against cotton aphid. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 6667–6679.

- Hikal W.M., Baeshen R.S., Said-Al Ahl H.A.H. (2017). Botanical insecticide as simple extractives for pest control. *Cogent Biology*, 3, 1404274.
- Hill, D. S. 1990. *Pest of Stored Products and Their Control*. CRC Press, Boca Raton, USA. 274 pp.
- Hirlekar, R., Yamagar, M., Garse, H., Vij, M., Kadam, V. (2009). Carbon nanotubes and its applications: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2, 17-27.
- Hladik, M.L., Main, A.R., Goulson, D. (2018). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology*, 52, 3329–3335
- Homs, M., Calderó, G., Monge, M., Morales, D., Solans, C. (2018). Influence of polymer concentration on the properties of nano-emulsions and nanoparticles obtained by a low-energy method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536, 204-212.
- Hoppe, V.T. (1981). Food preference, oviposition and development of the Indian meal moth *Plodia interpunctella* Hübner on different products of the chocolate industry. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 91, 170–179.
- Hosseini, S.F., Zandi, M., Rezaei, M., Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95, 50–56.
- Hou, X., Fields, P., Taylor, W. (2004). The Effects of Repellents on Penetration into Packaging by Stored Product Insects. *Journal of Stored Product Research*, 40, 47–54.
- Hu, J., Wang, X., Xiao, Z., Bi, W., (2015). Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 519-526.
- Hua J, Relyea R.A. (2012) East coast vs West coast: effects of an insecticide in communities containing different amphibian assemblages. *Freshwater Science* 31,787–799.
- Hui, X., Yan, G., Tian, F.L., Li, H., Gao, W.Y. (2017). Antimicrobial mechanism of the major active essential oil compounds and their structure–activity relationship. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 442-449.
- Ikbal, C., Pavela, R. (2019). Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. *Journal of Pest Science*, 92,971–986.
- INTA. (2013) *La Poscosecha en Argentina: contexto Actual*. Artículo De Divulgación.
- INTA., 2010. *Insectos perjudiciales de importancia agronómica. I Lepidópteros*. Urretabizkaya, D., Vasicek, J.P., Saini, E.D. Ediciones INTA. 77 pp.
- Ishwarya, R., Vaseeharan, B., Kalyani, S., Banumathi, B., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Benelli, G. (2018). Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Ulva lactuca* seaweed extract and evaluation of their photocatalytic, antibiofilm and insecticidal activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 249–258.

- Isman, M. B. (2019). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19, 235–241.
- Jampílek, J., Kráľová, K., Fedor, P. (2020). Bioactivity of Nanoformulated Synthetic and Natural Insecticides and Their Impact on Environment. In: *Nanopesticides*, Fraceto L.F, de Castro V.L.S. S., Grillo R., Ávila, D., Oliveira, H.C., Lima R. (Eds.). Springer, Cham, Alemania p. 165-225.
- Jędrych, M., Borowska, K., Galus, R., Jodłowska-Jędrych, B. (2014). The evaluation of the biomedical effectiveness of poly (amido) amine dendrimers generation 4.0 as a drug and as drug carriers: a systematic review and meta-analysis. *International journal of pharmaceutics*, 462, 38-43.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9, 1050-1074.
- Jeger, M.J. (2000). Bottlenecks in IPM. *Crop Protection*, 19, 787-792.
- Jeong, Y.I., Cho, C.S., Kim, S.H., Ko, K.S., Kim, S.I., Shim, Y.H., Nah, J.W. (2001). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant. *Journal of applied polymer science*, 80, 2228-2236.
- Jerobin, J., Sureshkumar, R.S., Anjali, C.H., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012). Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate polymers*, 90, 1750-1756.
- Jia, X., Zhang, X., Liu, H., Wang, R., Zhang, T. (2018). Identification of chemosensory genes from the antennal transcriptome of Indian meal moth *Plodia interpunctella*. *PLOS ONE*, 13, 1-25.
- Jiang, Z. (2016). How many species are there on Earth?. *Chinese Science Bulletin*, 61(21), 2337-2343.
- Joffe, T., Gunning, R.V., Allen, G.R., Kristensen, M., Alptekin, S., Field, L.M., Moores, G.D. (2012). Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest management science*, 68, 178-184.
- Johnson, J.A. (2007). Survival of Indian meal Moth and Navel Orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) at Low Temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 100, 1482–1488.
- Johnson-McDaniel, D., Barrett, C.A., Sharafi, A., Salguero, T.T. (2013). Nanoscience of an ancient pigment. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 1677-1679.
- Kale, S.N., Deore, S.L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8, 39-47.
- Kamaraj, C., Rajakumar, G., Rahuman, A.A., Velayutham, K., Bagavan, A., Zahir, A. A., Elango, G. (2012). Feeding deterrent activity of synthesized silver nanoparticles using *Manilkara zapota* leaf extract against the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Parasitology research*, 111, 2439-2448.

- Karakhanov, E.A., Maksimov, A.L., Zakharian, E.M., Kardasheva, Y.S., Savilov, S.V., Truhmanova, N.I., Vinokurov, V.A. (2015). Palladium nanoparticles encapsulated in a dendrimer networks as catalysts for the hydrogenation of unsaturated hydrocarbons. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 397, 1-18.
- Katz, S., Boland, R., Santillan, G. (2008). Purinergic (ATP) signaling stimulates JNK1 but not JNK2 MAPK in osteoblast-like cells: contribution of intracellular Ca<sup>2+</sup> release, stress activated and L voltage- dependent calcium influx, PKC and Src kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 477, 244–252
- Khalil, M.I., Osborne, B.A. (2018). Improving estimates of soil organic carbon (SOC) stocks and their long-term temporal changes in agricultural soils in Ireland. *Geoderma*, 322, 172-183.
- Khanahmadi, M., Pakravan, P., Hemati, A., Azandaryani, M.N., Ghamari, E. (2017). Fumigant toxicity of *Artemisia haussknechtii* essential oil and its nano-encapsulated form. *Pharma*, 2, 1776-1783.
- Khandelwal, N., Barbole, R.S., Banerjee, S.S., Chate, G.P., Biradar, A.V., Khandare, J.J., Giri, A.P. (2016). Budding trends in integrated pest management using advanced micro-and nano-materials: Challenges and perspectives. *Journal of environmental management*, 184, 157-169.
- Kiarie-Makara, M.W., Ngumbi, P.M., Lee, D.K. (2015). Effects of temperature on the growth and development of *Culex pipiens* complex mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10, 1-10.
- Knezevic, P., Aleksic, V., Simin, N., Svircev, E., Petrovic, A., Mimica-Dukic, N. (2016). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of ethnopharmacology*, 178, 125-136.
- Kobayashi, Y., Sato, H., Yorita, M., Nakayama, H., Miyazato, H., Sugimoto, K., Jippo, T. (2016). Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 1172-1178.
- Korunic, Z. (1998) Diatomaceous Earths a Group of Natural Insecticides. *Journal of Stored Product Research*, 34, 87–97.
- Kostić, I., Petrović, O., Milanović, S., Popović, Z., Stanković, S., Todorović, G., Kostić, M. (2013). Biological activity of essential oils of *Athamanta haynaldii* and *Myristica fragrans* to gypsy moth larvae. *Industrial Crops and Products*, 41, 17-20.
- Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C. (2012). Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology letters*, 210, 155-168.
- Kumar, G.R., Babu, D.E. (2015). Effect of light, temperature and salinity on the growth of *Artemia*. *International Journal of Engineering Science Invention*, 4, 7-14.



- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2013). Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf.(Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1, 8-cineole). *Parasitology research*, 112, 69-76.
- Kumar, R. (2017). Classification and identification of important stored grain/seed insect pests of stored grain. In: *Biology, behavior, and management strategies*. Kumar, R. (Ed). CRC Press. Waretown, USA. 20-58 pp.
- Kumar, V., Kumari, A., Guleria, P., Yadav, S. K. (2012). Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Whitacre D.M. (Ed). Springer, New York, USA. 39-121 pp.
- Lannitelli, A., Grande, R., di Stefano, A. (2011). Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5039–5051.
- Lapied, B. (2017). Insecticide mode of action: From insect to mammalian toxicity. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 2910-2911.
- Lavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D.H., Shvedova, A.A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and applied pharmacology*, 329, 96-111.
- Lazzari, S.M., Lazzari, F.A. (2012). Insect pests in stored grain. In: *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management* CRC Press. Boca Raton, USA. 435-468 pp.
- Lee, B.H., Annis, P.C., Tumaalii, F., Choi, W.S., (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research* 40, 553-564.
- Lee, B.K., Kim, J.H., Jung, J.W., Choi, J.W., Han, E.S., Lee, S.H., Ko, K.H., Ryu, J.H. (2005). Myristicin induced neurotoxicity in human neuroblastoma MSK-N-SH cells. *Toxicology letters*. 157, 49–56.
- Leonhardt, U. (2007). Optical metamaterials: Invisibility cup. *Nature photonics*, 1, 207–208.
- Li, Y., Wang, C., Tao, Z., Zhao, Z., You, L., Zheng, R., Guo, X., Zhang, Z. (2019). Enhanced antioxidant and antiproliferative activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils in microemulsion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 15173-15181.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., Huang, Q. (2012). Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7548–7555.
- Liew, J.C.L., Nguyen, Q.D., Ngothai, Y. (2010). Effect of sodium chloride on the formation and stability of n-dodecane nanoemulsions by the PIT method. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 5, 570-576.

- Liu, J., Lincoln, T., An, J., Gao, Z., Dang, Z., Pan, W., Li, Y. (2016) The joint toxicity of different temperature coefficient insecticides on *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*. 109, 1846-1852.
- Llabot, J.M., Palma, S., Allemandi, D. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia*, 53, 40-47.
- Loha, K. M., Shakil, N. A., Kumar, J. Singh, M.K., Srivastava, C. (2012). Bio-efficacy evaluation of nanoformulations of beta-cyfluthrin against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47, 687–691.
- Loomis, T. (1982). *Fundamentos de toxicología*. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 62-64 pp.
- Lourenço, A.M., Haddi, K., Ribeiro, B.M., Corrêia, R.F., Tomé, H.V., Santos-Amaya, O., Aguiar, R.W. (2018). Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. *Scientific reports*, 8, 1-13.
- Lucia, A., Toloza, A.C., Fanucce, M., Fernandez-Pena, L., Ortega, F., Rubio, R. G., Guzman, E. (2020). Nanoemulsions based on thymol-eugenol mixtures: Characterization, stability and larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Bull. Insectology*, 73, 153-160.
- Lukowicz, T., Maldonado, R.C., Molinier, V., Aubry, J.M., Nardello-Rataj, V. (2014). Fragrance solubilization in temperature insensitive aqueous microemulsions based on synergistic mixtures of nonionic and anionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458, 85-95.
- Ma, Y.H., Gao, Z.L., Dang, Z.H., Li, Y.F., Pan, W.L. (2012). Effect of temperature on the toxicity of several insecticides to *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Journal of Pesticide Science*, 37, 135-139.
- Machado, C. D., Raman, V., Rehman, J.U., Maia, B.H., Meneghetti, E.K., Almeida, V.P., Budel, J. M. (2019). *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 1-10.
- Maedeh, M., Hamzeh, I., Hossein, D., Majid, A., Reza, R.K., (2012). Bioactivity of essential oil from *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against three stored-product insect species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15, 122-133.
- Maestro, I., Sole, C., Gonzalez, C., Solans, C., and Gutierrez, J.M. (2008). Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 327, 433–439.
- Makkar, H.P., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 1-33.

- Manh, H.D., Hue, D.T., Hieu, N. T.T., Tuyen, D.T.T., Tuyet, O.T. (2020). The Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* Species in Vietnam. *Insects*, 11,128.
- Manthripragada, A.D., Costello, S., Cockburn, M.G., Bronstein, J.M., Ritz, B. (2010). Paraoxonase 1 (PON1), agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease *Epidemiology* (Cambridge, Mass.), 21, 87-94.
- Margalef, R.L. (1995). La ecología, entre la vida real y la física teórica. *Investigación y ciencia*. 225, 66-73.
- Marín-Benito, J.M., Herrero-Hernández, E., Rodríguez-Cruz, M.S., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M.J. (2017). Study of processes influencing bioavailability of pesticides in wood-soil systems: Effect of different factors. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139, 454-462.
- Martynov, V.O., Hladkyi, O.Y., Kolombar, T.M., Brygadyrenko, V.V. (2019). Impact of essential oil from plants on migratory activity of *Sitophilus granarius* and *Tenebrio molitor*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10, 359-371.
- McClements, D.J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719–1729.
- McClements, D.J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. 3<sup>ra</sup> Edición. CRC Press, Boca Raton, USA. 672 pp.
- McDonough, M. X., Mason, L.J., Woloshuk, C.P., 2011. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. *Journal of Stored Product Research* 47, 306-310.
- McKnight, U.S., Rasmussen, J.J., Kronvang, B., Binning, P.J., Bjerg, P. L. (2015). Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environmental Pollution*, 200, 64-76.
- Medrano Vega, L. C. (2019) Larvas de gusano de harina (*Tenebrio molitor*) como alternativa proteica en la alimentación animal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD Bogotá, Colombia. (Tesina)
- Medrano, J.J.A. (2019). Essential Oils in the Development of New Medicinal Products. in *Essential Oils - Oils of Nature* El-Shemy (Ed.) IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.86572. Available from: <https://www.intechopen.com/books/essential-oils-oils-of-nature/essential-oils-in-the-development-of-new-medicinal-products>.
- Merzendorfer Hans, (2013). Tegument. In: *The Insects: Structure and Function: Fifth Edition* R. F. Chapman Edited by Stephen J. Simpson and Angela E. Douglas. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 463-498.
- Mesquita, L.S.S.D., Luz, T.R.S.A., Mesquita, J.W.C.D., Coutinho, D.F., Amaral, F.M.M.D., Ribeiro, M.N.D.S., Malik, S. (2019). Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35, 105-131.

- Mezza, G.N., Borgarello, A.V., Grosso, N.R., Fernandez, H., Pramparo, M.C., Gayol, M.F. (2018). Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. *Food chemistry*, 242, 9-15
- Ministerio de Agricultura Argentina. (2011). Plan estratégico agroalimentario y agroindustrial, participativo y federal 2010-2020. URL: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_000001libropea\\_argentina\\_lider\\_agroalimentario.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_000001libropea_argentina_lider_agroalimentario.pdf).
- Mishra B., Patel B.B., Tiwari S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 6, 9–24.
- Mishra, P., Dutta, S., Haldar, M., Dey, P., Kumar, D., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2019). Enhanced mosquitocidal efficacy of colloidal dispersion of pyrethroid nanometric emulsion with benignity towards non-target species. *Ecotoxicology and environmental safety*, 176, 258-269.
- Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31, 346–356.
- Mittal, M., Gupta, A., Pandey, O.P. (2018). Role of oxygen vacancies in Ag/Au doped CeO<sub>2</sub> nanoparticles for fast photocatalysis. *Solar Energy*, 165, 206-216.
- Mogosan, C., Vostinaru, O., Oprean, R., Heghes, C., Filip, L., Balica, G., Moldovan, R.I. (2017). A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania. *Molecules*, 22, 263-273.
- Mohandass S., Arthur F.H., Zhu K.Y., Throne J.E., 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. *Journal of Stored Products Research* 43, 302–311.
- Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5, 561-573.
- Montefuscoli, A.R., González, J.O.W., Palma, S.D., Ferrero, A.A., Band, B.F. (2014). Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. *Parasitology research*, 113, 793-800.
- Moosavy, M. H., Hassanzadeh, P., Mohammadzadeh, E., Mahmoudi, R., Khatibi, S.A., Mardani, K. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *Journal of food quality and hazards control*, 4, 42-48.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L.F., Peres, M.S., Menezes, I.F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R.A., Pinho, S.C. (2017). Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 233-240.
- Morris, B. (2020). Introduction. In: *Insects and human life*. Routledge. New York, USA. 1-11 pp.

- Mozaffari, F., Abbasipour, H., Garjan, A. S., Saboori, A., Mahmoudvand, M. (2013). Toxicity and oviposition deterrence and repellency of *Mentha pulegium* (Lamiaceae) essential oils against *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16, 575-581.
- Mullen, M.A., Mowery, S.V. (2006). Insect-Resistant Packaging. In *Insect Management for food Storage and Processing*; Heaps, J. W., Ed.; AACC Int: St. Paul, MN pp. 35–38.
- Muñoz-Bonilla A., Herk A.M.V., Heuts J.P.A. (2010). Preparation of hairy particles and antifouling films using brush-type amphiphilic block copolymer surfactants in emulsion polymerization. *Macromolecules*, 43, 2721–2731.
- Murugan, K., Raman, C., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Subramanium, J., Dinesh, D., Devanesan, S. (2016). Nano-insecticides for the control of human and crop pests. In *Short Views on Insect Genomics and Proteomics*. Springer, Cham. pp. 229-251.
- Musser, F.R., Shelton, A.M. (2005). The influence of post-exposure temperature on the toxicity of insecticides to *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61, 508-510.
- Mustapha, M.K. (2008). Assessment of the water quality of Oyun Reservoir, Offa, Nigeria, using selected physico-chemical parameters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 309-319.
- Naeem, M., Salam, A., Tahir, S.S, Rauf N. (2010). Assessment of the essential element and toxic heavy metals in hatchery reared *Oncorhynchus mykiss*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12, 935-938.
- Nansen, C., and Phillips, T. W. (2003). Ovipositional responses of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to oils. *Annals of the Entomological Society of America*. 96, 524–531.
- Ndakidemi, B., Mtei, K., Ndakidemi, P.A. (2016). Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agricultural Sciences*, 7, 364- 373.
- Nenaah, G.E. (2014). Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*, 53, 252-260.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, 101, 372-378.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L., 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Heal* 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.
- Nilda, P.C., Vázquez, L. (2004). Manejo ecológico de plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural, 43-45 pp.

- Norris, E.J., Gross, A.D., Bartholomay, L.C., Coats, J.R. (2019). Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in *Aedes aegypti*. *Medical and veterinary entomology*, 33, 453-466.
- Nuchuchua, O., Sakulku, U., Uawongyart, N., Puttipipatkachorn, S., Soottitantawat, A., Ruktanonchai, U. (2009). In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. *Aaps Pharmscitech*, 10, 1234-1242.
- Nuruzzaman, M., Liu, Y., Rahman, M.M., Dharmarajan, R., Duan, L., Uddin, A.F.M.J., Naidu, R. (2019). Nanobiopesticides: Composition and preparation methods. *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*, 69–131.
- Oberemok, V.V., Laikova, K.V., Gninenko, Y.I., Zaitsev, A.S., Nyadar, P.M., Adeyemi, T.A. (2015). A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55, 221-226.
- Oliveira, C.R.; Domingues, C.E.C.; de Melo, N.F.S.; Roat, T.C.; Malaspina, O.; Jones-Costa, M.; Silva-Zacarin, E.C.M.; Fraceto, L.F. (2019). Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. *Chemosphere*, 236, 124282.
- Olsson, P.O.C., Anderbrant, O., Löfstedt, C. (2006). Experience influences oviposition behaviour in two pyralid moths, *Ephestia cautella* and *Plodia interpunctella*. *Animal Behaviour*, 72, 545-551.
- Onbasili, D., Duman, F. (2010). Acute toxicity of some insecticides on *Artemia salina* and *Daphnia magna*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 2608-2610.
- ONU (2019a) Creciendo a un ritmo menor, se espera que la población mundial alcanzará 9.700 millones en 2050 y un máximo de casi 11.000 millones alrededor de 2100. Informe de la ONU.
- ONU (2019b). El hambre en el mundo lleva tres años sin disminuir y la obesidad sigue creciendo. Informe de la ONU.
- OMS. (2005). Guidelines for Laboratory and Field testing of Mosquito Larvicides; WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- Ortiz de Elguea-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Berruga, M.I., Herraiz-Peñalver, D., González-Coloma, A., Andrés, M.F., Santana-Méridas, O. (2018). Biocidal potential and chemical composition of industrial essential oils from *Hyssopus officinalis*, *Lavandula x intermedia var. super*, and *Santolina chamaecyparissus*. *Chemistry & Biodiversity*, 15, 1-9.
- Osanloo, M., Amani, A., Sereshti, H., Abai, M.R., Esmaeili, F., Sedaghat, M.M. (2017) Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi*. *Industrial Crops and Products*, 109, 214–219.
- Pant, M., Dubey, S., Patanjali, P.K., Naik, S. N., Sharma, S. (2014). Insecticidal activity of eucalyptus oil nanoemulsion with karanja and jatropha aqueous filtrates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 119–127.

- Park, H.M., Kim, J., Chang, K.S., Kim, B.S., Yang, Y.J., Kim, G.H., Park, I.K. (2011). Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. *Journal of Medical Entomology*, 48, 405-410.
- Pascoli, M., Jacques, M.T., Agarrayua, D.A., Avila, D.S., Lima, R., Fraceto, L.F. (2019). Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. *Science of the Total Environment*, 677, 57-67.
- Pascual, M.D.L.M., (1997). Plagas de los productos almacenados. *Bol. S.E.A* 20, 93-109.
- Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J. (2017). Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Industrial Crops and Products*, 110, 45-57.
- Pavela, R. (2014). Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 287-293.
- Pavela, R. (2015). Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitology research*, 114, 3835-3853.
- Pavela, R. (2016). History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. *Plant Protect Science*, 52, 229–241.
- Pavela, R. (2018). Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. *Environmental science and pollution research*, 25, 10904-10910.
- Pavela, R., Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in plant science*, 21, 1000-1007.
- Pavela, R., Benelli, G., Pavoni, L., Bonacucina, G., Cespi, M., Cianfaglione, K., Bajalang, I., Morshedlooh, M.R, Lupidid, G. Romano, D., Canale, A. (2019). Microemulsions for delivery of Apiaceae essential oils—towards highly effective and eco-friendly mosquito larvicides?. *Industrial Crops and Products*, 129, 631-640.
- Pavela, R., Govindarajan, M. (2017). The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. *Journal of Pest Science*, 90, 369-378.
- Pavela, R., Sedlák, P. (2018). Post-application temperature as a factor influencing the insecticidal activity of essential oil from *Thymus vulgaris*. *Industrial crops and products*, 113, 46-49.
- Pavoni, L., Pavela, R., Cespi, M., Bonacucina, G., Maggi, F., Zeni, V., Benelli, G. (2019). Green micro-and nanoemulsions for managing parasites, vectors and pests. *Nanomaterials*, 9, 1285.

- Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *Journal of hazardous materials*, 186, 1-15.
- Pérez, J.C., Ramírez, S., Suris, M., 2012. Biología de *Plodia interpunctella* (Hübner) sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. *Revista de Protección Vegetal* 27, 90-94.
- Periasamy, V.S., Athinarayanan, J., Alshatwi, A.A. (2016). Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells, *Ultrasound Sonochemistry* 31 449–455.
- Phillips, T.W., Strand, M.R. (1994). Larval secretions and food odors affect orientation in female *Plodia interpunctella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 71, 185-192.
- Pino, B., Ramírez, G. (2009). Traditional knowledge of vegetable species used with magic-religious purpose in communities of the Northern Colombian Pacific. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 180-183.
- Pretti, C., Oliva, M., Di Pietro, R., Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C. Chiappe, C. (2014). Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 138-145.
- Pyun, M.S., Shin, S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Asium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13, 394–400.
- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H., McClements, D.J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility. *Food Chemistry*, 135, 1440-1447.
- Rajendran, S., Sriranjini, V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44, 126–135.
- Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Paul, C. A., & Dharmaraj, J. (2020). Development of encapsulated peppermint essential oil in chitosan nanoparticles: characterization and biological efficacy against stored-grain pest control. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104679.
- Rana, S., Kalaichelvan, P.T. (2013). Ecotoxicity of nanoparticles. *ISRN toxicology*, Article ID 574648, 11 pp.
- Rao, J., McClements, D.J. (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26, 268-276.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36, 887-913.
- Reddy, S.E., Kirti Dolma, S., Koundal, R., Singh, B. (2016). Chemical composition and insecticidal activities of essential oils against diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Yponomeutidae). *Natural product research*, 30, 1834-1838.



- Reed, C.R. (2006). *Managing Stored Grain to Preserve Quality and Value*; AACC Int.: St. Paul, MN, p 235.
- Rees, D.P. (2004). *Insects of stored products*. CSIRO publishing, Australia. 181 pp.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*, 57, 405-424.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3, 1125- 1131.
- Riaz, M.K., Riaz, M.A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K.H., Chen, X., Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 195-222.
- Ribeiro, A.V., de Sá Farias, E., Santos, A.A., Filomeno, C.A., dos Santos, I.B., Barbosa, L.C.A., Picanço, M.C. (2018). Selection of an essential oil from *Corymbia* and *Eucalyptus* plants against *Ascia monuste* and its selectivity to two non-target organisms. *Crop Protection*, 110, 207-213.
- Richards O.W., Thompson W.S. (1932). A contribution to the study of genera *Ephestia* (including *Strymax*, Dyar) and *Plodia interpunctella*, with notes on parasite of the larvae. *Transactions of the Entomological Society of London*, 80, 169-247.
- Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., Wurm, F.R., Landfester, K. (2018). Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society Reviews*, 47, 8572-8610
- Robles-Ozuna, L.E., Ochoa-Martínez, L.A. (2012). ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 13, 109-122.
- Rodríguez Gómez, F. (2017). Hidroprocesamiento de crudos extrapesados utilizando nanocatalizadores de Ni-Fe-Mo. Tesis de Maestría. IT Ciudad Madero, México.
- Rodriguez-Saona, C., Blaauw, B.R., Isaacs, R. (2012). Manipulation of natural enemies in agroecosystems: habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control. *Integrated pest management and pest control—current and future tactics*, 89-126.
- Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J. (2011). Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology*, 32, 268-276.
- Rouhani, M., Samih, M.A., Kalantari, S. (2013). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). *Journal of Entomological Research*, 4, 297-305
- Rousis, N.I., Bade, R., Bijlsma, L., Zuccato, E., Sancho, J.V., Hernandez, F., Castiglioni, S. (2017). Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. *Environmental research*, 156, 31-38.

- Rúa, J., del Valle, P., de Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., García-Armesto, M.R. (2019). Combination of carvacrol and thymol: Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne pathogens and disease*, 16, 622-629.
- Ryu, V., McClements, D.J., Corradini, M.G., McLandsborough, L. (2018). Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. *Food chemistry*, 245, 104-111.
- Saberi, A.H., Fang, Y., McClements, D.J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions by spontaneous emulsification: effect of propylene glycol and ethanol on formation, stability, and properties, *Food Research International*, 54, 812–820.
- Safaepour, M., Shahverdi, A.R., Shahverdi, H.R., Khorramzadeh, M.R., Gohari, A.R. (2009). Green synthesis of small silver nanoparticles using geraniol and its cytotoxicity against fibrosarcoma-wehi 164. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 1, 111-115.
- Sahayaraj, K., Madasamy, M., Radhika, S.A. (2016). Insecticidal activity of bio-silver and gold nanoparticles against *Pericallia ricini* Fab. (Lepidoptera: Archidae). *Journal of Biopesticides*, 9, 63-72.
- Salager, J. Antón, R., Anderéz, J., Aubry, J. (2001). Formulation des microémulsions par la méthode du HLD. En *Techniques de Ingénieur, Traité Génie des procédés*.
- Saldanha, A. A., Vieira, L., de Azambuja Ribeiro, R.I.M., Thomé, R.G., dos Santos, H.B., Silva, D. B., Soares, A.C. (2019). Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioidergic systems. *Journal of ethnopharmacology*, 231, 325-336.
- Salomón, O.D. (2005). Artrópodos de interés médico en Argentina. Fundación Mundo Sano. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación Monográfica, 6. Buenos Aires, Argentina. 76-78 pp.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids* 43, 547–556.
- Sánchez, F.S. (1974). Sentido y posibilidades de la toxicología ambiental: Discurso correspondiente a la solemne apertura del curso académico 1974-75. Universidad Complutense de Madrid.
- Satheeshkumar, C., Ravivarma, M., Rajakumar, P., Ashokkumar, R., Jeong, D.C., Song, C. (2015). Synthesis, photophysical and electrochemical properties of stilbenoid dendrimers with phenothiazine surface group. *Tetrahedron Letters*, 56, 321-326.
- Satyral, P., Murray, B.L., McFeeters, R.L., Setzer, W.N. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5, 70-82.

Schaming, D., Remita, H. (2015). Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry*, 17, 187-205.

Schöller, M., Flinn, P.W., Grieshop, M.J., Zdarkova, E. (2006). Biological control of stored product pests. In *Insect management for food storage and processing Heeps* (Ed.). AACC International, Minesota, USA. 67-87 pp.

Sciau, P. (2012). Nanoparticles in ancient materials: the metallic lustre decorations of medieval ceramics. *INTECH Open Access Publisher*. 115, 525-540

Secretaria de Agroindustria. (2018). Infraestructura de acopio y almacenaje de Argentina [WWWDocument].URL.[https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss\\_mercados\\_agropecuarios/infraestructura/](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/infraestructura/).

Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Hajri, A., Hosni, K., Marzouki, L., Sebai, H. (2016). Antioxidant properties of *Artemisia herba-alba* and *Eucalyptus camaldulensis* essentials oils on malathion-induced reproductive damage in rat. *RSC advances*, 6, 110661-110673.

Sfara, V., Zerba, E.N., Alzogaray, R. A. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology*, 46, 511-515.

Shaala, N.M.A., Zulkifli, S.Z., Ismail, A., Azmai, M.N.A., Mohamat-Yusuff, F. (2015). Selected morphological changes in nauplii of brine shrimp (*Artemia salina*) after tributyltin chloride (TBTCI) exposure. *World Applied Sciences Journal*, 33, 1334-1340.

Shahriari, M., Zibae, A., Shamakhi, L., Sahebzadeh, N., Naseri, D., Hoda, H. (2019). Bio-efficacy and physiological effects of *Eucalyptus globulus* and *Allium sativum* essential oils against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Toxin Reviews*.

Shahzad, K., Manzoor, F. (2019). Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug and chemical toxicology*, 42, 1-11.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., Shafiq, S. (2007). Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *Aaps Pharmscitech*, 8, 191-200

Shankar U., Abrol, D.P. (2012) Integrated Pest management in stored grain, In: Shankar U., Abrol, D.P. (Eds.), *Integrated Pest Management: Principles and Practice*. CAB International, U.K., pp. 386 -407.

Sharma, S., Kooner, R., Arora, R. (2017). Insect Pests and Crop Losses. *Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture*, 45–66.

.

Silva, G.L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R.H., Melo, D.A., Donadio, M.V., Mello, R.O. (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 1397-1408.

- Singh, A., Dhiman, N., Kar, A.K., Singh, D., Purohit, M.P., Ghosh, D., Patnaik, S. (2020). Advances in Controlled Release Pesticide Formulations: Prospects to Safer Integrated Pest Management and Sustainable Agriculture. *Journal of hazardous materials*, 385, 121525.
- Snoussi, M., Noumi, E., Punchappady-Devasya, R., Trabelsi, N., Kanekar, S., Nazzaro, F., Al-Sieni, A. (2018). Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum*. *Journal of food science and technology*, 55, 2824-2832.
- Soares, M.A., Campos, M.R., Passos, L.C., Carvalho, G.A., Haro, M.M., Lavoit, A.V., Desneux, N. (2019). Botanical insecticide and natural enemies: a potential combination for pest management against *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science*, 92, 1433-1443.
- Solans, C., Solé, I. (2012). Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Current opinion in colloid & interface science*, 17, 246-254.
- Soonwera, M., Wongnet, O., Sittichok, S. (2018). Ovicidal effect of essential oils from Zingiberaceae plants and *Eucalyptus globulus* on eggs of head lice, *Pediculus humanus capitis* De Geer. *Phytomedicine*, 47, 93-104.
- Stadler, T., Buteler, M., Weaver, D.K., Sofie, S. (2012). Comparative toxicity of nanostructured alumina and a commercial inert dust for *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) at varying ambient humidity levels. *Journal of stored products research*, 48, 81-90.
- Stanley, J. y Preetha, G. (2016). Introduction in: Pesticide toxicity to non-target organisms Stanley, J. y Preetha, G (Eds). Springer, Berlin, Germany, 99-152 pp.
- Stanley, J., Chandrasekaran, S., Preetha, G., Kuttalam, S., Jasmine, R.S. (2016). Selective toxicity of diafenthiuron to non-target organisms: honey bees, coccinellids, chelonus, earthworms, silkworms and fish. *Journal of Plant Protection Research*, 56, 1-5.
- Stefanazzi, N., Stadler, T., Ferrero, A. (2011). Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 67, 639-646.
- Stenberg, J.A. (2017). A conceptual framework for integrated pest management. *Trends in plant science*, 22, 759-769.
- Stork, N.E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. *Annual review of entomology*, 63, 31-45.
- Sugumar, S., Clarke, S.K., Nirmala, M.J., Tyagi, B.K., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2014). Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of entomological research*, 104, 393-402.

- Sun, C., Verheggen, F., Zeng, Z., Cui, H. (2020). Polymer-Based Nanoinsecticides: Current Developments, Environmental Risks and Future Challenges-A Review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 24, 59–69.
- Swathy, J.S., Mishra, P., Thomas, J., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2018). Antimicrobial potency of high-energy emulsified black pepper oil nanoemulsion against aquaculture pathogen. *Aquaculture*, 491, 210-220.
- Tak, J.H., Isman, M.B. (2015). Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Scientific reports*, 5, 12690.
- Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S., Hayashi, M. (2011). Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111, 420-424.
- Tarelli, G., Zerba, E.N. Alzogaray, A., (2009). Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 102, 1383-1388.
- Tavares, W. De S., De S. Freitas, S., Grael, C.F.F., De Menezes, C.W.G., De A. Pereira, A.I., De Assis Júnior, S.L., Graziotti, G.H., Zanuncio, J.C. (2013). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as a guinea pig for the analysis of the toxicity of natural products. *Vie et milieu - Life and environment*, 63, 193-204.
- Thakur, A., Walia, M.K., Kumar, S.L. (2013). Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. *Pharmacophore*, 4, 15-25.
- Thiruvengadam, M., Rajakumar, G., Chung, I.M. (2018). Nanotechnology: current uses and future applications in the food industry. *3 Biotech*, 8, 74- 87.
- Tilley, D.R., Casada, M.E., Arthur, F.H. (2007). Heat Treatment for Disinfestation of Empty Grain Storage Bins. *Journal of Stored Product Research*, 43, 221–228.
- Towler, D.A., Arnaud, R.S. (2002). Use of cultured osteoblastic cells to identify and characterize transcriptional regulatory complexes. In *Principles of bone biology*, Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan, G.A (Eds.). Academic Press, San Diego, USA, 1503-1527 pp.
- Travisi, C.M., Nijkamp, P., Vighi, M., Giacomelli, P. (2006). Managing pesticide risks for non-target ecosystems with pesticide risk indicators: a multi-criteria approach. *International Journal of Environmental Technology and Management*, 6,141-162.
- Tscharntke, T., Karp, D.S., Chaplin-Kramer, R., Batáry, P., DeClerck, F., Gratton, C., Martin, E. A. (2016). When natural habitat fails to enhance biological pest control—Five hypotheses. *Biological Conservation*, 204, 449-458.

- Upadhyay, N., Dwivedy, A.K., Kumar, M., Prakash, B., Dubey, N.K. (2018). Essential oils as eco-friendly alternatives to synthetic pesticides for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21, 282-297.
- Van de Vel, E., Sampers, I., Raes, K. (2017). A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59, 357-378.
- Vázquez, N.I., González, Z., Ferrari, B., Castro, Y. (2017). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 56, 139-145.
- Vernier, F., Leccia-Phelpin, O., Lescot, J. M., Minette, S., Miralles, A., Barberis, D., Tonneau, J. P. (2017). Integrated modeling of agricultural scenarios (IMAS) to support pesticide action plans: the case of the Coulouge drinking water catchment area (SW France). *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 6923-6950.
- Vinogradova, E. B. (2003). Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 67, 41-50.
- Vinogradova, E.B. (2000). The *Culex pipiens* complex. In: *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control, Vinogradova, E. B. (Ed). Pensoft Publishers. Sofia, Bulgaria 24-26 pp.
- Vögtle, F. (2000). Functional dendrimers. *Progress in Polymer Science*, 25, 987-1041.
- Vunain, E., Mishra, A., Mamba, B. (2016). Dendrimers, mesoporous silicas and chitosan-based nanosorbents for the removal of heavy-metal ions: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 570-586.
- Walter, P., Welcomme, E., Hallégot, P., Zaluzec, N.J., Deeb, C., Castaing, J., Tsoucaris, G. (2006). Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula. *Nano letters*, 6, 2215-2219.
- Wang, H., Yang, W., Cheng, L., Guan, C., Yan, H. (2018). Chinese ink: High performance nanofluids for solar energy. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 176, 374-380.
- Wang, P., Ma, Q., Hu, D., Wang, L. (2015). Removal of Reactive Blue 21 onto magnetic chitosan microparticles functionalized with polyamidoamine dendrimers. *Reactive and Functional Polymers*, 91, 43-50.
- Wang, P., Zhao, X.H., Wang, Z.Y., Meng, M., Li, X., Ning, Q. (2010). Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment. *Cancer letters*, 298, 34-49.
- Wang, Y.C., Li, P., Chi, D.F. (2016). Electrophysiological and behavioral responses of *Tenebrio molitor* L. to fourteen kinds of plant volatiles. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19, 261-267.

- Wang, Z.Q., Zhou, H., Han, J., He, Y.Q., Lu, L.P. (2011). Evaluate insecticidal activity using *Artemia salina* L. *Agrochemicals*, 50, 261-263.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434, 360–365.
- Werdin González, J.O., Gutiérrez, M.M., Ferrero, A.A., Band, B.F. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control—Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130-138.
- Werdin González, J.O., Jesser, E.N., Yeguerman, C.A., Ferrero, A.A., Band, B.F. (2017). Polymer nanoparticles containing essential oils: new options for mosquito control. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 17006-17015.
- Werdin González, J.O., Stefanazzi, N., Murray, A.P., Ferrero, A.A., Band, B.F. (2015). Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. *Journal of pest science*, 88, 393-404.
- Werdin González, J.O., Yeguerman, C., Marcovecchio, D., Delrieux, C., Ferrero, A., Band, B.F. (2016). Evaluation of sublethal effects of polymer-based essential oils nanoformulation on the german cockroach. *Ecotoxicology and environmental safety*, 130, 11-18.
- Weston, D.P., You, J., Harwood, A.D., Lydy, M.J. (2009). Whole sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: III. Temperature manipulation. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28,173-180.
- Witthayapanyanon, A., Acosta, E.J., Harwell, J.H., Sabatini, D.A. (2006). Formulation of ultralow interfacial tension systems using extended surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 9 331-339.
- Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of controlled release*, 128, 185-199.
- Woranuch, S., Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96, 578-585.
- Wu, S.H., Hung, Y., Mou, C.Y. (2013). Compartmentalized hollow silica nanospheres templated from nanoemulsions. *Chemistry of Materials*, 25, 352-364.
- Yáñez, E. A. (2018). Los enemigos de las plantas y los daños que producen. En: *Determinación del estado sanitario de las plantas, suelo e instalaciones y elección de los métodos de control.* IC Editorial, Málaga, España. 12-13 pp.
- Yang, F.L., Li, X.G., Zhu, F., Lei, C.L. (2009). Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 10156-10162.
- Yang, L., Watts, D.J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters*, 158, 122-132.

- Yang, Y., Zhao, C., Chen, J., Tian, G., McClements, D.J., Xiao, H., Zheng, J. (2017) Encapsulation of polymethoxyflavones in citrus oil emulsion-based delivery systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 1732–1739.
- Yeguerman, C., Jesser, E., Massiris, M., Delrieux, C., Murray, A.P., Werdin González, J.O. (2020). Insecticidal application of essential oils loaded polymeric nanoparticles to control German cockroach: Design, characterization and lethal/sublethal effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110047.
- Yeom, H.J., Kang, J., Kim, S.W., Park, I.K. (2013). Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107, 200-206.
- Yong, C.P., Gan, L.M. (2005). Microemulsion Polymerizations and Reactions. *Advances in Polymer Science*, 175, 257–298.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food chemistry*, 107, 1300-1306.
- Yuan, Y., Huang, M., Pang, Y.X., Yu, F.L., Chen, C., Liu, L.W., Chen, Z.X. (2016). Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, 21, 1024-1037.
- Yukuyama, M.N., Ghisleni, D.D.M., Pinto, T.D.J.A., Bou-Chacra, N.A. (2016). Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics—a review. *International journal of cosmetic science*, 38, 13-24.
- Zahrán, H.E.D.M., Abdelgaleil, S.A. (2011). Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14, 46-51.
- Zapata, N., Smagghe, G., (2010). Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products* 32, 405-410.
- Zhang, C., Chung, J.W., Priestley, R.D. (2012). Dialysis nanoprecipitation of polystyrene nanoparticles. *Macromolecular rapid communications*, 33, 1798-1803.
- Zhang, Z., Cheng, M., San Gabriel, M., Neto, Â. A. T., da Silva Bernardes, J., Berry, R., & Tam, K. C. (2019). Polymeric hollow microcapsules (PHM) via cellulose nanocrystal stabilized Pickering emulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 555, 489-497.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, 150, 307–312.
- Ziani, K., Fang, Y., McClements, D.J. (2012). Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: effect of composition and storage conditions. *Food Research International*, 46, 209-216.



Benzi, V., Stefanazzi, N., Ferrero, A.A. (2009). Biological activity of essential oils from leaves and fruits of pepper tree (*Schinus molle* L.) to control rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). Chilean Journal of Agricultural Research, 69, 154-159.

Benzi, V., Stefanazzi, N., Murray, A.P., Werdin González, J.O., Ferrero, A. (2014). Composition, repellent, and insecticidal activities of two South American plants against the stored grain pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). International Scholarly Research Notices.

Gutiérrez, M.M., Werdin González, J.O., Stefanazzi, N., Bras, C., Ferrero, A.A. The potential application of plant essential oils to control *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). Parasitology research, 115, 633-641.

Stefanazzi, N., Stadler, T., Ferrero, A. (2011). Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Management Science, 67, 639-646.

Werdin González, J.O., Gutiérrez, M.M., Murray, A.P., Ferrero, A.A. (2011). Composition and biological activity of essential oils from Labiatae against *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) soybean pest. Pest Management Science, 67, 948-955.

Toth, S.J, Sparks, T.C (1988). Influence of treatment technique on the temperature–toxicity relationships of *cis*- and *trans*-permethrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 81, 115–118.

## 7. Trabajos derivados de esta tesis

---

### Trabajos publicados en revistas científicas

Jesser, E.; Yeguerman, C.; Gili V.; Santillan G.; Murray, A.P.; Domini C.; Werdin-González, J.O. (2020). Optimization and characterization of essential oil nanoemulsions using ultrasound for new ecofriendly insecticides. ACS Sustainable Chemistry & Engineering.

Jesser, E.; Yeguerman, C.; Stefanazzi, N.; Gomez, R.; Murray, A.P.; Werdin-González, J.O. (2020). An ecofriendly approach for the control of a common insect pest in the food industry, combining polymeric nanoparticles and post-application temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Jesser, E., Lorenzetti, A. S; Yeguerman, C.; Murray, A.P.; Domini C.; Werdin-González, J.O. (2020). Ultrasound assisted formation of essential oil nanoemulsions: Emerging alternative for *Culex pipiens pipiens* Say (Diptera: Culicidae) and *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) management. Ultrasonic Sonochemistry

Jesser, E.; Werdin González, J.O.; Murray, A.P.; Ferrero, A.A. (2017). Efficacy of essential oils to control the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Asia-Pacific Entomology. 20: 1122-1129. Elsevier, ISSN: 1226-8615.

### Trabajos presentados en congresos

Jesser, E.; Lorenzetti, A. S; Yeguerman, C.; Murray, A.P.; Domini C.; Werdin-González, J.O. "Formación de nanoemulsiones basadas en aceite esencial de menta a asistidas por ultrasonido: una alternativa emergente para el manejo de *Culex pipiens pipiens* say (diptera, culicidae)" XL Congreso Nacional de Entomología. Concepcion, Chile. Octubre de 2019.

Jesser, E.; Yeguerman, C.; Vallejo Morgado, M.; Murray, P.; Ferrero, A.; Werdin, J. "Efecto aceite esencial-piretroide: una contribución en el control de gorgojo castaño de la harina y la polilla de la fruta seca". X Congreso Argentino de Entomología. Mendoza, Argentina. Mayo de 2018.

Jesser, E.; Vallejo Morgado, M.; Yeguerman, C.; Murray, P.; Ferrero, A.; Werdin, J. "Nanopartículas de palmarosa y geranio, una nueva alternativa para el manejo de la polilla de la fruta seca". X Congreso Argentino de Entomología. Mendoza, Argentina. Mayo de 2018.

Jesser, E.; Gómez, R.; Yeguerman, C.; Murray, Ana P.; Ferrero, A.A.; Werdin González, J. La temperatura y su relación con la toxicidad de nanopartículas poliméricas en la polilla de la fruta seca. *Naturalia Patagonica* 7 (volumen especial) ISSN 0327-8050. Datos del evento: III Jornadas Patagónicas de Ciencias Ambientales, IV Jornadas Patagónicas de Biología, VI Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. Trelew, Argentina. Septiembre 2018.