

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Química

Desarrollo de un insecticida a base de α -pineno y limoneno formulado a partir de materias primas de origen renovable.


Trabajo Final de Graduación presentado ante la Escuela de Química como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química

Maya Jiménez Brenes

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2018

Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de:

Licenciada en Química



Dr. Javier Trejos Zelaya
Presidente del tribunal



Dr. Leonardo Álvarez Galán
Director del proyecto



M.Q.I. Javier Quesada Espinoza
Profesor asesor



Lic. Darío Chinchilla Chinchilla
Profesor asesor



Dr. Juan José Araya Barrantes
Miembro del tribunal



Maya Jiménez Brenes
Postulante

Dedicatoria

Pequeña, que grandes pasos has dado.

A mis padres, gracias por todas las oportunidades y enseñanzas.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a todas las personas que me ayudaron y acompañaron durante la realización de este proyecto.

- Dr. Leonardo Álvarez Galán, por su guía y amistad en este proceso.
- Sr. Eduardo Valerio Hernández por su paciencia y colaboración en el cuarto de instrumentos.
- Sr. Leonardo Mata Soto, por suministrarnos el agua con larvas de *Aedes Aegypti*.
- M.Q.I. Luis Mesén Jiménez y a la Unidad de Proveeduría de la Escuela de Química.
- A familia y amigos.

Tabla de contenidos

Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Tabla de contenidos	v
Índice de figuras	vii
Índice de abreviaciones	viii
Resumen.....	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales y equipos.....	12
2.2. Determinación del HLB del biodiesel.....	13
2.3. Diagrama ternario (tensoactivos-biodiesel-agua).....	14
2.3.1. Variando la cantidad de agua.....	14
2.3.2. Variando la cantidad de B-Eco.....	14
2.4. Optimización de la formulación.....	15
2.3.1. ¿El orden de la materia prima altera el producto?	15
2.3.2. Grado de separación.....	15
2.3.3. Optimización de los tensoactivos.....	16

2.3.4.	Formulación final con los ingredientes activos.	16
2.5.	Pruebas de estabilidad del formulado.....	17
2.5.1.	Preparación de las muestras.	17
2.5.2.	Preparación de los patrones.....	19
2.5.3.	Análisis de las muestras.....	19
2.5.4.	Pruebas de extracción.	20
2.6.	Concentrado emulsificable.....	21
2.6.1.	Formulación del concentrado emulsificable.	21
2.6.2.	Pruebas de estabilidad.....	22
2.7.	Pruebas de efectividad realizadas en el laboratorio.	22
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.	CONCLUSIONES	43
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6.	ANEXOS	51
Anexo 1:	Resultados obtenidos de la espectrometría de masas.....	52
Anexo 2:	Control estabilidad de la estufa durante las pruebas de estabilidad.	53
Anexo 3:	Resultados obtenidos de la cromatografía de gases.	54
Anexo 4:	Resumen de la formulación final.	55

Índice de figuras

Figura 1-1 Fotografía de los distintos géneros de los mosquitos. ²	2
Figura 1-2 Proyecto de respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030. ⁶	3
Figura 1-3 Estructura del Temephos.	5
Figura 1-4 Estructura de la cipermetrina.	6
Figura 1-5 Distintas rutas de degradación de la cipermetrina. ^{17,18}	7
Figura 1-6 Estructura de (a) Limoneno, (b) α -Pineno (c) β -Pineno.	8
Figura 2-1 Batería de HLB realizada con monoesterato y Tween 80®.	25
Figura 2-2 Fotografía del biodiesel de la Escuela de Química.	26
Figura 2-3 Fotografía del resultado de la prueba “Variando la cantidad de agua”.	27
Figura 2-4 Fotografía del resultado de la prueba “Variando la cantidad de B-Eco”.	28
Figura 2-5 Diagrama ternario biodiesel-agua-surfactantes para la formulación del larvicida.	29
Figura 2-6 Composición del RAID todo insecto, aerosol®.	30
Figura 2-7 Fotografía del estudio del orden de la materia prima en la formulación.	31
Figura 2-8 Fotografía la optimización de los tensoactivos en la formulación.	32
Figura 2-9 Fotografía de la extracción de los analitos en el RTU con diclorometano. ..	35
Figura 2-10 Fotografía del estudio de la eficiencia del larvicida. a. Antes de agregar el larvicida. b. 2 horas después de haber agregado el larvicida.....	37
Figura 2-11 Fotografía del concentrado C ₂	38
Figura 2-12 Curvas de calibración del limoneno y pineno para las pruebas de estabilidad.	40
Figura 2-13 Ajuste de Arrhenius de las pruebas de estabilidad para el limoneno y pineno.	41

Índice de abreviaciones

AEs	Aceites esenciales
B-Eco	Biodiesel marca Energías Biodegradables
HLB	Equilibrio hidrófilo-lipófilo
IAS	Ingredientes activos
% m/m	Porcentaje masa en masa
Monoestearato	Monoestearato de glicerilo
MS	Ministerio de Salud
MTW80	Mezcla de monoestearato y Tween 80 [®] en proporción 1:9
OMS	Organización Mundial de la Salud
RTU	Listo para ser usado

Resumen



Actualmente, en el sector agrícola la mayoría de los insecticidas utilizan compuestos derivados del petróleo, lo que genera una gran dependencia de este mercado y aumenta su impacto ambiental. Sin embargo, en esta nueva era en la que el mercado demanda productos de fuentes renovables, a bajo costo y amigables con el ambiente los insecticidas tradicionales comienzan a perder popularidad. Con el fin de brindar una respuesta a la problemática planteada en este trabajo se desarrolló un insecticida ready to use y un concentrado emulsificable (CE) a base de fuentes renovables como lo es el biodiesel y utilizando limoneno y α -pineno como ingredientes activos. Por medio de distintos procesos de optimización se obtuvo que la formulación final del Ready-to-use es: 4% de tensoactivos, 0,5% de ingredientes activos, 8,0% de biodiesel, 0,5% de 2-fenoxietanol y 86% de agua; mientras que, la del concentrado emulsificable es: 17,4% de tensoactivos, 1,8% de ingredientes activos, 80,3% de biodiesel y 0,5% de 2-fenoxietanol. Las pruebas de estabilidad determinan una duración de 4 meses para el CE. Por su parte, las pruebas preliminares de laboratorio comprueban la efectividad del producto, dado que a las 2 horas de colocado el 100% de la población de larvas murió.



Actuellement, dans le secteur agricole la plupart des insecticides emploient des produits dérivés du pétrole, ce qui génère une grande dépendance de ce marché et les rends encore plus nocifs pour l'environnement. Néanmoins, dans cette nouvelle ère dans laquelle le marché exige une demande de produits renouvelables, à prix bas et amicaux avec l'environnement, les insecticides traditionnels commencent à perdre popularité. C'est pourquoi, dans ce travail des composants renouvelables ont été utilisés, tels que biodiesel, le limonène et de l' α -pinène comme ingrédients actifs. En employant des différents processus d'optimisation les pourcentages de la formulation du Ready-to-use ont été déterminés : 4% m/m d'agents de surface, 0,5% m/m d'ingrédients actifs, 8,0% m/m biodiesel, 0,5% m/m de 2-phénoxiéthanol et 86,0% m/m d'eau. Tandis que, ceux de la formulation du concentré émulsifiable sont: 17,4% m/m d'agents de surface, 1,8% m/m d'ingrédients actifs, 80,3% m/m biodiesel, 0,5% m/m de 2-phénoxiéthanol. Les études de stabilité déterminent une durée de 4 mois pour le CE à 45 °C. D'une autre part, les essais préliminaires du laboratoire confirment l'effectivité du produit puisque après 2 heures de mit le produit le 100% de la population de larves ont mourut.

1. INTRODUCCION

El vector se define como todo aquel organismo vivo que transmite una enfermedad, ya sea entre personas o de un animal a una persona. Los vectores más estudiados son los mosquitos; dentro de los cuales se encuentran el género *Aedes* que puede ser portador del virus de la chikungunya, el dengue, la fiebre amarilla, el zika, etc., el género *Anopheles*, portador de paludismo y filariasis linfática, y el *Culex*, portador de encefalitis japonesa, fiebre del Nilo occidental y filariasis linfática,¹ en la **Figura 1-1** se aprecian los distintos géneros.



Figura 1-1 Fotografía de los distintos géneros de los mosquitos.²

Actualmente, en 128 países, existen más de 3900 millones de personas que se encuentran expuestas a contraer dengue; situación que deriva en un aproximado de 96 millones de casos de este virus al año.¹ Además, los vectores mencionados anteriormente pueden llegar a ser desencadenantes de pandemias y epidemias en regiones con poblaciones crecientes tanto de personas como de animales³⁻⁵, además, éstos contribuyen en gran parte a la mortalidad y morbilidad en los países tropicales y subtropicales.³ Estas tasas aumentan rápidamente dentro de las poblaciones más pobres y pueden agravar aún más su situación dado que las personas que sobreviven a las

enfermedades transmitidas por los vectores pueden llegar a quedar desfiguradas o con algún tipo de discapacidad.⁶ A nivel macro, dichas enfermedades representan una gran carga económica. En el año 2013 se invirtió a nivel mundial USD 8900 millones en tan solo el dengue.^{6,7} Es por estas razones sociales, económicas y de salud que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado un plan denominado *Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030*⁶ en el cual se ofrece una orientación estratégica a los países y los asociados de dicha organización.¹ Dentro de este plan a largo plazo se plantea la colaboración entre las autoridades locales y las comunidades con el fin de monitorear las poblaciones de los vectores y de ser preciso tomar las medidas necesarias, así como la mejora en los recursos para dicho control y el desarrollo de una investigación básica y aplicada, tal como se aprecia en la **Figura 1-2**.⁶

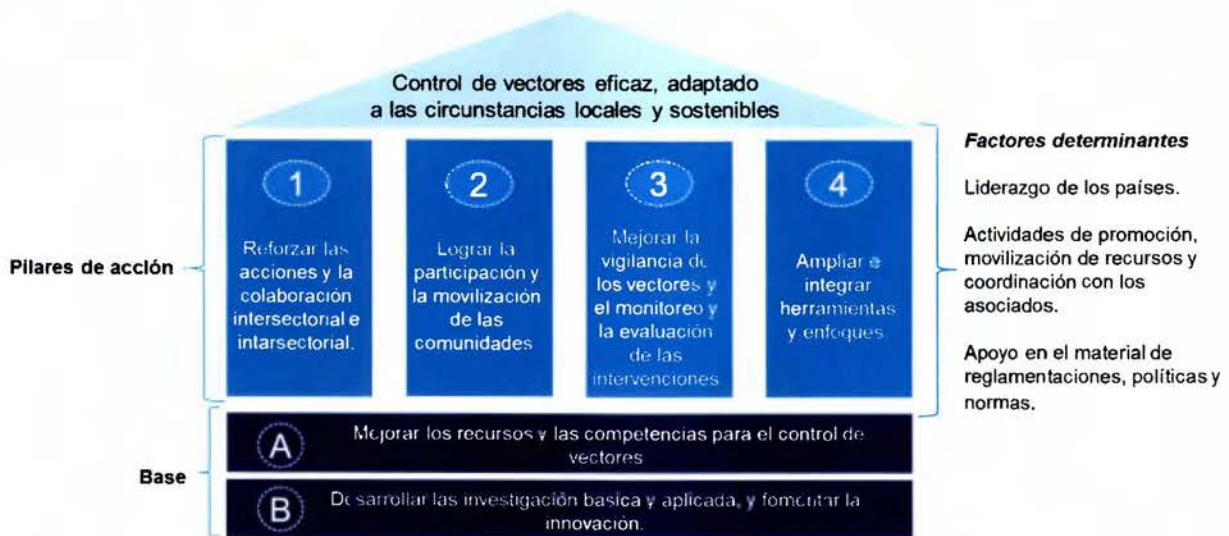


Figura 1-2 Proyecto de respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030.⁶

En Costa Rica, el zancudo del *Aedes aegypti* se ha ido adaptando a las distintas condiciones que existen en el país: antes prefería las zonas costeras con un clima cálido y una baja altitud; ahora está en casi todo el país incluso en zonas montañosas con un clima húmedo y frío.⁸ El Ministerio de Salud (MS) con el fin de realizar un manejo integral de este vector propone realizar las siguientes medidas: control biológico, control químico, educación, acciones de ordenamiento del medio, investigación epidemiológica y entomológica del campo y promoción de la participación ciudadana.⁹ Es como parte de esta última medida que las autoridades en el tema señalan la importancia de la participación ciudadana para el control de los mosquitos, para esto se le solicita a la población que no dejen posibles criaderos de este insecto en sus hogares.¹⁰ La campaña de concientización se da a través de distintos medios de comunicación como lo son anuncios televisivos y el periódico, al igual que a través de las distintas redes sociales. A pesar de las medidas preventivas tomadas por el Ministerio de Salud, algunas personas a todo lo largo del país siguen sin acatar las instrucciones. Esto genera criaderos de estos insectos. Entonces el MS debe actuar ante las denuncias de grandes poblaciones mosquitos en las comunidades y eliminar los criaderos aplicando el control químico, es decir: fumigando las zonas afectadas. Además, desde el inicio del 2016 se implementó como control biológico el uso de la bacteria *Saccharopolyspora Spinosa* quien mata las larvas de los mosquitos en un periodo de 48 horas.¹¹ La bacteria se coloca en forma de pastillas en el agua que se cree que haya un posible criadero, de haber larvas las bacterias atacan el sistema nervioso de la larva lo que conlleva su muerte, mas no ataca a los mosquitos adultos ni afecta a los humanos.¹¹ A pesar del uso de esta bacteria el Ministerio

asegura que no son un remplazo de las otras medidas realizadas para el control del zancudo y pretende no generar una falsa seguridad,¹¹ por lo que aún es necesario fumigar. Es entonces cuando se pone en marcha el control químico para eliminar los zancudos del *Aedes Aegypti* por lo que se emplean dos métodos los cuales atacan dos fases del ciclo biológico del mosquito: larvicidas y adulticidas; para ambos casos se emplea Temephos a 1 g/100 mL también conocido como Abate⁹ (ver **Figura 1-3**).

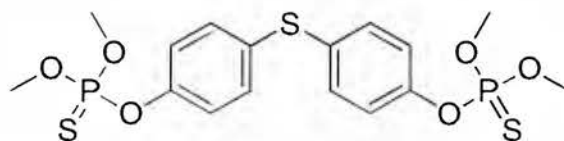


Figura 1-3 Estructura del Temephos.

A pesar de ser el Temephos el insecticida empleado por el país para controlar la plaga, durante el planteamiento inicial de este trabajo final de graduación se pensó en la utilización de cipermetrina como ingrediente activo (IA). Esto debido a la persistencia moderada de la cipermetrina bajo las condiciones del campo, su alta potencia contra los insectos y su baja toxicidad para los mamíferos.¹² La cipermetrina es un insecticida sintético de la familia de los piretroides (**Figura 1-4**) y debido a la complejidad de su síntesis se emplean todos los isómeros de ésta.^{12,13} Los piretroides bloquean el puente que permite el flujo de sodio generando una ola de impulsos nerviosos que matan al insecto.¹³

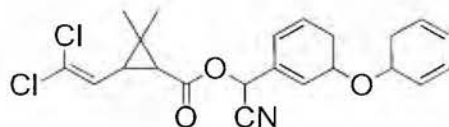


Figura 1-4 Estructura de la cipermetrina.

Sin embargo, se ha demostrado que la cipermetrina puede llegar a dañar el material genético: La ingesta de la misma o la exposición dérmica a este compuesto crea un aumento de los micronúcleos confirmando las alteraciones cromosómicas que sufre el cuerpo.¹⁴⁻¹⁶ Asimismo, la agencia de protección ambiental de Estados Unidos por sus siglas en inglés US EPA colocó este insecticida dentro de su lista de posibles carcinógenos.^{12,16} en la **Figura 1-5** se pueden ver las distintas rutas de degradación de la cipermetrina en el ambiente.^{17,18}

Como se mencionó anteriormente, el uso de estos ingredientes presenta efectos no deseables tanto en la salud humana como sobre el ambiente, razón por la cual es deseable la sustitución de los mismos por otros compuestos más amigables y menos nocivos.¹⁹ En este aspecto, los aceites esenciales (AEs) son productos de origen natural que presentan un gran potencial como sustituto del ingrediente antes mencionado. Por ejemplo, es conocido que los AEs dentro de las plantas tienen funciones como la atracción de insectos polinizadores, protección contra el frío o el calor y mecanismos de defensa contra plagas y/o microorganismos.²⁰ Siendo esta última función la que se desearía aprovechar mediante la preparación de una formulación insecticida. Por citar varios casos, se ha reportado que el aceite esencial de las *Citrus aurantium* (naranja andaluza) cuyo

componente principal es el limoneno presenta una actividad insecticida contra el *C. pipiens* (mosquito común);²¹ de igual forma, el aceite de la *Citrus hystrix* el cual es rico en limoneno y β -pineno que ha reportado ser nocivo contra las larvas del *Aedes aegypti*.²²

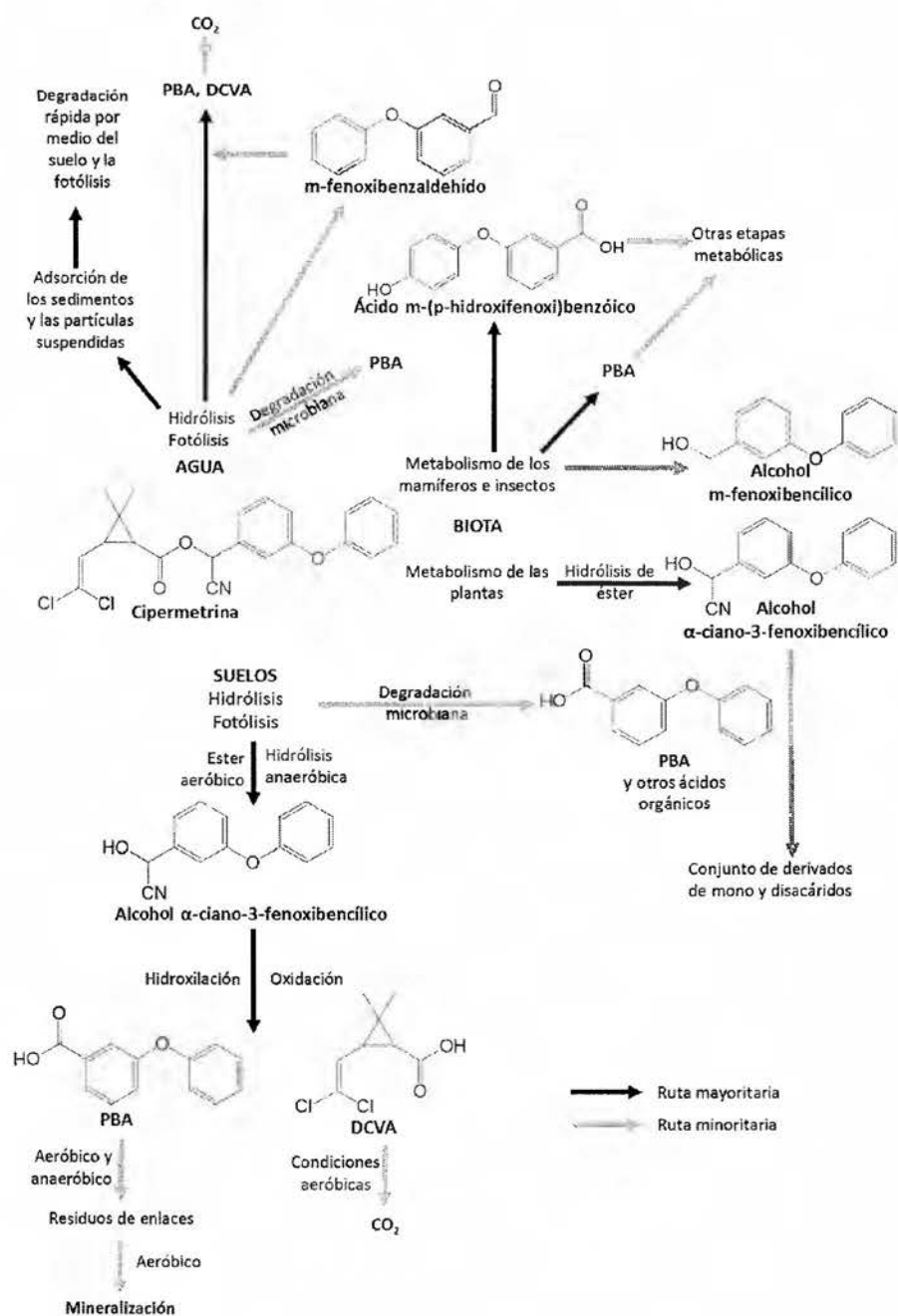


Figura 1-5 Distintas rutas de degradación de la cipermetrina.^{17,18}

El inconveniente de utilizar AEs dentro de una formulación que puede dar origen a un producto de consumo a nivel masivo es el bajo rendimiento que se obtiene al extraer los aceites de la fuente natural. Además, al ser mezclas complejas de compuestos orgánicos la tendencia a sufrir reacciones de oxidación que degraden los ingredientes es casi inevitable. Es por estas razones, que se piensa en lugar de utilizar aceites esenciales recurrir a sus ingredientes mayoritarios como una opción viable al diseñar la formulación de un producto comercial a gran escala.²⁰ Un ejemplo de esto es el trabajo de Benelli *et al.*² quienes reportaron actividad larvica del eugenol y el α -pineno (ingredientes del aceite esencial de *Plectanthus barbatus*) contra el vector del dengue y de la malaria.

Muy recientemente, en el 2015, Pavela²⁰ reportó una lista de los constituyentes mayoritarios de varios aceites esenciales que presentan actividad larvica contra el *Aedes aegypti* estando el limoneno, el α y β -pineno (**Figura 1-6**) dentro de los compuestos que se encuentran con mayor frecuencia; por esta razón en este trabajo se decidió en lugar de cipermetrina utilizar limoneno y α -pineno como los ingredientes activos de una formulación insecticida.

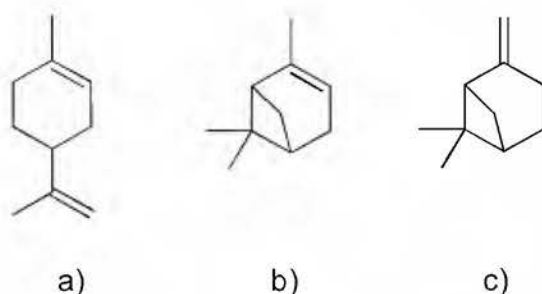


Figura 1-6 Estructura de (a) Limoneno, (b) α -Pineno (c) β -Pineno.

De manera general, los ingredientes activos que han sido utilizados para preparar insecticidas tradicionales son poco solubles en agua debido a su estructura no polar (Figuras 1.3, 1.4 y 1.6), sin embargo, son altamente solubles en disolventes orgánicos, por lo que, a la hora de realizar la formulación se emplean disolventes como el diésel, la gasolina, el xileno y el tolueno.^{23,24} Estos productos derivados del petróleo poseen grandes inconvenientes dado que tienen una alta toxicidad y no son biodegradables. A esto, se le suma que son muy volátiles y cancerígenos afectando por ende al usuario y al público en general.²³ Por tanto, son considerados como productos que causan gran daño tanto en el medioambiente como en la salud humana.²⁴ Asimismo, al ser estos compuestos derivados del petróleo y no de fuentes renovables dependen de la explotación de este material y de su inestable precio, generándose así posibles alzas en el precio de los productos.

Actualmente, los consumidores cada vez más preocupados por el planeta en el que vivimos buscan productos amigables con este,²⁵ así como productos que no afecten su salud, razón por la cual se ve una disminución en la demanda de los insecticidas que poseen este tipo de disolventes tan problemáticos.

Todas estas razones llevan a una búsqueda en el sector comercial para satisfacer la demanda de productos más amigables con el planeta. Una buena opción para esto es el uso de compuestos de fuentes renovables ya que su empleo no depende económicamente del petróleo ni de “los puntos calientes” (zonas en guerra). Además, ayuda a mitigar la acumulación de CO₂ en la atmósfera, dado que este gas de efecto invernadero es empleado por la biomasa a través de la fotosíntesis para su crecimiento²⁶ volviendo a las fuentes renovables menos nocivas para nuestro planeta. Asimismo, los

nuevos disolventes que se buscan para remplazar los tradicionales deben de tener una baja toxicidad, una baja presión de vapor, una baja solubilidad en agua y una alta viscosidad con el fin de ser atomizado con facilidad.²³ En este sentido, el biodiesel es uno de los disolventes que cumple con estas características. Este se obtiene tanto de aceites vegetales como de grasa animal y puede ser producido utilizando distintas técnicas. Igualmente, se puede producir a partir de la reutilización de aceites para el consumo humano.^{25,27} También, se ha descubierto que el biodiesel incrementa el porcentaje de penetración de algunos IAs en el tejido vegetal, mejorando así la eficiencia en el control de las plagas.²⁸ Además, este disolvente ya ha sido estudiado en la formulación de un insecticida cuyo IA es la cihalotrina presentando resultados positivos.²⁴

Otro de los puntos a favor del biodiesel es que durante su producción se genera glicerina en una relación molar de 3:1.²⁹ Este subproducto es uno de los auxiliares más comunes a la hora de desarrollar la formulación de un pesticida. Dado que es un producto no tóxico, que sirve como un humectante que aumenta el tiempo de secado de una solución rociada.³⁰ Además, al poseer un bajo precio su inclusión dentro de una formulación no debería de representar una limitación económica.³¹

Por lo tanto, el objetivo general de este Proyecto Final de Graduación es desarrollar una formulación insecticida utilizando materias primas de origen renovable. Para lograrlo se propone determinar un sistema de co-disolventes adecuado para la formulación del insecticida y el desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de los ingredientes activos y estudio de la estabilidad.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos.

Las pruebas de estabilidad se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 5890 serie II, provisto de una columna SH-Rxi-5Sil MS (30 m x 0,25 mmID; 0,25 μ m df) y un detector FID. Se trabajó a una presión de 12 psi, el puerto de inyección y el detector se mantuvieron a 200 °C y el programa de temperaturas fue: 80 °C (5 min), 25 °C/min, 200 °C (10 min), el gas de arrastre fue nitrógeno. El equipo ultrasónico es marca Cole-Parmer 8893, se trabajó con tiempos de 40 minutos. La espectrometría de masas se realizó en un equipo Shimadzu, equipado con una columna SH-Rxi-5Sil MS (30 m x 0,25 mmID; 0,25 μ m df) y con un detector GCMS-QP2010SE, la presión empleada fue de 55,5 kPa, el inyector se mantuvo a 200 °C y el programa de temperaturas fue: 80 °C (5 min), 25 °C/min, 200 °C (10 min). La estufa utilizada es de la marca Blue M modelo SW-11TA.

El biodiésel de la Escuela de Química fue donado por la Sección de Química Orgánica de la Escuela de Química. El limoneno al 100%, el acetato de etilo y el ácido oleico son de la casa Merk, el biodiésel (B-Eco) es de la marca Energías Biodegradables, el Tween 80® y el Tween 20® se adquirieron del proveedor Químicas Macías, el α -pineno al 100% es de la casa Kodak, el 2-fenoxietanol es de Riedel-de Haën, el octadecano de la casa comercial Aldrich y el diclorometano de OmniSolv.

2.2. Determinación del HLB del biodiesel.

Se realizó 3 baterías de HLB cuyo valor varía entre 4 y 14. Se pesó en viales las mezclas (cuadros I, II y III), se colocaron en un baño maría hasta fundir los componentes, se agitaron y se dejaron en reposo 24 horas.

Cuadro I. Masa de Tween 80[®] y monoestearato usadas para la determinación del HLB.

Masa de Tween 80 [®] (g)	0,00	2,01	3,52	5,51	7,50	9,04
Masa de monoestearato (g)	10,12	8,18	6,52	4,51	2,58	1,14
HLB de la mezcla	3,80	6,01	7,73	9,96	12,13	13,75

Cuadro II. Masa de Tween 20[®] y monoestearato usadas para la determinación del HLB.

Masa de Tween 20 [®] (g)	0,54	2,00	3,55	5,48	6,51	8,00
Masa de monoestearato (g)	9,57	8,02	6,54	4,58	3,49	2,04
HLB de la mezcla	4,49	6,37	8,34	10,83	12,20	14,08

Cuadro III. Masa de aceite de ricino y monoestearato usadas para la determinación del HLB.

Masa de aceite de ricino (g)	0,54	2,03	3,51	5,02	7,00	8,50
Masa de monoestearato (g)	9,48	8,03	6,48	4,93	2,93	1,47
HLB de la mezcla	4,46	6,26	8,09	9,96	12,40	14,20

Se tomó aproximadamente 1 g de las mezclas de Tween 80[®]-monoestereato descritas anteriormente y se mezclaron con aproximadamente 1 g de biodiesel. Se colocaron todas las muestras en un baño maría, se homogenizaron y se dejaron en reposo durante un día. Posteriormente se les agregó a los viales 2000 µL más de biodiesel, se calentaron en un baño maría y se dejaron en reposo durante una noche. Este mismo procedimiento se repitió con biodiesel marca BioAditivos.

2.3. Diagrama ternario (tensoactivos-biodiesel-agua).

Mediante una hoja de cálculos en Excel y variando las cantidades de los componentes tal como se explica a continuación se realizó un diagrama ternario.

2.3.1. Variando la cantidad de agua.

Se colocó en 10 viales distintos las cantidades de agua descritas en el cuadro IV, se colocó en un baño maría y se dejó reposar durante 24 h.

Cuadro IV. Masas para la determinación del diagrama ternario variando el agua.

# vial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Masa MTW80(g)	1,03	1,00	1,05	1,01	1,06	0,96	0,98	1,02	1,01	1,00
Masa B-Eco (g)	1,12	1,00	1,11	1,16	1,00	1,01	1,01	1,15	0,98	1,02
Masa agua (g)	1,02	2,00	3,02	4,02	5,02	6,28	7,02	8,01	12,03	18,00

2.3.2. Variando la cantidad de B-Eco.

Se colocó en 9 viales distintos las cantidades descritas en el cuadro V, se colocó en un baño maría y se dejó reposar durante 24 h.

Cuadro V. Masas para la formación del diagrama ternario variando el B-Eco.

# vial	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Masa MTW80 (g)	1,02	1,08	0,97	0,97	0,98	1,04	1,04	1,07	1,03
Masa B-Eco (g)	2,01	3,02	4,03	5,02	5,99	7,37	8,01	12,06	18,03
Masa agua (g)	1,02	0,98	1,01	1,07	1,06	0,99	1,02	1,02	1,01

2.4. Optimización de la formulación.

2.3.1. ¿El orden de la materia prima altera el producto?

Se pesaron las masas abajo descritas y se aplicaron dos procedimientos distintos:

Del vial 1 al 5: Se pesó el MTW80 y el B-Eco, se calentó en un baño maría, se agitó y se le agregó el agua mezclándolo bien.

Del vial 6 al 10: Se pesó el MTW80 y el agua, se calentó en un baño maría, se agitó y se le agregó el B-Eco mezclándolo bien.

Todos los viales se dejaron reposar durante un periodo de 24 horas. El vial número 9 de la sección anterior (4.3 Diagrama ternario) pasa a ser en esta sección el vial número 5.

Cuadro VI. Masas para el estudio del orden de los productos en la formulación.

Agregando primero el biodiesel					
# vial	1	2	3	4	5
Masa MTW80 (g)	1,08	1,00	1,00	0,99	1,01
Masa B-Eco (g)	1,32	1,83	2,33	2,83	0,98
Masa agua (g)	11,81	11,32	10,92	10,29	12,03
Agregando primero el agua					
# vial	6	7	8	9	10
Masa MTW80 (g)	1,06	1,07	0,97	1,01	1,02
Masa B-Eco (g)	1,30	1,82	2,28	2,80	1,01
Masa agua (g)	11,82	11,30	10,93	10,33	12,04

2.3.2. Grado de separación.

Se preparó 100 g de la formulación cuyas en proporciones equivalentes a las del vial 3.

Para eso se pesó 7,04 g de MTW80; 16,36 g de B-Eco, se calentó en un baño maría y se

agregó 76,62 g de agua, se agitó y se colocó en una probeta de 100 mL. Se midió el grado de separación según el tiempo, ver cuadro VIII.

Cuadro VIII. Resultados del estudio del grado de separación en función del tiempo.

Tiempo transcurrido (horas)	0	1	17	24
Fase separada (cm)	0,0	0,1	0,2	0,3
Altura total (cm)	17,0	17,0	17,0	17,0
% Separación	0,0	0,6	1,2	1,8

2.3.3. Optimización de los tensoactivos.

Se realizó tres nuevas formulaciones en las que se varió la cantidad de tensoactivo. Se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior, en el que se pesa la MTW80, el biodiesel, se calienta y se agrega el agua agitando.

Cuadro IX. Masas medidas para la optimización de la cantidad de tensoactivos.

Nombre	8% m/m	9% m/m	10% m/m
Masa MTW80 (g)	8,07	9,03	10,01
Masa B-Eco (g)	16,02	16,07	16,25
Masa agua (g)	76,02	75,03	74,06

2.3.4. Formulación final con los ingredientes activos.

Se preparó en un balón aforado de 100,0 mL una disolución de 0,4291 g limoneno y 0,8213 g de α -pineno, el disolvente empleado fue B-Eco, a esta disolución se le llamó madre de B-Eco + IAs.

Se realizó un lote del insecticida siguiendo el procedimiento ya descrito en apartado 4.4.2 y las masas del cuadro X.

Cuadro X. Masas para la primera prueba del formulado con los IAs.

Materia prima	Masa (g)
MTW80	16,16
Madre B-Eco + IAs	31,36
2-fenoxietanol	0,21
Agua	153,09

Se realizó un nuevo lote de 200 g con las cantidades del cuadro XI y se le agregó 5 mL de etanol.

Cuadro XI. Masas para la segunda prueba del formulado con los IAs.

Materia prima	Masa (g)
MTW80	16,12
Madre B-Eco + IAs	32,04
2-fenoxietanol	1,02
Agua	162,00

Se formuló 200 g con las cantidades del cuadro XII.

Cuadro XII. Masas para la tercera prueba del formulado con los IAs.

Materia prima	Masa (g)
MTW80	8,68
Madre B-Eco + IAs	16,06
2-fenoxietanol	1,01
Agua	161,53

2.5. Pruebas de estabilidad del formulado.

2.5.1. Preparación de las muestras.

Se preparó una disolución madre de los IAs colocando en un balón de 100,0 mL 0,4803 g de limoneno y 0,9466 g de pineno y aforando con B-Eco. Se tomó una alícuota de 10,00

mL de esta disolución, se vertió en otro balón de 100,0 mL y se aforó de nuevo con B-Eco. A esta dilución se le llamó B-Eco+ IAs. Seguidamente, se realizó el lote con las masas descritas en el cuadro XIII.

Cuadro XIII. Masas del lote para las pruebas de estabilidad del RTU.

Materia prima	Masa (g)
MTW80	9,50
Madre B-Eco + IAs	17,1356
2-fenoxietanol	1,01
Agua	174,58

Se colocó en viales aproximadamente 10 g de la formulación preparada anteriormente. La mitad de los viales fueron colocados en una gaveta mientras que la otra mitad se colocó en una estufa a 44 °C, esta temperatura se corroboró a todo lo largo de la prueba, ver **Figura A.4**. El siguiente cuadro muestra las masas exactas que se colocaron en cada vial. Las muestras en la gaveta se llamaron custodia y se les colocó como código la letra C, a las que se encuentran en la estufa se les colocó el código T.

Cuadro XIV. Masas de las muestras de la formulación para las pruebas de estabilidad.

Número de vial	Masa de las muestras C (g)	Masa de las muestras T (g)
1	10,0672	9,8578
2	9,9790	10,1673
3	9,8835	10,0098
4	10,1922	9,7748
5	9,6736	9,7519
6	10,0424	9,6284
7	10,0101	9,4692

2.5.2. Preparación de los patrones.

Usando diclorometano como disolvente se preparó dos disoluciones concentradas en balones de 100,0 mL. En la primera se colocó 0,2061 g de limoneno y 0,4060 g de pineno, a la segunda se le agregó 0,2124 g de octadecano. A partir de las dos disoluciones anteriores se preparó 5 patrones de 10,00 mL cada uno y cuyas concentraciones variaron entre 60 mg/L y 120 mg/L de pineno, 30 mg/L y 100 mg/L de limoneno, el cuadro XV describe los volúmenes que fueron agregados de cada una de las disoluciones según el patrón. Se empleó diclorometano como disolvente.

Cuadro XV. Volúmenes empleados en para la preparación de los patrones.

Patrón	Disolución madre de limoneno y de pineno (μL)	Disolución madre octadecano (μL)
1	150	250
2	250	250
3	350	250
4	425	250
5	500	250

2.5.3. Análisis de las muestras.

Se trasvasó cuantitativamente la muestra C1 a un embudo separador utilizando diclorometano para los lavados. Se separó la fase orgánica de la acuosa. La fase con diclorometano se llevó a un balón de 25,0 mL y se aforó. Se inyectó 1 μL de esta dilución en el cromatógrafo de gases.

2.5.4. Pruebas de extracción.

Se realizó 200 g de con las mismas proporciones que la formulación final del RTU. Y se aplicaron distintas pruebas:

Fresca: A 10,0035 g del preparado se le agregó 10 mL de diclorometano y se extrajo.

Sal: Se tomó 10,0137 g del preparado, se le agregó 5 mL de salmuera y 10 mL de diclorometano y se extrajo.

Ultrasonido: Se colocó 10,0159 g de la formulación con 10 mL de diclorometano en un baño ultrasónico por 40 minutos.

Sal + Ultrasonido: A 10,0139 g de la formulación se le agregó 5 mL de salmuera, 10 mL de diclorometano y se colocó en el baño ultrasónico por 40 minutos.

Acetato de etilo: Se le agregó 10,0239 g de la formulación 20 mL de acetato de etilo y 5 mL de salmuera y se extrajo. Además, se realizó un patrón de 50 mg/L de limoneno y octadecano y 100 mg/L de pineno con acetato de etilo como disolvente.

Tolueno: A 10,0139 g de la formulación se le agregó 5 mL de salmuera, 10 mL de diclorometano y se colocó en el baño ultrasónico por 40 minutos. Se realizó un patrón de 50 mg/L de limoneno y octadecano y 100 mg/L de pineno con tolueno como disolvente.

2.6. Concentrado emulsificable.

2.6.1. Formulación del concentrado emulsificable.

Se probó con distintas formulaciones para los concentrados, las masas se pueden observar en el cuadro XVI. Para esto se pesó el biodiesel, los tensoactivos, se calentó en un baño maría y se agregó el 2-fenoxietanol.

Cuadro XVI. Cantidades de las materias primas empleadas según cada concentrado.

Materia prima	Masa (g)
Concentrado 1	
MTW80	10,25
Madre B-Eco + IAs	4,39
2-fenoxietanol	0,50
B-Eco	73,15
Concentrado 2	
MTW80	27,51
B-Eco + IAs	49,51
2-fenoxietanol	3,31
Concentrado 3	
Tween 80 ®	10,02
B-Eco	87,22
Limoneno	0,6122
Pineno	1,0161
2-fenoxietanol	0,53
Concentrado 4	
Tween 80 ®	9,04
Ácido oleico	1,41
Limoneno	0,5584
Pineno	1,0244
B-Eco	69,50
2-fenoxietanol	0,58
Concentrado 5	
Tween 80 ®	13,55
Ácido oleico	1,54
B-Eco	69,58
Limoneno	0,5185
Pineno	1,0289
2-fenoxietanol	0,56

2.6.2. Pruebas de estabilidad.

Para la curva de calibración empleada se siguió el mismo procedimiento que en la sección 4.5.2 Preparación de los patrones. El procedimiento para el análisis de las pruebas fue el siguiente: Se pesó aproximadamente 1 g de la muestra, se colocó en un balón de 25,00 mL, se le agregó 1250 μ L de la disolución concentrada de octadecano, se aforó con diclorometano y se inyectó 1 μ L en el cromatógrafo de gases.

2.7. Pruebas de efectividad realizadas en el laboratorio.

Se colocó en 6 beakers a temperatura ambiente 300 mL de agua con larvas de *Aedes Aegypti*. A tres de los beakers se le agregó adicionalmente 3 mL del concentrado y se comenzó a medir el tiempo en que estas mueren. Se tomó como muertas las larvas cuando perdieron su movilidad y se depositaron en el fondo del recipiente.³²

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los insecticidas “*ready-to-use*” (RTU) o listos para usarse son aquellos que, como su nombre lo dice, no necesitan una dilución previa para su uso y se pueden aplicar inmediatamente.³³ Éstos consisten en una pequeña cantidad del ingrediente activo disuelto en un solvente orgánico,³³ generalmente se forman emulsiones de los solventes con agua es decir emulsiones de aceite en agua u “*oil in water*” (O/W). Por lo que, para realizar este larvicida es importante determinar inicialmente el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB por sus siglas en inglés) del biodiesel dada la inmiscibilidad del agua y del biodiesel que obliga a la utilización de tensoactivos. Dicha determinación se puede realizar de dos maneras:

-Teóricamente: Es necesario conocer la naturaleza de los componentes de la mezcla y con base en tablas ya estudiadas se calcula el HLB resultante aplicando la ecuación 1.³⁴

$$HLB = \sum (\% m/m_n * HLB_n). \quad (1)$$

Por ejemplo, una mezcla de 70% m/m de Tween 80® (HLB=15) y 30% m/m Span 80® (HLB=4,3).³⁴

$$HLB_{mezcla} = 70\% m/m * 15 + 30\% m/m * 4,3 = 11,8$$

-Experimentalmente: Se analiza la relación óptima de dos tensoactivos en la cual un aceite genera la mejor emulsión. Por lo tanto, el HLB de la relación óptima obtenida es el HLB requerido para el aceite y se calcula mediante la ecuación 2,^{35,36} quien deriva de la ecuación 1. Se toma W_n como el peso del compuesto.

$$HLB_{aceite} = \frac{\sum W_n * HLB_n}{\sum W_n} \quad (2)$$

En este proyecto, se empleó el segundo método para determinar el HLB requerido del biodiesel. Para esto se realizó una batería de HLB, es decir, una serie de distintas relaciones entre los tensoactivos que varían de 4 a 14 en su valor de HLB y, en este caso, adicionalmente se usó distintas mezclas de surfactantes siendo éstas las siguientes: monoestearato de glicerilo - Tween 80®, monoestearato - Tween 20® y monoestearato - aceite de ricino. Un tensoactivo hidrófilo y uno lipófilo es la mezcla más eficiente a la hora de realizar una formulación³⁶ es por este motivo que se eligió el monoestearato (hidrófilo) junto con su contraparte lipófila como lo es el aceite de ricino, el Tween 80® o el Tween 20®. Por otro lado, las relaciones de monoestearato:emulsificante complementario que aseguran el rango de HLB deseado fueron las siguiente: 1:0, 4:1, 1:2, 1:1, 1:3 y 1:9 para el Tween 80® y para el aceite de ricino y el Tween 20® las relaciones empleadas fueron: 19:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:4. En la **Figura 2-1** se puede apreciar una fotografía de una de las baterías realizadas para la determinación del HLB requerido, asimismo, se observa que el resultado es una mezcla homogénea, de color blancuzco y sólida en el caso el Tween 80®, para el Tween 20® sucede lo mismo.

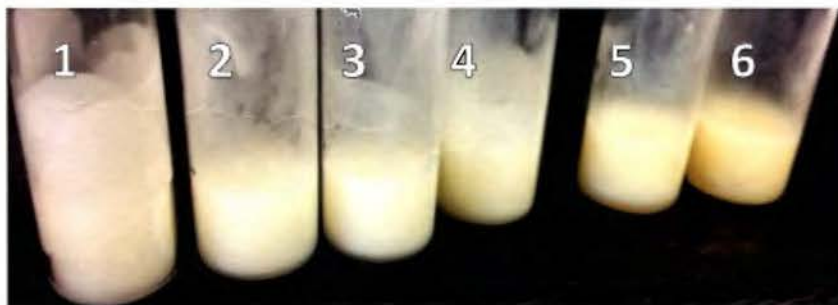


Figura 3-1 Batería de HLB realizada con monoesterato y Tween 80®.

Una vez transcurridas 24 horas desde la formación de las mezclas y analizar los resultados observados, se seleccionó la batería de la mezcla monoestearato -Tween 80® dado que la mezcla con el aceite de ricino se separó y la mezcla con el Tween 80® es un semisólido haciendo más fácil su manipulación, contrariamente al sólido obtenido para el Tween 20®. Seguidamente, se analizó la relación máxima por lo que se tomaron masas iguales de la mezcla de surfactantes y de biodiesel suministrado por la Escuela de Química, se mezclaron y se dejaron en reposo durante otras 24 horas, al no separarse ninguna de las muestras se le agregó 2000 µL más de biodiesel. Se realizó este mismo procedimiento para el biodiesel marca Energías Biodegradables (llamado de ahora en adelante como B-Eco), al ser la muestra del vial 6 la única en no separarse ni estar en su estado sólido se determinó, en ambos casos de biodiesel, que el HLB requerido del biodiesel es de 14, a continuación se le seguirá llamando MTW80 a la mezcla monoestearato-Tween 80® en una relación 1:9 la cual es de un color amarillento y su textura es similar a la de la mantequilla. A partir de este punto se trabajó únicamente con el biodiesel B-Eco, dado que el biodiesel de la Escuela de Química estaba contaminado con jabón y presentaba dos fases (**Figura 2-2**). Esta condición puede atribuirse a la mala implementación del método de preparación de este compuesto. El biodiesel B-Eco por su parte es mayoritariamente palmitato de metilo, ver **Figura A-1**.



Figura 3-2 Fotografía del biodiesel de la Escuela de Química.

Posterior a la determinación del HLB, se realizó un diagrama ternario con el fin de determinar la o las zonas donde se forman una emulsión estable con los tres componentes principales de la formulación, es decir: agua, biodiesel y los tensoactivos. Con esta finalidad, se realizó una serie de pruebas variando tanto el porcentaje de agua como el porcentaje de biodiesel; el porcentaje de surfactantes no se varió dado que no es económicamente provechoso para una formulación tener altos porcentajes de este último componente.

Al variar las cantidades de agua se presentó en los viales 1 y 2 un sólido, ese se debe a la alta cantidad de tensoactivos presentes ambos viales, siendo de 33% m/m y 25% m/m respectivamente. Al ser la mezcla MT80 un sólido y al haber un alto porcentaje de emulsificantes, los líquidos que se agregan solo ablandan un poco la mezcla formando así una emulsión de textura parecida a la mayonesa. En los viales del 3 al 7 se presentó una separación de fase, señalada con una flecha, debido a que no se alcanzó el equilibrio hidrófilo-lipófilo requerido por lo que de un lado se tiene el agua con algunos surfactantes y del otro el aceite con el resto de los tensoactivos, tal como se observa en la **Figura 2-3**. Los tres siguientes viales (8, 9 y 10) sí alcanzaron el equilibrio y presentan una sola fase.

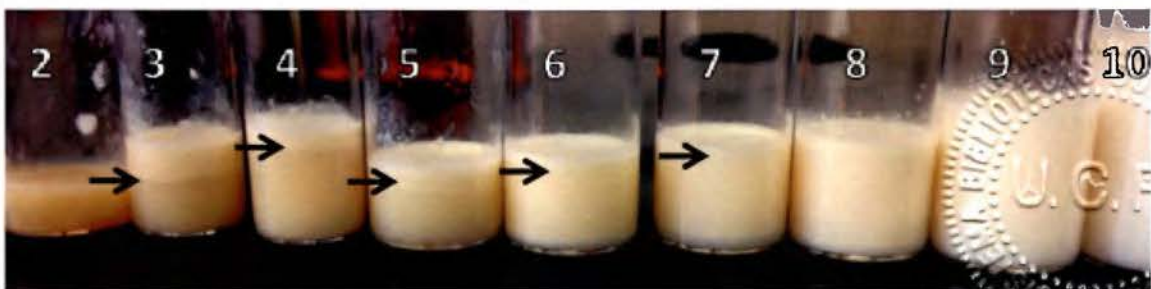


Figura 3-3 Fotografía del resultado de la prueba “Variando la cantidad de agua”.

Por su parte, al variar la cantidad de biodiesel se obtuvo en los primeros cuatro viales un sólido (11-14 de la **Figura 2-4**), reflejando un alto porcentaje de surfactantes como en el caso anterior. Los cinco viales restantes presentaron dos fases, señalando una separación entre una parte del biodiesel y una emulsión inversa, dónde al haber tanto biodiesel la emulsión en lugar de ser de aceite en agua es de agua en aceite. Estos resultados reflejan que se ocupa una baja proporción de biodiesel dentro de la formulación, siendo esto ventajoso económicamente ya que disminuye los costos de producción dado el bajo costo del agua en comparación a otros solventes, por ejemplo: el agua tiene un valor de 1,70 CRC/L³⁷ mientras que el biodiesel 790 CRC/L.



Figura 3-4 Fotografía del resultado de la prueba “Variando la cantidad de B-Eco”.

Por consiguiente, con los datos obtenidos de las dos pruebas antes estudiadas se pudo realizar un diagrama ternario (**Figura 2-5**) y con ayuda de este último analizar la zona en la que la formulación tendría una sola fase. Se aprecia que, para obtener un larvicida con una única fase, es necesario menos de un 20% m/m de biodiesel, menos de un 10 % m/m de tensoactivos y más de un 70 % m/m de agua. Estas proporciones son beneficiosas en

términos monetarios, como ya se mencionó, la materia prima más barata es el agua y al ser esta la predominante en la formulación disminuye los costos de producción. A partir de estos datos, se realizó una optimización de la formulación y los resultados se fueron agregando al diagrama ternario con el fin de tener un panorama más amplio, es por este motivo que la figura 11 presenta más de 19 puntos.

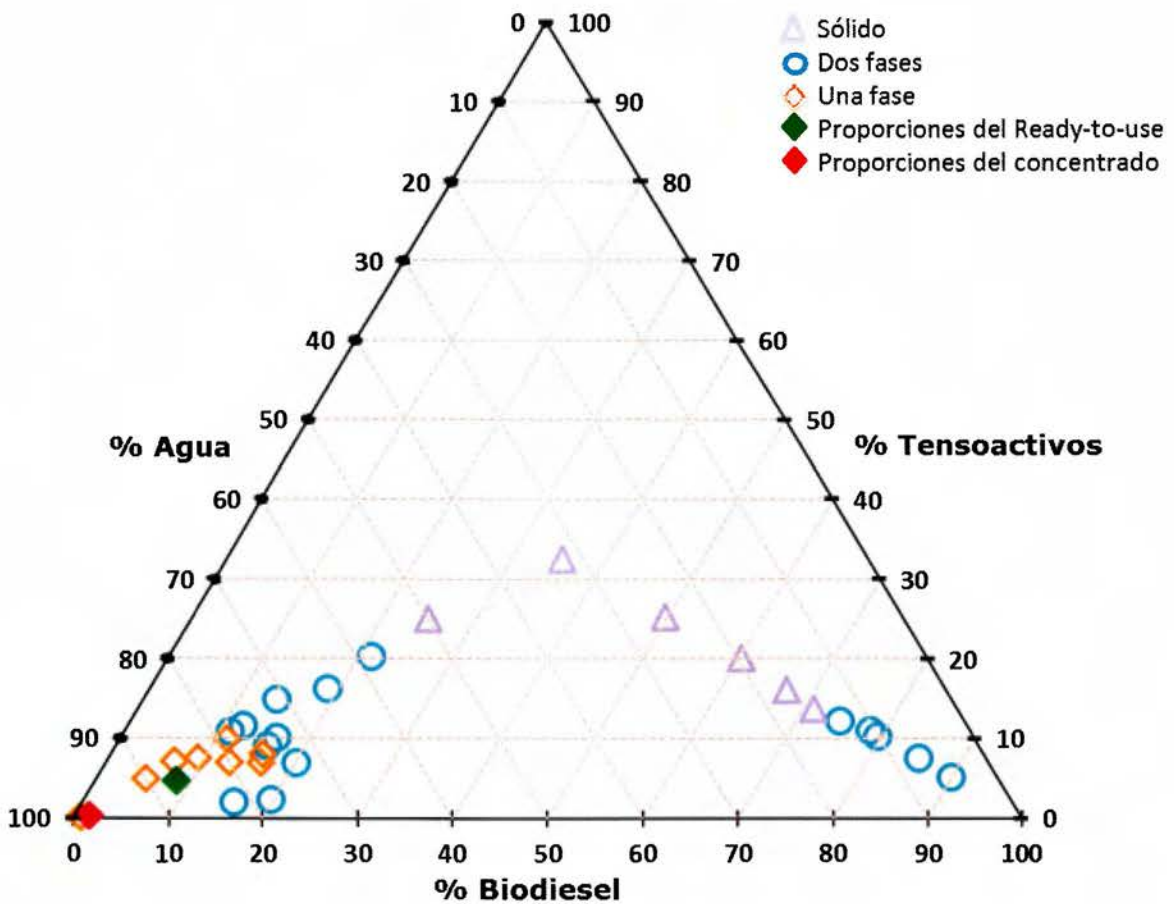


Figura 3-5 Diagrama ternario biodiesel-agua-surfactantes para la formulación del larvicida.

Si se comparan los datos obtenidos con los de otras formulaciones en el mercado, como por ejemplo el Raid todo insecto aerosol^{®38} (Figura 2-6) se constata que en la

formulación propuesta se emplea aproximadamente la mitad del vehículo, el Raid emplea entre un 40% m/m y un 60 % m/m de vehículo mientras que en el larvicida se utilizaría máximo un 20% de este. Lo cual se ve reflejado en una baja de los costos del producto respecto a este componente, además, de ser más amigable con el ambiente dado el uso de biodiesel y agua.

HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD

Fecha de emisión : Mayo 2007

RAID TODO INSECTO, AEROSOL

CODIGO : 609445

Clasificación Peligro

- 4.- Muy Alta
- 3.-Alta
- 2.-Moderada
- 1.-Ligera
- 0.-Insignificante



Sección 2 : COMPOSICIÓN / INGREDIENTES			
Naturaleza Química Ingredientes / Componentes			
NºCAS	INGREDIENTE	PESO (%)	LIMITE EXPOSICION
7696-12-0	Tetrametrina	< 0.5	No establecido
52645-53-1	Permetrina	< 0.5	No establecido
584-79-2	d- Aletrina	< 0.5	No establecido
	Hidrocarburo Isoparafínico, solvente	40 - 60	100 ppm TWA (solvente stodar)
	Mezcla de Hidrocarburos Propelente	40 - 60	1000 ppm OSHA

Figura 3-6 Composición del RAID todo insecto, aerosol®.

Durante la optimización de la formulación se estudió el orden en que la materia prima se añade con la pregunta ¿el orden de los factores altera el producto? Para llegar a la respuesta de esta interrogante se realizó cinco parejas de proporciones diferentes siendo los viales que poseen las mismas proporciones los siguientes: 1 y 6; 2 y 7; 3 y 8; 4 y 9 y finalmente 5 con 10. Entre cada pareja la variación consiste en el orden de los reactivos: Para los cinco primeros viales se agregó primero el biodiesel junto con los tensoactivos y

luego el agua; mientras que, para el resto de los viales se agregó primero el agua y luego el biodiesel. La **Figura 2-7** muestra claramente que en este caso el orden de los factores sí altera el producto, las muestras a las cuales se les agregó agua de primero se separaron inmediatamente, mientras que las muestras a las cuales se les agregó el biodiesel primero no se separaron luego de 24 horas a pesar de que las proporciones variaban. Por lo tanto, el procedimiento para realizar la formulación es: Pesar inicialmente el MTW80 y el B-Eco, calentar en un baño maría hasta tener una mezcla homogénea y agregar el agua con agitación constante.

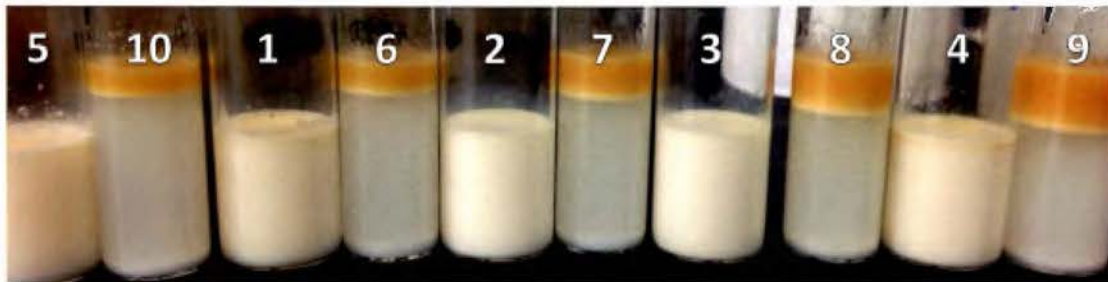


Figura 3-7 Fotografía del estudio del orden de la materia prima en la formulación.

Al realizar la formulación con los porcentajes del vial 3 a una escala mayor y tras un periodo de 24 horas se determinó que el porcentaje de separación de 2 % m/m. Al existir esta pequeña separación se decidió aumentar ligeramente el porcentaje de los surfactantes de 7 % m/m, que sería el porcentaje de tensoactivos con el que se trabajó durante la optimización, a 8 % m/m, 9 % m/m y 10 % m/m. La mezcla con 10% m/m de surfactantes se separó inmediatamente mientras que la mezcla con 9% m/m se separó al día siguiente, se atribuye este fenómeno a la saturación del medio. Por su parte, la mezcla

con 8% m/m de tensoactivos no se separó después de 24 horas. En la **Figura 2-8** se observan estas tres formulaciones al haber transcurrido las 24 horas. Se continuó trabajando con un 8,0% de tensoactivos.

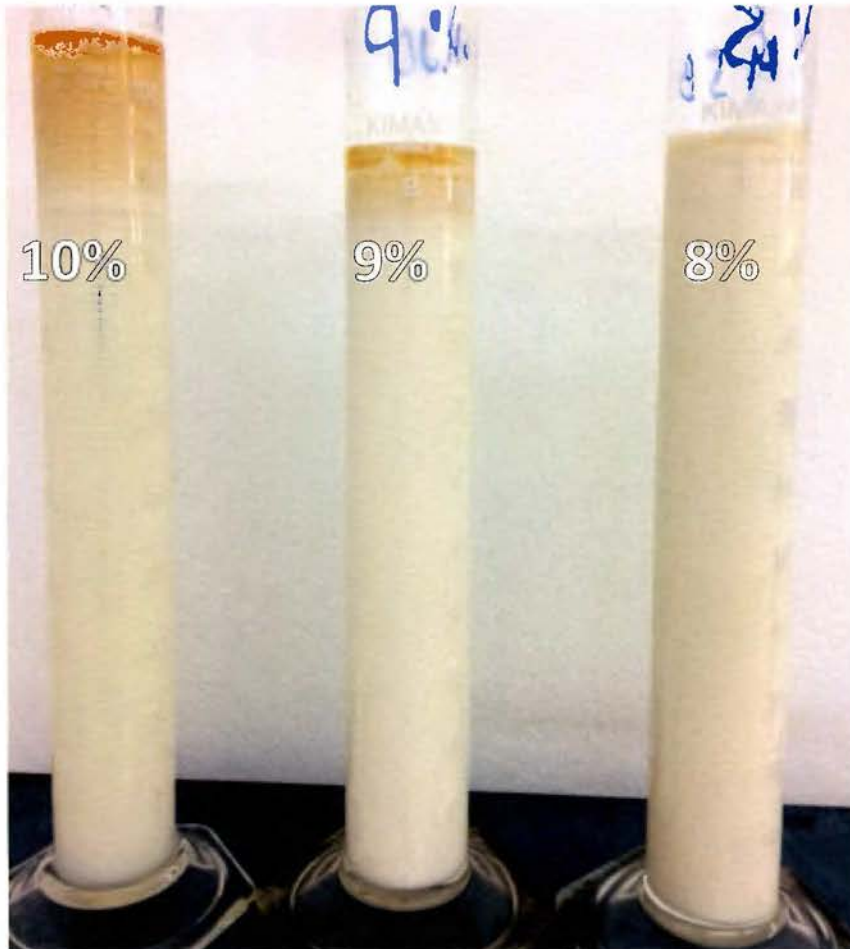


Figura 3-8 Fotografía la optimización de los tensoactivos en la formulación.

Una vez la formulación optimizada se procedió a agregar los ingredientes activos en la formulación, siendo estos solubles en el biodiesel se preparó una disolución de 4291 mg/L de limoneno y 8213 mg/L de una mezcla de α -pineno. Posteriormente se preparó un lote con las siguientes proporciones: 8,0% m/m de MTW80, 16,0% m/m de B-Eco + IAs, 0,1%

m/m de 2-fenoxietanol y 75,9% m/m de agua. Se trabajó con casi 20 veces más de la cantidad deseada en la formulación final de los IAs para observar si se daba alguna separación de los IAs de la formulación, que no se produjo. Además, se agregó el 2-fenoxietanol como un preservante dada su actividad fungicida, sin embargo, a la semana el lote presentó la formación de hongos, por lo que se realizó un nuevo lote con las siguientes proporciones: 8,0% m/m de MTW80, 16,0% m/m de B-Eco + IAs, 0,5% m/m de 2-fenoxietanol y 75,5% m/m de agua. En este nuevo lote ya no se formó hongos, pero sí una separación de las fases. Se continuó formulando con distintos co-disolventes como el etanol y variando la cantidad de agua hasta obtener las proporciones óptimas para la formulación de este larvicida: 5,0% m/m de MTW80, 8,5% m/m de B-Eco + IAs, 0,5% m/m de 2-fenoxietanol y 86 % m/m de agua. En comparación a las proporciones antes obtenidas hay un menor porcentaje de biodiesel y de surfactantes los cuales son las materias primas más caras por lo que, este cambio de formulación se vería reflejado en una baja en el costo del producto final.

Con la formulación finalmente optimizada y funcional se procedió a realizar las pruebas de estabilidad, esta vez con la cantidad deseada de IAs dentro de la formulación, es decir una concentración de 50 mg/L para el limoneno y 100 mg/L de pinenos, siendo estas concentraciones el LC_{50} estimado por Pavela.²⁰ Para llevar a cabo las pruebas se analizó siempre una muestra control la cual se mantenía a temperatura ambiente y se realizó una prueba acelerada en la cual los viales permanecieron en una estufa a 45 °C hasta el final de la prueba, se eligió esta temperatura ya que Costa Rica pertenece a la zona IV: cálida / húmeda.³⁹

Debido a los puntos de fusión del pineno y del limoneno se eligió realizar un análisis por cromatografía de gases con un patrón interno el octadecano cuyo peso molecular y una polaridad similar a los IAs. Además, para disminuir el tiempo del análisis y asegurar una buena resolución de los analitos se configuró una rampa térmica iniciando en 80 °C y terminando en 200 °C. A la semana de haber iniciado con la prueba de estabilidad se midió tanto la curva de calibración como la primera muestra, la cual en la primera inyección presentó áreas muy bajas y por lo tanto una concentración por debajo del límite de detección. En una primera instancia se pensó que había dos causas posibles: descomposición de los IAs o una mala extracción de éstos. La primera hipótesis se rechazó cuando al realizar un nuevo lote y analizarlo inmediatamente, las áreas seguían siendo muy bajas.

La extracción de los ingredientes activos del RTU se realizó para simplificar la matriz del análisis, con dicho fin se empleó diclorometano como disolvente. En la **Figura 2-9** pareciera que dicho disolvente es el adecuado ya que logra romper con la emulsión agua-biodiesel, además, tanto el limoneno como el pineno y el octadecano son solubles en este compuesto. Sin embargo, el resultado del análisis indica lo contrario. Con el fin de lograr romper la emulsión formada y extraer con mayor facilidad los compuestos, se realizaron dos pruebas: a una de las muestras se le agregó una disolución saturada de salmuera que modifica la fuerza iónica en el medio separando las emulsiones y la otra se colocó por 40 minutos en un baño ultrasónico, pese a presentarse una leve mejoría con respecto al primer procedimiento de extracción, ambos métodos están aproximadamente un orden por debajo de lo que deberían de obtenerse, ya que son muestras recién preparadas.

También, se trató con una mezcla de ambos métodos más tuvo el mismo resultado que las pruebas anteriores.



Figura 3-9 Fotografía de la extracción de los analitos en el RTU con diclorometano.

Como mejora para próximos análisis se recomienda también analizar el biodiesel que se separa. Probablemente en esta fase oleosa se encuentran los ingredientes activos, mientras se sospecha que en la otra fase se encuentra el diclorometano junto con una porción de los surfactantes que solubilizan el agua en este disolvente.

A pesar del intento fallido, se demostró que el problema yacía en la extracción de los compuestos, dado que se logró apreciar en el cromatograma un aumento en el área de la mezcla de la salmuera con el ultrasonido, revelando que las moléculas no se habían descompuesto, sino que se encontraban en una muy fuerte emulsión. Se sabe entonces que la solución es realizar una extracción más eficiente de los analitos. Con tal fin se cambió el disolvente empleado y probó con acetato de etilo y tolueno como última

alterativa. Se eligió estos dos disolventes como remplazo dado que son menos nocivos con el ambiente, al degradarse el tolueno genera benzaldehído y posteriormente ácido benzoico,⁴⁰ mientras que el acetato de etilo se degrada en ácido acético. No obstante, estos dos disolventes también obtuvieron resultados negativos. Al ser tan difícil romper la extracción se ve reflejada la robustez de la emulsión formada y el buen funcionamiento de los tensoactivos elegidos. Sin embargo, para evitar dañar el equipo las pruebas de estabilidad no pueden poseer agua, es por esta razón que se decidió realizar un concentrado emulsionable.

Los concentrados poseen como ventaja ante las formulaciones “*ready-to-use*” que son menos costosos en términos de tratamiento por unidad de área, no son abrasivos y son más fáciles de transportar, de almacenar y de manipular.³³ Los concentrados se pueden vender en dos distintas presentaciones, en su forma sólida como por ejemplo los polvos mojables o los polvos solubles y la forma líquida cuyo ejemplo sería un concentrado emulsionable.

La primera formulación tuvo las siguientes proporciones al agregar a 2 mL del concentrado 8 mL de agua: 2,1% m/m MTW80, 15,9% m/m B-Eco, 0,1% m/m fenoxietanol y 81,9% m/m agua. En comparación a la formulación del “*ready-to-use*” se redujo la cantidad de surfactantes y se aumentó la de B-Eco dado que una alta cantidad de tensoactivos podría formar una masa semisólida y no el líquido buscado, sin embargo, la mezcla se separó 24 horas después, probablemente debido a la falta de surfactantes. Si bien es cierto esto no debería de presentar un problema ya que al concentrado se le agregaría agua una vez que se desee usarlo no es lo recomendado, si en algún caso el

usuario desea guardar la formulación restante y esta se separa un día después podría darse una aplicación inadecuada por falta de agitación y homogenización. Es por esas razones que se decidió realizar otros concentrados. También se determinó la eficiencia de este primer concentrado, para lo cual se trabajó con muestras de agua que contenían larvas de *Aedes aegypti* y se les adicionó 3 g del concentrado emulsificable. Al cabo de 2 horas el 100% de la población había muerto reflejando el poder larvicida del producto y que este es funcional, tal como se aprecia en la **Figura 2-10** donde se pueden ver las larvas flotando antes de colocar el concentrado (**Figura 2-10 a.**). Después de 2 horas estas ya no flotan y se encuentran inmóviles en el fondo del beaker, por lo que se toman por muertas (**Figuras 2-10 b.**).

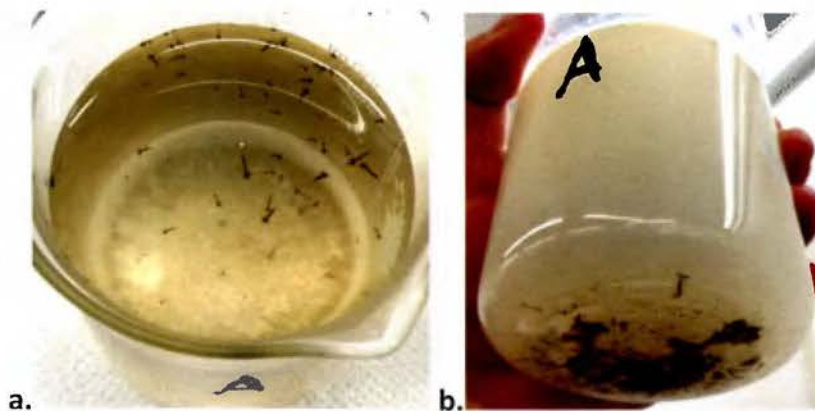


Figura 3-100 Fotografía del estudio de la eficiencia del larvicida. **a.** Antes de agregar el larvicida. **b.** 2 horas después de haber agregado el larvicida.

El segundo concentrado, C_2 , se preparó tal que al agregar 12 mL de agua a 2 mL del concentrado las proporciones quedasen de la siguiente manera: 4,6% m/m MTW80, 8,3% m/m B-Eco, 0,6% m/m fenoxietanol y 86,5% m/m agua; es decir igual a la formulación del

“ready-to-use”. No obstante, el concentrado se separó con la presencia de un sólido en el fondo (**Figura 2-11**), este sólido son los tensoactivos, más específicamente, el monoestearato que es el único sólido presente en la formulación. Se procedió entonces a realizar un concentrado que no tuviese monoesterato (C_3), inicialmente se realizó una formulación con solo Tween 80® dada la similitud de su HLB (15), con el HLB requerido del biodiesel que es de 14. Esta vez el concentrado no se separó, pero la emulsión en agua sí, suponiendo que le faltaba el componente hidrófilo que aportaba el monoestearato se agregó etanol, más se siguió separando la formulación.



Figura 3-111 Fotografía del concentrado C_2 .

Con una guía más clara sobre lo que había que cambiar en la formulación del concentrado, es decir: cambiar el monoestearato de glicerilo por un emulsificante que sea hidrófilo y líquido se consiguió como remplazo el ácido oleico quién posee un HLB de 1 y es líquido. Se preparó el concentrado 4, C_4 , con el ácido oleico y Tween 80® de tal forma que el HLB de la mezcla resultante fuese de 14 y tal como se predijo, esta vez el concentrado presentó una única fase. De igual forma, se aumentó la cantidad de agua añadida, se agregó 100 mL de agua a 1 mL de C_4 con el fin de que el concentrado tenga

una mayor durabilidad y así tener un producto que rinda mucho a un bajo costo. Sin embargo, este se separó ligeramente razón por la cual se aumentó un poco la cantidad de surfactantes y se dobló la cantidad de concentrado que se debe agregar a 100 mL de agua para finalmente dar con el concentrado 5 (C₅). La formulación final del concentrado posee 17,4% m/m de tensoactivos, 0,6% m/m de limoneno, 1,2% m/m de pinenos, 80,3% m/m de B-eco y 0,5% m/m de 2-fenoxietanol.

Al igual que con el RTU se le realizaron pruebas de estabilidad al concentrado, se siguió el mismo procedimiento de las pruebas de estabilidad anteriores, a excepción de la extracción. Las curvas de calibración para el análisis de limoneno y pineno se pueden observar en la **Figura 2-12**, al realizar estas curvas y los análisis de las muestras, se tomó en cuenta los dos picos correspondientes a los dos isómeros del pineno y los tres picos principales correspondientes al limoneno y no solo los picos principales de cada uno como se hizo en las pruebas anteriores. Esta decisión se tomó al ver un aumento considerable de los picos secundarios en las curvas de calibración conforme aumentaba la concentración y que en ciertas ocasiones tenían valores similares de área a las del pico principal.

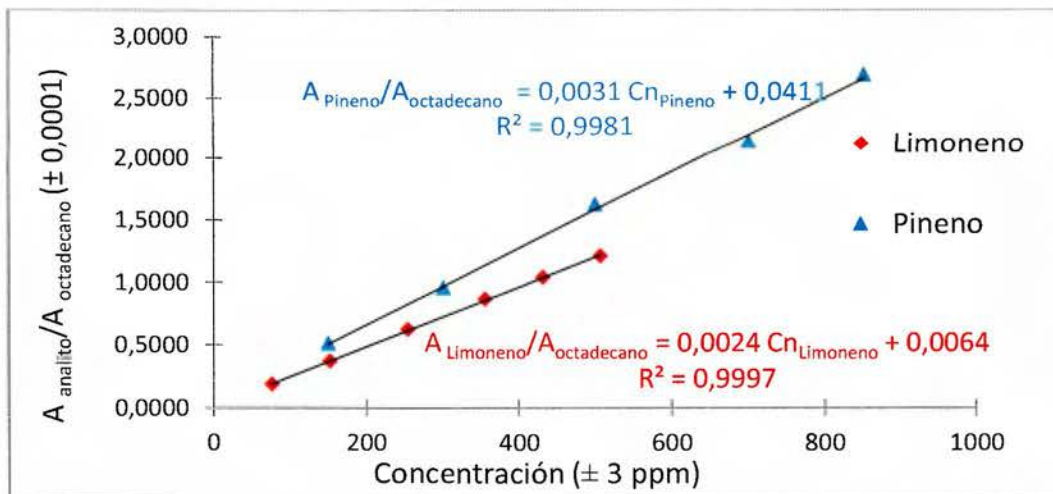


Figura 3-122 Curvas de calibración del limoneno y pineno para las pruebas de estabilidad.

Una vez finalizadas las pruebas de estabilidad se realizó un ajuste de Arrhenius, ecuación 3, con el fin de determinar el tiempo en el que se alcanzaría un 10% de la dosis inicial.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad (3)$$

Donde A_0 es el área inicial, A es el área de la muestra analizada, t es el tiempo y k es una constante que incluye la constante cinética.

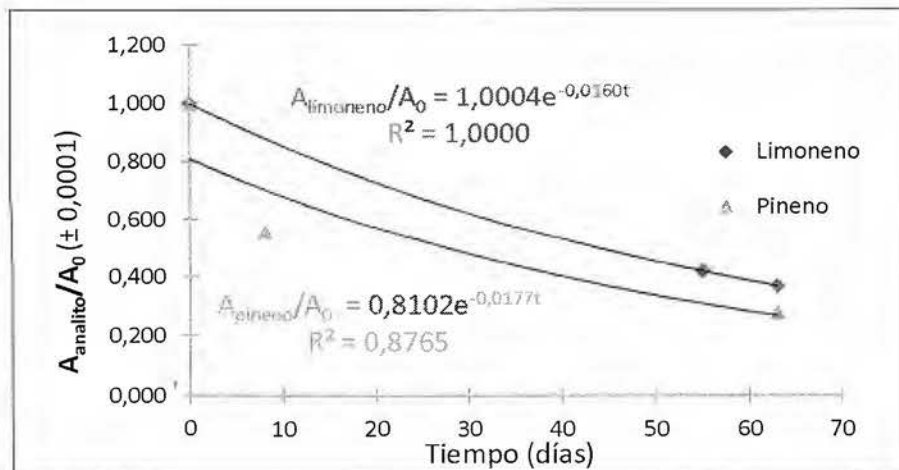


Figura 3-133 Ajuste de Arrhenius de las pruebas de estabilidad para el limoneno y pineno.

Por este método se determinó el tiempo que duraría el concentrado en tener un 10% de las concentraciones iniciales de los ingredientes activos. Mediante un despeje de la ecuación 3 se obtiene la ecuación 4, la cual permite el cálculo de dicho tiempo.

$$t = -\frac{\ln \frac{A}{A_0}}{k} \quad (4)$$

Por lo tanto, el tiempo calculado para que se alcance un 10% de la concentración original es de aproximadamente 4 meses para el pineno y 5 meses para el limoneno. Es importante resaltar que estos ensayos son preliminares y el método es de prueba, por ende, este no está validado. Se recomienda validar el método si se desean resultados más exactos.

Asimismo, las pruebas aceleradas no presentaron cambio durante el periodo del análisis, por lo que no se esperaría ningún cambio físico en el concentrado, sin embargo, estos análisis no siempre predicen estos cambios físicos.⁴¹

4. CONCLUSIONES

Se determinó que el HLB requerido del biodiesel es de 14, mediante este dato se pudo realizar un diagrama ternario el cual indicó las zonas en las cuales la formulación larvicida presenta una sola fase, guiando así su optimización.

Las proporciones encontradas para una buena formulación RTU de un larvicida a base de limoneno y α -pineno con biodiesel como vehículo son: 5,0% m/m de MTW80, 8,5% m/m de B-Eco+ IAs, 0,5% m/m de 2-fenoxietanol y 86,0% m/m de agua.

De igual forma, se determinó que el orden adecuado para realizar la formulación del RTU es pesar en una primera instancia los tensoactivos y el biodiesel con los ingredientes activos ya disueltos en este, calentar y posteriormente agregar el agua. De lo contrario, la mezcla se separará.

Al realizar las pruebas de estabilidad del RTU no se logró separar el limoneno y el α -pineno del biodiesel, a pesar, de haberse tratado con salmuera, ultrasonido y cambiando el disolvente por acetato de etilo o tolueno. Al no ser las pruebas de extracción exitosas se decidió realizar un concentrado emulsificable donde no hay que realizar un proceso de extracción para hacer las pruebas de estabilidad.

El concentrado emulsificable posee 17,4% m/m de tensoactivos, 0,6% m/m de limoneno, 1,2% m/m de pinenos, 80,3% m/m de B-eco y 0,5% m/m de 2-fenoxietanol. Su duración es de aproximadamente 4 meses según las pruebas de estabilidad realizadas. Las pruebas aceleradas predicen que esta formulación no llegará a presentar cambios físicos. Asimismo, al cabo de 2 horas las pruebas preliminares de campo mostraron una eficiencia del 100% del producto al matar a toda la población.

Se propone para realizar una validación del método de análisis de los ingredientes activos. Además, realizar por un periodo más largo y con varias réplicas de cada muestra con el fin de tener resultados más exactos.

De igual forma, es necesario realizar más pruebas de efectividad del producto; tanto de cada uno de los ingredientes activos solos como de un blanco sin los ingredientes activos. Junto con la realización de pruebas de campo, en un ambiente ya no tan controlado como lo es un laboratorio.

Finalmente se propone la realización de estudios de mercado, de costos y el registro del producto con el propósito de lanzarlo al mercado.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) OMS. Enfermedades transmitidas por vectores <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/> (accessed Dec 6, 2017).
- (2) WeatherSTEM. Weather and Mosquitoes <https://learn.weatherstem.com/modules/learn/lessons/132/07.html> (accessed Mar 6, 2018).
- (3) Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Hoti, S. L.; Bhattacharyya, A.; Benelli, G. Eugenol, α -Pinene and β -Caryophyllene from *Plectranthus Barbatus* Essential Oil as Eco-Friendly Larvicides against Malaria, Dengue and Japanese Encephalitis Mosquito Vectors. *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (2).
- (4) Mehlhorn, H.; Al-Rasheid, K. A. S.; Al-Quraishy, S.; Abdel-Ghaffar, F. Research and Increase of Expertise in Arachno-Entomology Are Urgently Needed. *Parasitol. Res.* **2012**, *110* (1), 259–265.
- (5) Murugan, K.; Vadivalagan, C.; Karthika, P.; Panneerselvam, C.; Paulpandi, M.; Subramaniam, J.; Wei, H.; Aziz, A. T.; Alsalhi, M. S.; Devanesan, S.; et al. DNA Barcoding and Molecular Evolution of Mosquito Vectors of Medical and Veterinary Importance. *Parasitol. Res.* **2016**, *115* (1), 107–121.
- (6) OMS. *Respuesta Mundial Para El Control De Vectores 2017–2030*; 2017; Vol. 5.4.
- (7) Shepard, D. S.; Undurraga, E. A.; Halasa, Y. A.; Stanaway, J. D. The Global Economic Burden of Dengue: A Systematic Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16* (8), 935–941.
- (8) Rodriguez, I. Zancudo Hembra Transmisora Del Dengue Se Adapta a Casi Cualquier Área y Clima. San José September 6, 2013.
- (9) Ministerio de Salud de Costa Rica. *Lineamientos Nacionales Para El Control Del Dengue Costa Rica*; Costa Rica, 2010.
- (10) Rodriguez, I. Casas Podrían Estar Llenas de Refugios Para ‘Aedes Aegypti. *La Nación*. August 4, 2014.
- (11) Ministerio de Salud. Salud utiliza bacteria contra el Mosquito que trasmite el Zika <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/noticias/noticias-2016/848-salud-utiliza-bacteria-contra-el-mosquito-que-trasmite-el-zika> (accessed Jan 25, 2018).

- (12) Yao, G.; Jing, X.; Peng, W.; Liu, X.; Zhou, Z.; Liu, D. Chiral Insecticide α -Cypermethrin and Its Metabolites: Stereoselective Degradation Behavior in Soils and the Toxicity to Earthworm *Eisenia Fetida*. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (35), 7714–7720.
- (13) Cox, C. Cypermethrine. *J. Pestic. Reform* **1996**, *16* (2), 15–20.
- (14) Surrallés, J.; Xamena, N.; Creus, A.; Catalán, J.; Norppa, H.; Marcos, R. Induction of Micronuclei by Five Pyrethroid Insecticides in Whole-Blood and Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res. Toxicol.* **1995**, *341* (3), 169–184.
- (15) Amer, S. M.; Aboul-ela, E. I. Cytogenetic Effects of Pesticides. III. Induction of Micronuclei in Mouse Bone Marrow by the Insecticides Cypermethrin and Rotenone. *Mutat. Res. Toxicol.* **1985**, *155* (3), 135–142.
- (16) Caroline, C. Cypermethrine. *J. Pestic. Reform* **1996**, *16* (2), 15–20.
- (17) Ávarez, M. F. Estudio Del Comportamiento Fotoquímico y Determinación de Compuestos Fitosanitarios En Matrices Medioambientales y Agroalimentarias Mediante Técnicas Avanzadas de Extracción y Microextracción, Santiago de Compostela, 2009.
- (18) Jones, D. Environmental fate of cypermethrin <http://cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/cyperm.pdf> (accessed Dec 6, 2017).
- (19) Chowański, S.; Kudlewska, M.; Marciniak, P.; Rosiński, G. Synthetic Insecticides – Is There an Alternative ? *Polish J. Environ.* **2014**, *23* (2), 291–302.
- (20) Pavela, R. Essential Oils for the Development of Eco-Friendly Mosquito Larvicides: A Review. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 174–187.
- (21) Michaelakis, A.; Papachristos, D. Citrus Essential Oils and Four Enantiomeric Pinenes against *Culex Pipiens* (Diptera : Culicidae). **2009**, 769–773.
- (22) Sutthanont, N.; Choochote, W.; Tuetun, B.; Junkum, A.; Jitpakdi, A.; Chaithong, U.; Riyong, D.; Pitasawat, B. *Chemical Composition and Larvicidal Activity of Edible Plant-Derived Essential Oils against the Pyrethroid-Susceptible and -Resistant Strains of *Aedes Aegypti* (Diptera : Culicidae). **2010**, No. June, 106–115.
- (23) Chin, C. P.; Lan, C. W.; Wu, H. S. Application of Biodiesel as Carrier for Insecticide Emulsifiable Concentrate Formulation. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2012**, *43* (4), 578–584.

- (24) Chin, C. P.; Lan, C. W.; Wu, H. S. Study on the Performance of Lambda Cyhalothrin Microemulsion with Biodiesel as an Alternative Solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51* (12), 4710–4718.
- (25) Leung, D. Y. C.; Wu, X.; Leung, M. K. H. A Review on Biodiesel Production Using Catalyzed Transesterification. *Appl. Energy* **2010**, *87* (4), 1083–1095.
- (26) Bozell, J. J. Chemicals and Materials from Renewable Resources. In *American Chemical Society*; ACS: Washington, 2001; pp 1–9.
- (27) Kumar Tiwari, A.; Kumar, A.; Raheman, H. Biodiesel Production from Jatropha Oil (Jatropha Curcas) with High Free Fatty Acids: An Optimized Process. *Biomass and Bioenergy* **2007**, *31* (8), 569–575.
- (28) Liu YQ; Li, Y.; Guo, T.; Liu, F. Preliminary Application of Biodiesel as Substitute Solvent Instead of Quizalofop-P-Ethyl EC. *Chinese J. Pestic. Sci.* **2009**, *11*, 131–136.
- (29) Yang, J.; Xu, C.; Li, B.; Ren, G.; Wang, L. Synthesis and Determination of Biodiesel: An Experiment for High School Chemistry Laboratory BT - Journal of Chemical Education. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90* (10), 1362–1364.
- (30) Elsik, C. M.; Stridde, H. M.; Tann, R. S. Glyphosate Adjuvant Formulation with Glycerin. *J. ASTM Int.* **2014**, *4* (3), 1–6.
- (31) Gu, Y.; Jérôme, F. Glycerol as a Sustainable Solvent for Green Chemistry. *Green Chem.* **2010**, *12* (7), 1127.
- (32) Galavíz, J. D.; Vega, F.; Cupul, F.; Navarrete, J. L.; Ruiz, L. E.; Vargas, M.; Chong, O. Control Químico y Biológico de Larvas de Aedes Aegypti En La Costa Norte de Jalisco, México. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2016**, *68* (2), 111–124.
- (33) Herzfeld, D.; Reppe, E. *Private Pesticide Applicator Training Manual*, 18.3.; Minnesota, 1998.
- (34) ICI Americas Incorporated. *The HLB System a Time-Saving Guide to Emulsifier Selection*; ICI Americas, I., Ed.; ICI Americas Inc: Wilmington, 1976.
- (35) Gadhve, A. Determination of Hydrophilic-Lipophilic Balance Value. *Int. J. Sci. Res.* **2014**, *3* (4), 573–575.

- (36) Griffin, W. Classification of Surface-Active Agents by "HLB." *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, *1*, 311–326.
- (37) ARESEP. Tarifa acueducto AyA 2017-2021 <https://aresep.go.cr/tarifas/tarifas-vigentes/2199-tarifa-acueducto-aya-2017-2021> (accessed Mar 3, 2018).
- (38) S.A, P. MSDS RAID todo insecto, aerosol https://www.prisa.cl/catalog/ficha_products.php?id=87202 (accessed Mar 25, 2018).
- (39) Fonseca, L.; Berrocal, L. *Cinética Química Aplicada a Los Procesos de Descomposición de Los Fármacos*, 1st ed.; Editorial de la Universidad de Costa Rica: San José, 2004.
- (40) Ministerio de Ambiente; Vivienda y Desarrollo Territorial; República de Colombia. *Guía Para Manejo Seguro y Gestión Ambiental de 25 Sustancias Químicas*; 2003.
- (41) ICH Expert Working Group. *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*; 2003.

6. ANEXOS

Anexo 1: Resultados obtenidos de la espectrometría de masas.

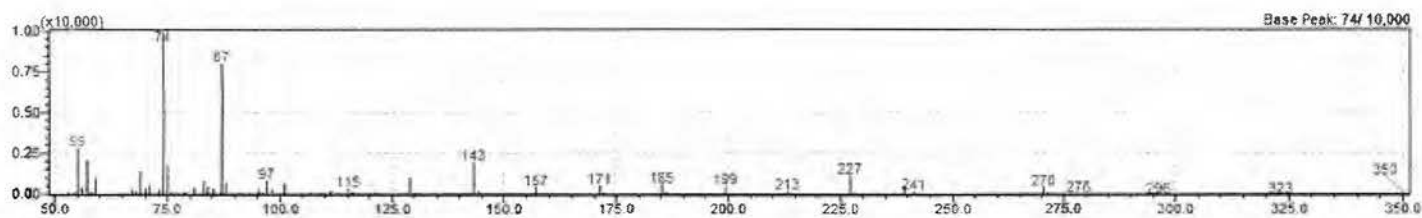


Figura A. 1 Espectro de masas del B-Eco.



Figura A. 2 Espectro de masas del α -pineno.

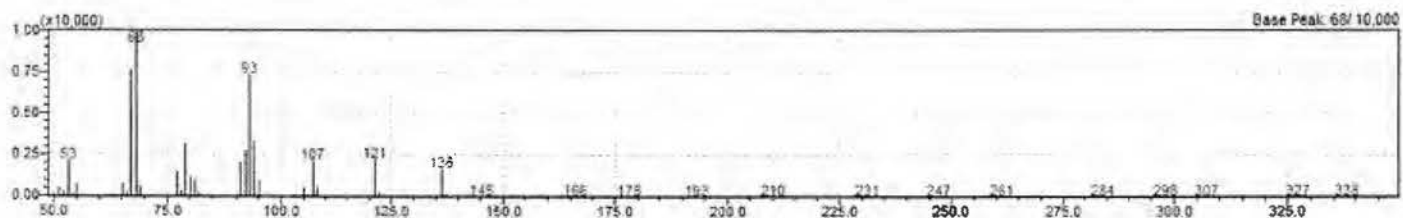


Figura A. 3 Espectro de masas del limoneno.

Anexo 2: Control estabilidad de la estufa durante las pruebas de estabilidad.

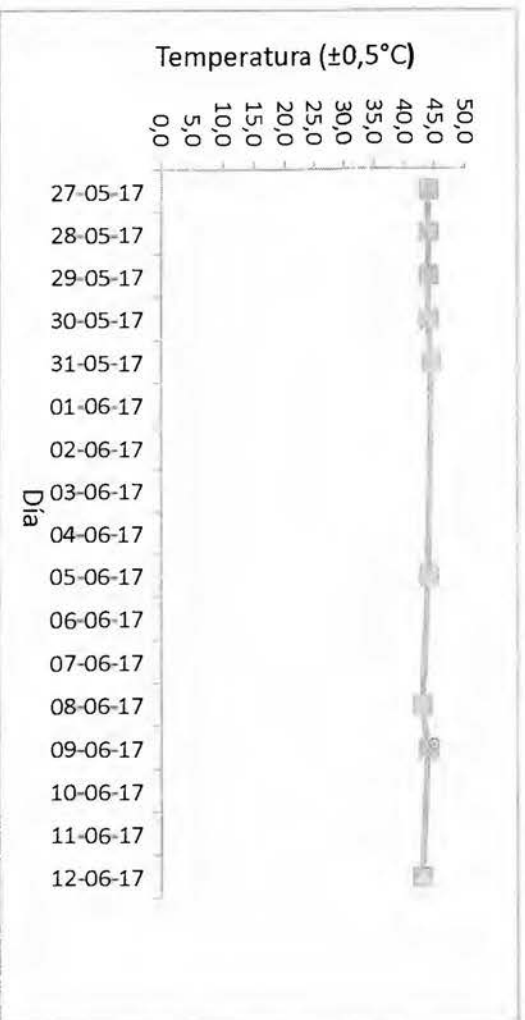


Figura A. 4 Control de la temperatura de la estufa durante las pruebas de estabilidad del RTU.

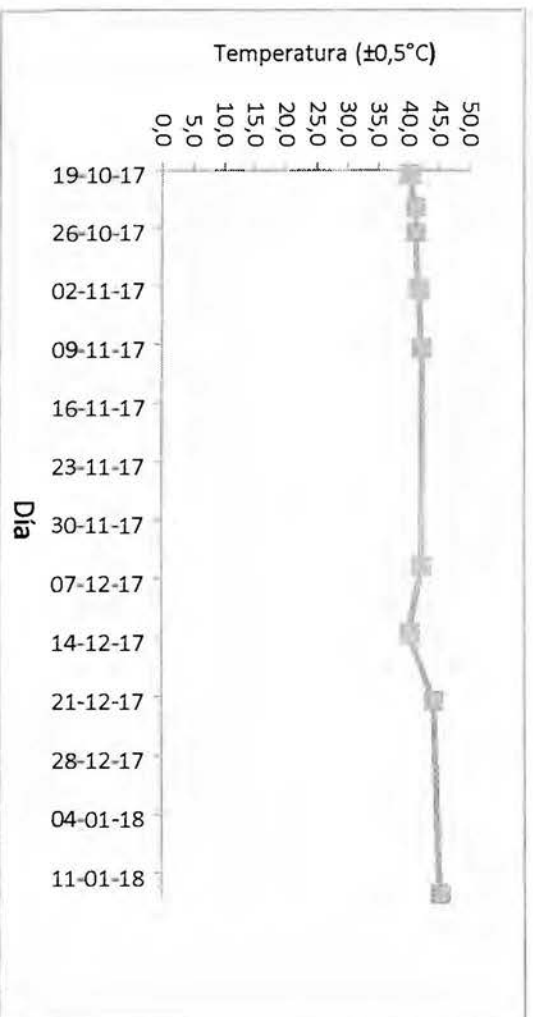


Figura A. 5 Control de la temperatura de la estufa durante las pruebas de estabilidad del concentrado.

Prueba	Muestra	Réplica 1						Réplica 2					
		Pineno 1	Pineno 2	Limoneno 1	Limoneno 2	Limoneno 3	Octadecano	Pineno 1	Pineno 2	Limoneno 1	Limoneno 2	Limoneno 3	Octadecano
R e a d y t o - u s e	Patrón 1	105195,0			24204,7		16301,6	106856,0			24749,3		17547,6
	Patrón 2	13373,6			2823,9		13676,3	13339,4			2837,7		16277,3
	Patrón 3	24767,2			5352,5		15447,6	23236,7			5007,5		15412,1
	Patrón 4	35742,2			7933,6		15416,9	32458,9			7062,9		14497,5
	Patrón 5	40375,1			8857,8		14598,6	40375,1			8857,8		14598,6
	Patrón 6	47000,9			10388,9		13315,4	48070,5			10652,2		14498,3
	Fresca	235,3			28562,7		20047,3	192,9			209953,0		25135,5
	Sal	4576,2			1300,2		14561,5	5907,1			1362,7		20395,4
	Ultrasonido	2781,0			2244,9		17624,1	701,3			356818,0		16580,7
	Sal+ultrasonido	9069,6			2289,9		20709,6	7912,4			1953,9		19035,2
	Patrón EtOAc	22953,0			5352,3		15337,9	24314,0			5736,6		15177,9
Prueba EtOAc	899,1			215,0		*	832,7			201,0		*	
Patrón Tolúeno	36604,6			8663,2		20193,3	34173,5			8025,8		20224,3	
C o n c e n t r a d o	Patrón 1	53794,6	6858,3	3932,7	12257,6	5653,7	119548,0	52973,0	6804,3	3919,5	12056,1	5632,9	119600,0
	Patrón 2	98557,3	13039,4	7368,1	22881,3	10639,9	116267,0	91207,9	12159,7	6790,1	25253,5	9821,1	1093400,0
	Patrón 3	171748,0	22776,9	13485,6	41098,7	19826,7	114577,0	154421,0	20476,7	12003,7	36781,6	17741,2	1132820,0
	Patrón 4	225572,0	30075,6	17819,8	62593,6	26192,1	119987,0	218745,0	29243,4	17202,7	52449,6	25012,1	1152810,0
	Patrón 5	264878,0	35070,8	20741,9	64037,2	30404,1	111994,0	275349,0	36563,8	21578,9	67293,9	31863,5	1153590,0
	Patrón 6	321719,0	42782,4	3365,5	78515,5	37116,0	118803,0	32813,0		25555,7	387,7	37675,4	1177460,0
	CO	77213,9	10818,1	8961,2	25840,1	14158,7	106578,0	114159,0	16211,8	11827,4	37704,6	18814,8	131323,0
	C1	97088,6	13800,2	2605,6	34530,4	2277,9	110946,0	94673,1	13313,8	2106,3	33249,5	2246,0	111872,0
	T1	91009,9	12710,1	7267,8	29335,1	9550,2	107784,0	90593,8	13278,8	7988,7	29513,7	36164,3	109860,0
	C2	79939,5	11390,5	7547,2	26093,3	11471,5	93235,7	80233,7	11539,5	8055,8	26330,2	11712,3	101450,0
	T2	35260,0	5331,1	2588,3	10276,0	3611,2	85953,3	42128,0	6322,7	3774,0	12294,7	3514,1	91334,4
	C3	52320,9	7643,6	3018,1	2757,4	9918,7	82185,5	52320,9	7643,6	3948,6	25757,4	9918,7	82185,5
	T3	71941,9	10286,8	5757,4	22546,7	6220,4	88441,6	52463,9	8401,8	16339,1	21531,3	4638,9	80423,1
	C4	82113,2	11931,9	8181,7	27088,8	11265,2	100181,0	77721,7	11175,2	8700,7	26374,1	12321,5	101528,0
	T4	38275,3	5816,7	3470,6	12048,7	3612,3	98541,9	39662,8	6587,4	2647,1	12330,4	4161,2	98964,2
	Patrón 3 (27/09)	15741,0	20805,1	7711,1	37457,4	17047,8	113217,0	157002,0	20891,4	7767,3	37609,8	16961,7	112067,0
Patrón 4 (13/12)	210269,0	27973,5	16361,0	50831,3	22716,8	113092,0	214091,0	28477,6	16569,2	51877,3	23117,2	112228,0	
Patrón 3 (21/12)	147519,0	19669,2	11455,4	36409,7	17203,8	114856,0	144718,0	19099,2	11111,2	35442,7	15928,4	100660,0	
Patrón 4 (13/01)	231049,0	31044,3	17336,9	58113,1	26358,4	90013,6	225755,0	30129,5	16828,0	56535,2	25543,2	104790,0	

Anexo 3: Resultados obtenidos de la cromatografía de gases.

Figura A. 6 Áreas resultantes de los análisis de las pruebas de estabilidad realizadas.

Anexo 4: Resumen de la formulación final.

Cuadro A.I: Cantidades de materia prima para el concentrado emulsificable

Materia prima	Masa (g)
Tween 80 ®	13,55
Ácido oleico	1,54
B-Eco	69,58
Limoneno	0,5185
Pineno	1,0289
2-fenoxietanol	0,56