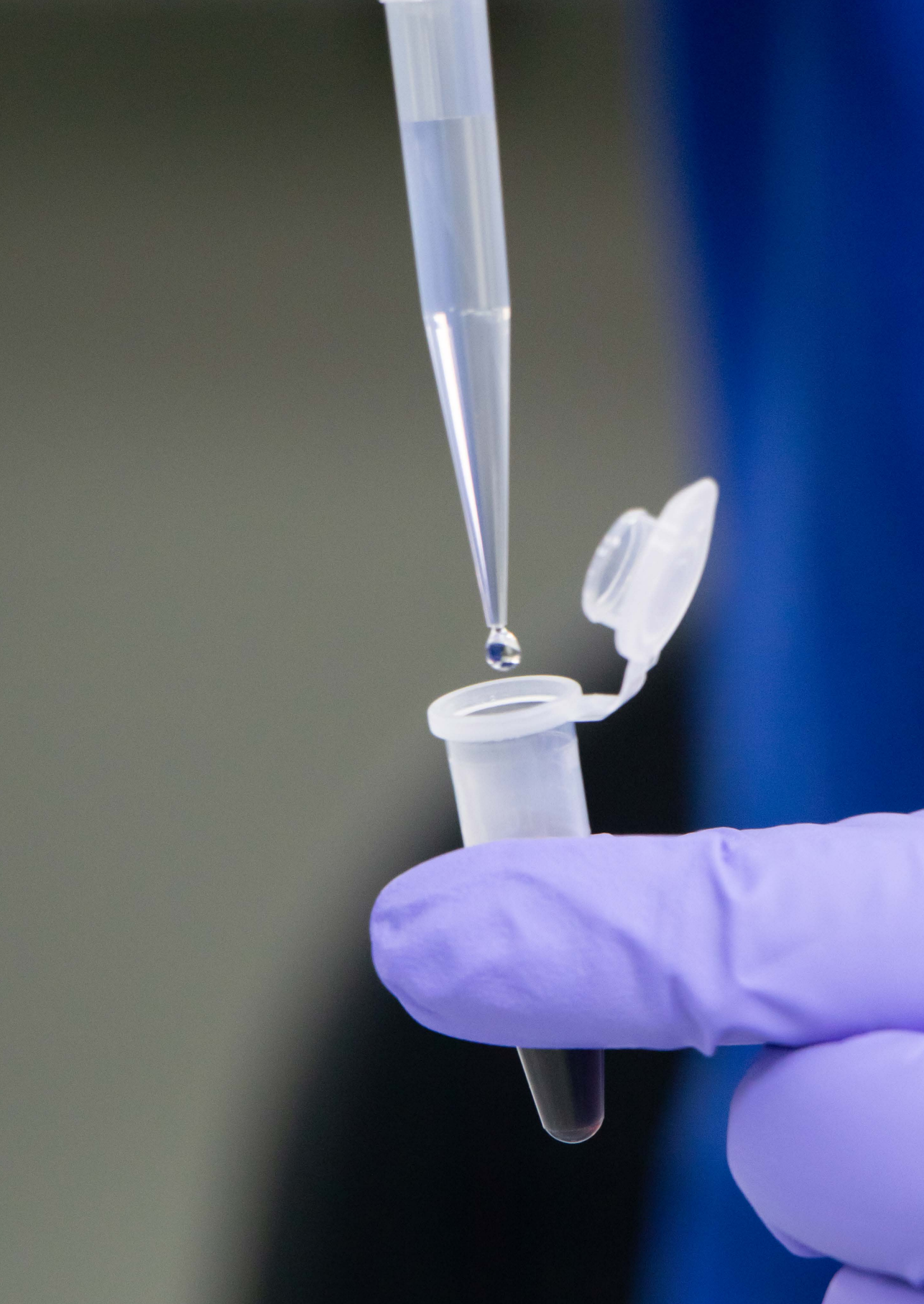




Capítulo II

Control de calidad fisicoquímico de bioplaguicidas microbianos

Erika Paola Grijalba Bernal

Un bioplaguicida microbiano tiene dos componentes: un ingrediente activo que corresponde al microorganismo que ejerce la acción biológica y los excipientes o sustancias inertes que, además de servir de vehículo para el activo, tienen una función de protección, ya sea durante el almacenamiento o cuando el producto es aplicado en campo. Adicionalmente, ayudan a formar un sistema de entrega que permite una fácil aplicación.

Con el fin de garantizar que el bioplaguicida elaborado cumpla con el objetivo para el cual fue desarrollado y mantenga su viabilidad, actividad biológica y características fisicoquímicas, es importante llevar a cabo el control de las variables que pueden ser un indicativo de su calidad microbiológica, biológica y fisicoquímica mediante el establecimiento de los límites bajo los que se deben conservar. Generalmente, se le da mayor importancia al control de calidad microbiológico y biológico, ya que proporciona información respecto del estado del microorganismo, lo cual incide directamente en la eficacia del producto. De acuerdo con esto, suele prestársele menos atención al control de calidad fisicoquímico a pesar de que este

también tiene un efecto indirecto sobre la eficacia del producto y puede aportar un valor agregado o diferencial a un mismo tipo de bioplaguicida. Por ejemplo, pueden existir dos granulados con el mismo ingrediente activo o microorganismo, pero uno de ellos puede ser más eficaz por presentar una completa y más rápida desintegración del gránulo, lo cual posibilita la liberación total del ingrediente activo y garantiza su aplicación en la dosis establecida.

En este sentido, el objetivo de este capítulo es identificar las variables fisicoquímicas más importantes de acuerdo con el sistema de entrega o tipo de formulación del bioplaguicida y las metodologías existentes que suelen emplearse para su determinación.

Bioplaguicidas microbianos sólidos

Los sistemas de entrega sólidos que suelen emplearse para la formulación de agentes de control biológico son los polvos y granulados. En la tabla 2.1 se presentan sus características y lo que se espera de acuerdo con el tipo de formulación en el momento de su aplicación.



Foto: Erika Grijalba B.

Figura 2.1. Granulado dispersable a base de *Rhodotorula mucilaginosa* (Basidiomycota: Sporidiobolales).

Tabla 2.1. Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos sólidos

Bioplaguicidas sólidos	Descripción	Características en la aplicación
Polvos mojables (WP)	Mezcla del microorganismo con un polvo que se humecta y suspende en agua en el momento de su aplicación.	Tiempo corto de humectabilidad, formación de una suspensión homogénea en la que no se formen aglomerados, poca formación de sedimento.
Polvos de aplicación directa (DP)	Corresponden a la mezcla de un microorganismo con un polvo mineral fino, de un tamaño que varía de 50 a 100 micras, que se aplican directamente sobre el blanco.	Facilidad de aplicación por tener buena fluidez y no presentar formación de aglomerados.
Polvos para tratamiento de semilla (DS)	Mezcla de un ingrediente activo y un polvo empleado como vehículo (diluyente) para facilitar el recubrimiento de la semilla.	Buena adherencia cuando se logra una cobertura total de la semilla.
Granulados dispersables (WG)	Formulaciones sólidas con un rango de tamaño de 100 a 1.000 micras, de flujo libre, diseñadas para ser suspendidas en agua y liberar el microorganismo de forma homogénea en el momento en el que el gránulo se desintegra.	Buena humectabilidad y tiempo corto para lograr una completa desintegración.
Cápsulas	Sistemas de liberación controlada o sostenida en los que el ingrediente activo se encuentra en el interior de una partícula, generalmente un polímero, que puede o no estar hidratado.	Mayor estabilidad del ingrediente activo al protegerlo de factores bióticos y abióticos del medio brindándole un microambiente benéfico. Este factor puede aumentar su vida útil y mantener la actividad metabólica por periodos prolongados de tiempo, no solo durante el almacenamiento, sino después de su aplicación, lo cual resulta en la reducción del número de aplicaciones o de la dosis del producto.

Fuente: elaboración propia con base en Faria & Wraight (2007); Gansic & Brankica (2013); Vemmer & Patel (2013)

Teniendo en cuenta los principales sistemas de entrega sólidos, a continuación se describen las pruebas fisicoquímicas más relevantes para cada tipo de formulación (tabla 2.2) y algunas de las metodologías empleadas para su evaluación (tabla 2.3).

Tabla 2.2. Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos sólidos

Tipo de Formulación	Variable para evaluar					
	pH	Humectabilidad	Suspendibilidad	Desintegración	Tamaño de partícula	Humedad
Polvos mojables	X	X	X		X	X
Polvos de aplicación directa	X				X	X
Polvos para tratamiento de semillas	X				X	X
Granulados	X	X		X	X	X
Cápsulas ¹	X				X	X

¹Otras variables fisicoquímicas importantes a evaluar en este tipo de formulaciones son la solubilidad, la hidrofobicidad, la higroscopicidad, el potencial zeta, la superficie y la morfología (Zhang et al., 2020; Sung-II et al., 2019; Gray et al., 2016; Chan et al., 2011).

Fuente: Elaboración propia

Humectabilidad: de acuerdo con Freudig et al. (1999), esta característica se describe como la “facilidad que tiene un polvo de empaparse por un líquido por efecto de las fuerzas capilares que controlan la velocidad de este” (p. 525). La velocidad con la que un material sólido se humecta depende del tamaño de las partículas y del tamaño de sus poros, de la cantidad de poros que tiene y del valor del ángulo de contacto formado entre el agua y el material (Schubert, 1978; Freudig et al., 1999). Esta característica se puede medir expresándola como el tiempo en que el material tarda en humectarse o como el ángulo de contacto entre el agua y el material evaluado. El primer caso se conoce como humectabilidad estática o test de Freudig modificado (Freudig et al., 1999; Kim et al., 2000) y consiste en la determinación del tiempo requerido para que se sumerja hasta la última partícula de polvo de la superficie. Para dicho fin, una cantidad conocida del material a evaluar se coloca sobre un volumen de agua. En el segundo caso, como lo describe Yang et al. (2003), “una gota de líquido con gran tensión superficial descansando sobre una superficie sólida con baja tensión superficial, origina una gota de forma esférica, es decir, un ángulo

de contacto elevado y viceversa” (p. 199). De acuerdo con esto, para que el sólido se humecte se necesita que la tensión superficial del sólido sea mayor a la del líquido o que la tensión superficial del líquido sea menor a la del sólido (Gil et al., 2008). Cuanto menor sea el ángulo de contacto, mayor será la humectabilidad del material. Para el caso de los polvos y granulados, esta característica generalmente se expresa como el tiempo que una cantidad conocida del material a evaluar en un volumen de agua preestablecido tarda en humedecerse completamente.

Suspendibilidad: esta característica hace referencia a la formación de una suspensión homogénea cuando el producto es reconstituido en agua. Se pueden evaluar dos tipos de suspendibilidad de una formulación. El primero corresponde a la suspendibilidad del ingrediente activo (conidios, esporas, células, cuerpos de inclusión), es decir, la cantidad de ingrediente activo suspendido después de un tiempo dado en una columna de líquido de altura conocida. Esta es expresada como el porcentaje de la cantidad de ingrediente activo en la suspensión original, por lo cual este método es adecuado para suspensiones que contienen hasta 1 % de ingrediente activo pero no para suspensiones con una concentración mayor de ingrediente activo (Collaborative International Pesticides Analytical Council [Cipac], 1995). El segundo corresponde a la suspendibilidad del producto total, es decir, la suspendibilidad del producto (ingrediente activo y sólidos en suspensión) suspendido después de un tiempo dado en una columna de líquido de altura conocida. Esta es expresada como un porcentaje del peso con respecto al peso en la suspensión original (Lisansky et al., 1993).

Desintegración: es un proceso en el cual una forma sólida, generalmente granulado o tableta, se rompe en partículas más pequeñas y finalmente en sus componentes, con lo cual libera el ingrediente activo y asegura su biodisponibilidad (Markl & Zeitler, 2017). Esta característica tiene un efecto directo en la eficacia del producto. Uno de los mecanismos de desintegración más conocidos involucra varias etapas, la primera corresponde a la penetración del líquido en el material poroso compacto (Nogami et al., 1967), la segunda al hinchamiento, en el cual se agrandan las partículas que acumulan presión y se separan en partículas adyacentes (List & Muazam, 1979) y, la tercera, a la fuerza del líquido en el que se encuentra disperso el granulado, fuerza que es pequeña, pero que con la presencia de un agente desintegrante se vuelve tan apreciable como para romper las partículas compactas (Peppas & Colombo, 1989). La evaluación de esta característica para granulados y tabletas consiste en la medición del tiempo de desintegración, es decir, el tiempo que una cantidad conocida del material a evaluar tarda en romperse completamente y formar una suspensión homogénea cuando se agita en un volumen determinado de agua.

Tamaño de partícula: en el caso de los polvos es una característica esencial, ya que el porcentaje de finos (con un tamaño inferior a 5 μm) puede causar problemas en la salud de quienes aplican este tipo de productos. Las partículas con un rango de tamaño de 1 a 5 μm se depositan en las regiones alveolares y bronquiales por sedimentación (Crowder et al., 2002). Además, esta característica puede afectar otras propiedades de los materiales sólidos como la fluidez (Kudo et al., 2020). La determinación del tamaño de las partículas generalmente se expresa como distribución del tamaño de partícula y puede realizarse por granulometría, por medio de una batería de tamices con diferente tamaño de malla, donde el material es retenido de acuerdo con su tamaño y, posteriormente, pesado para calcular el porcentaje que queda en cada tamiz (lo anterior también puede hacerse por observación directa con ayuda de un microscopio y un micrómetro). Otros métodos incluyen el uso de analizadores de difracción de rayos láser.

pH: desde el punto de vista operacional, el pH es la medida de la acidez o alcalinidad de un medio acuoso (Skoog et al., 1997) y es definido como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidronio (Carstensen, 1998) (generalmente se toma como concentración, ya que en soluciones diluidas son casi iguales). Juega un papel fundamental en la regulación de diferentes procesos fisiológicos de los microorganismos, por lo que su control en un bioplaguicida es crítico para asegurar la viabilidad y actividad biológica del ingrediente activo.

Humedad: es una característica muy importante en los bioplaguicidas sólidos pues incide en la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento. Productos con humedades superiores al 10 % mantienen más activo su metabolismo (Zarate et al., 2010), lo que puede reducir su estabilidad microbiológica, además de representar un riesgo en el aumento de contaminantes. Por otra parte, en términos de la formulación, la humedad influye en características como la fluidez y la compactación. A mayor humedad menor fluidez y mayor formación de aglomerados en los granulados (Cueva, 2018). La humedad es determinada tomando como base la pérdida de peso de una muestra cuando el contenido de agua presente se evapora por el calor al que se somete, el resultado obtenido se expresa como porcentaje de humedad.

Tabla 2.3. Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos sólidos

Variable	Metodología	Descripción
Humectabilidad	NTC 439. Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación	En un vaso de precipitado de 250 ml con un diámetro interno de $6,5 \pm 0,5$ cm y una altura de $9 \pm 0,5$ cm se adicionan 100 ml de agua a 30 ± 1 °C. Sobre el agua se dejan caer en un mismo punto 5 g del producto a evaluar, no compactado, y se determina el tiempo que tarda en humectarse completamente el material. No se debe tener en cuenta una película fina de partículas que pueden permanecer sobre la superficie. Un producto se considera aceptable si el tiempo que tarda en humedecerse es igual o inferior a 1 minuto.
	Cipac, MT 53	Un peso conocido de un material se deja caer desde una altura preestablecida, en la superficie del agua que se encuentra en un vaso de precipitado y se determina el tiempo que tarda en humedecerse completamente.
Suspendibilidad	NTC 439. Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación	Consiste en preparar una suspensión del producto y al cabo de cierto tiempo determinar la cantidad del principio activo que queda en suspensión. Tomar una cantidad suficiente de muestra para preparar 250 ml de suspensión en agua de acuerdo con la concentración recomendada en las instrucciones del producto. La suspendibilidad activa promedio no debe ser inferior al 60 % ni superior al 105 %.
	Cipac, MT 15 para polvos mojables, MT 168 para gránulos dispersables y MT 177 para polvos dispersables	Una suspensión de concentración conocida es preparada en agua destilada, se adiciona a una probeta o cilindro a temperatura constante y se deja en reposo durante un tiempo preestablecido. Se toma de la parte inferior 1/10 de la suspensión. Se requiere que al menos el 60 % del ingrediente activo permanezca en suspensión.
	AGROSAVIA (2019)	Se reconstituye 1 g del producto en 1 l de agua destilada y se distribuye en 4 probetas (250 ml en cada una) que representan un tiempo de lectura de 0, 1, 2 y 3 horas. En cada tiempo de evaluación se toma una muestra de 1 ml de la superficie, el medio y el fondo de la probeta y se determina la concentración del ingrediente activo mediante recuento en cámara de Neubauer.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
Suspendibilidad	Lisansky et al. (1993). Este método no evalúa solamente el ingrediente activo sino la homogeneidad del producto total. Es utilizado por Aroonrat et al. (2003), Xiangkun et al. (2015) y Hong-Ku et al. (2018) para determinar la suspendibilidad de bioplaguicidas correspondientes a polvos	Una muestra de 3 g se adiciona a 97 ml de agua destilada en una probeta de 100 ml, la cual se invierte 30 veces y se toma una muestra de 5 ml a partir de la marca de graduación de 10 ml. Este volumen se seca a 105 °C hasta peso constante y se calcula el porcentaje al cual corresponde dicho peso. Este tratamiento se toma como control y corresponde al producto completamente suspendido. Por otra parte, el tratamiento a evaluar se suspende de la misma manera, pero se deja en reposo durante 1 hora, pasado este tiempo se toma la muestra y se seca. La suspendibilidad se informa como porcentaje del peso del tratamiento con respecto al tratamiento control.
Desintegración	AGROSAVIA (2019)	Un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua destilada y una barra magnética de 3 cm por 0,5 cm de diámetro se colocan en agitación a 500 rpm. Se adicionan 5 g del producto a evaluar y se toma el tiempo que tarda en desintegrarse completamente desde el momento en que se humecta.
	Método descrito en la Farmacopea USP. Aplica para tabletas	Mediante un equipo especial para la prueba de desintegración USP, a una temperatura de 37 °C y utilizando agua como medio de desintegración, se determina el tiempo necesario para que todas las partículas pasen a través de una malla (Takasaki et al., 2019).
	Hong-Ku et al. (2018)	Una muestra de 0,5 g con un tamaño de partícula en el rango de 250 µm a 1.414 µm, se adiciona a un cilindro de medición de 100 ml con 90 ml de agua destilada a 25 °C y se sella con un tapón. Se agita a 8 rpm hasta su completa desintegración. Es considerado aceptable un tiempo inferior a 3 minutos.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
Tamaño de partícula	NTC 326. Abonos o fertilizantes. Método de ensayo de granulometría en seco	Se elige una serie de tamices sobre los que se adicionan 200 g del producto a evaluar. Se deja en vibración durante 5 minutos, tiempo después del cual se pesa el material retenido en cada tamiz.
Tamaño de partícula	Cipac MT 187	Análisis por difracción láser. Una muestra representativa del material a evaluar se dispersa en un líquido o gas y se pasa a través de un haz de luz emitido por una fuente monocromática (láser). La luz dispersada por las partículas en varios ángulos es medida por un detector. Los valores obtenidos son transformados usando un modelo óptico y matemático apropiado que permite obtener el volumen total para un discreto número de rangos de tamaños de partícula, de manera que se forma una distribución de tamaño de partícula volumétrica.
	Cipac MT 170	Consiste en la separación cuantitativa de un polvo o granulado en fracciones con diferentes rangos de tamaño de partícula mediante el uso de tamices. Quizás este es el método más conocido y empleado gracias a su bajo costo y facilidad de aplicación (Harris, 2018).
	AGROSAVIA (2019)	Se utiliza una columna de tamices cuya malla sea de 1.000, 500, 200, 100 y 45 micras; los tamices se organizan en orden descendente. Posteriormente, se disponen 50 g de la muestra sobre el tamiz superior y se inicia un proceso de vibración con una amplitud de movimiento de 2 durante 10 minutos, tiempo después del cual se pesa el material retenido en cada tamiz.
pH	Farmacopea	Para establecer el pH de una solución se utiliza un medidor o potenciómetro previamente calibrado.
	Cipac MT 175	El valor de pH de un líquido o dispersión es determinado por medio de un potenciómetro y un electrodo que es introducido en el tratamiento a valorar, generalmente a una concentración del 1 %.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
pH	AGROSAVIA (2019)	Se reconstituye 1 g de la muestra en 50 ml de agua destilada y se determina el pH mediante un potenciómetro calibrado. La muestra debe estar a una temperatura de 20 °C ± 2 °C.
Humedad	Takasaki et al. (2019)	En un analizador de humedad se colocan aproximadamente 5 g del producto a 105 °C por 10 minutos o hasta que no haya cambio en el peso de la muestra durante 5 minutos.
	Cipac MT 17	La pérdida de peso de una muestra que es calentada a una temperatura específica por un tiempo preestablecido es determinada. Puede ser realizada en una estufa o en un analizador de humedad.
	AGROSAVIA (2019)	Se toman 0,2 g de muestra y se disponen en una balanza halógena de humedad para su secado hasta obtener un peso constante.

Fuente: Elaboración propia

Bioplaguicidas microbianos líquidos



Foto: Erika Grijalba B.

Figura 2.2. Bioplaguicidas microbianos líquidos. a. Concentrado emulsionable a base de *Metarhizium rileyi*; b. Emulsión de *M. rileyi* formada a partir de la reconstitución del concentrado emulsionable en agua.

Los sistemas de entrega líquidos empleados comúnmente para la formulación de microorganismos corresponden a suspensiones, concentrados emulsionables y, en menor medida, emulsiones. En la tabla 2.4 se presentan sus características y lo que se espera de acuerdo con el tipo de formulación en el momento su aplicación.

Tabla 2.4. Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos líquidos

Bioplaguicidas líquidos	Descripción	Características en la aplicación
Suspensiones líquidas (SL)	Partículas de pequeño tamaño que se encuentran en un sistema líquido, generalmente de tipo acuoso.	Suspensión homogénea, fácilmente redispersable con agitación manual.
Emulsiones	Sistemas dispersos formados por dos líquidos inmiscibles.	Sistema homogéneo, no hay formación de flóculos.
Concentrado emulsionable (CE)	Suspensiones oleosas que al ser mezcladas con el agua producen emulsiones de aceite en agua de forma espontánea o con agitación suave.	Suspensión homogénea o que se redispersa fácilmente con agitación manual.
Suspoemulsiones (SE)	Sistema de tres fases: partículas sólidas dispersas, gotas de aceite y la fase continua, usualmente agua. Se considera una mezcla de suspensión concentrada y emulsión aceite en agua.	En el momento de aplicar debe ser un sistema homogéneo.

Fuente: Gansic & Brankica (2013); Knowles (2008)

Teniendo en cuenta los principales sistemas de entrega líquidos, a continuación se describen las pruebas fisicoquímicas más relevantes para cada tipo de formulación (tabla 2.5) y algunas de las metodologías empleadas para su evaluación (tabla 2.6).

pH: esta variable fue mencionada anteriormente en la descripción de variables fisicoquímicas de los bioplaguicidas sólidos y lo descrito en esa sección aplica también para los bioplaguicidas líquidos.

Viscosidad: se define como la resistencia a fluir que presenta un líquido y está relacionada con la facilidad de moverse de las moléculas individuales con respecto a las otras moléculas. Esto depende de la fuerza de atracción entre las mismas (Brown et al., 1997). La viscosidad es un atributo de calidad crítico que influye en la estabilidad física y la facilidad de aplicación y de liberación del ingrediente activo (Vo et al., 2020). Su evaluación se puede hacer básicamente bajo tres principios: primero, el tiempo que una cantidad de líquido tarda en fluir a través de un tubo delgado bajo

la fuerza gravitacional (a mayor viscosidad mayor tiempo). Segundo, determinando la velocidad con la cual unas esferas caen a través del líquido, ya que estas caerán más lentamente cuando se incrementa la viscosidad (Brown et al., 1997). Tercero, midiendo la tracción viscosa ejercida sobre un disco que rota en el líquido contenido en un vaso de precipitación. El disco es impulsado por un motor sincrónico por medio de un resorte de torsión. El grado en el cual es enrollado el resorte a una determinada velocidad (en rpm) es indicado por un señalador sobre un dial calibrado en unidades de fuerza de rotación. Al multiplicar la lectura del dial por la constante apropiada para el disco y la velocidad se obtiene la viscosidad aparente del líquido en centipoises para esa velocidad (Brookfield Engineering Labs, 2000).

Tabla 2.5. Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos líquidos

Tipo de Formulación	Variable para evaluar				
	pH	Viscosidad	Densidad	Sedimentación	Tamaño de diámetro de gota
Suspensión líquida	X	X	X	X	
Emulsiones	X	X			X
Concentrado emulsionable	X	X			X
Suspoemulsión	X		X		X

Fuente: Elaboración propia

Densidad: es definida como la cantidad de masa contenida en una unidad de volumen de una sustancia. Generalmente se expresa en unidades de g/cm³ (Brown et al., 1997). Esta variable permite garantizar que la suspensión o emulsión posea las mismas características en cada lote de producción.

Sedimentación: esta característica es importante en productos líquidos, tales como suspensiones y concentrados, ya que garantiza que no se forme una torta en el fondo del recipiente que contiene el producto. Si no se puede reconstituir con agitación manual, esta torta o apelmazamiento de los sólidos que forman parte de la formulación (excipientes o ingrediente activo), afecta completamente la calidad del producto ya que indica que la concentración y las características fisicoquímicas no son las mismas a las establecidas cuando se diseñó la formulación. La velocidad de sedimentación de una partícula depende de la viscosidad del fluido, el radio de la partícula, la velocidad de la caída y la fuerza de resistencia a esta, factores que se resumen en la ley de Stokes (Salager, 1999).

Tamaño de diámetro de gota: esta característica es útil de evaluar en las emulsiones, ya sea porque el bioplaguicida sea formulado de esta manera o porque se forme la emulsión al reconstituir el bioplaguicida en agua, como es el caso de los concentrados emulsionables. El tamaño promedio de gota puede calcularse de diferentes formas dependiendo de que se quiera establecer la relación con la superficie o el volumen. La distribución del diámetro de las gotas que forman la fase interna de la emulsión se determina con el fin de caracterizar la emulsión como macro o microemulsión. Además, es una variable importante para evaluar en las pruebas de estabilidad en almacenamiento (Particle Sciences, 2011). Para determinar esta variable, la observación directa o la fotografía con microscopía óptica son los métodos más simples; aunque son extremadamente tediosos y el límite inferior de la microscopía óptica es de 1 μm (Salager, 1999), sin embargo otros autores reportan como ideal un mínimo de 3 μm (Shekunov et al., 2007). Para partículas con un rango de tamaño entre 0,5 a 1000 μm la difracción láser es una buena opción que relaciona el diámetro promedio con el volumen de la gota; su tiempo de análisis es corto, los resultados obtenidos son robustos, precisos y reproducibles (Shekunov et al., 2007).

Tabla 2.6. Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos líquidos

Variable	Metodología	Descripción
Viscosidad	Bali et al. (2010) Shakeel et al. (2014)	La viscosidad se determina utilizando un viscosímetro o reómetro u otro equipo.
Sedimentación	Bostijn et al. (2018)	En una probeta graduada de 10 ml se coloca el producto a evaluar durante un periodo de 30 días. El volumen de sedimentación se calcula como el radio entre el volumen del sedimento y el volumen total de la suspensión. Un valor de 1 indica que no hay formación de sedimento.
	Deveswaran (2010)	Se toman 10 ml de muestra y se colocan en un recipiente cilíndrico, se mide la altura de los 10 ml del producto y la altura del sedimento formado después del tiempo de reposo. El índice de sedimentación es el radio entre la altura del sedimento formado sobre la altura inicial del producto total.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.6)

Variable	Metodología	Descripción
Densidad	Cipac, MT 3.2 Método del picnómetro	Este método se utiliza para productos cuyo peso es similar al volumen, o cuando se compara el producto con el agua. Para esto, en un picnómetro limpio y seco se coloca la muestra a evaluar llenándolo completamente. El picnómetro se tapa y se deja subir el líquido por el capilar y se pesa. Previamente debe haberse pesado el picnómetro vacío. Para calcular la densidad se utiliza la siguiente fórmula: $\rho = (Pm - Ps) \div V$ Donde <i>Pm</i> es el peso del picnómetro con la muestra, <i>Ps</i> es el peso del picnómetro vacío y <i>V</i> es el volumen del picnómetro.
	AGROSAVIA (2019)	Se determina la densidad mediante un picnómetro y se toma como base la metodología Cipac.
Tamaño de diámetro de gota	Macedo et al. (2006)	Para determinar esta característica se sigue el método de Ferret's mediante un microscopio óptico equipado con un micrómetro calibrado.
	Zhang et al. (2019); Vo et al. (2020)	Este método evalúa la distribución de tamaño de partículas de una muestra, a partir de la dispersión dinámica de la luz, mediante difracción láser

Fuente: Gansic & Brankica (2013); Knowles (2008)

La caracterización fisicoquímica que se presenta en los siguientes casos de estudio corresponde a resultados de investigación propios del autor y fue tomada del informe técnico final del proyecto “Prototipos de formulación optimizados para el control de *Cerotoma tingomariana*” llevado a cabo por AGROSAVIA. Para cada caso, la caracterización fisicoquímica se llevó a cabo con 3 lotes de producto y 3 réplicas por tratamiento.

Caso de estudio I: granulado dispersable

Se tiene un granulado dispersable a base de los conidios del hongo *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) aislamiento Bv060. Se analizarán diferentes variables fisicoquímicas (tabla 2.7).

Tabla 2.7. Caracterización fisicoquímica de un granulado a base de *B. bassiana* Bv060

Variable	Metodología	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Desviación estándar (<i>sd</i>)
pH	Cipac MT 175	8,04	8,15	7,93	0,11
Humedad	Cipac MT 17	3,37	2,80	3,06	0,28
Humectabilidad (minutos)	Cipac MT 53	2,20	2,17	2,15	0,025
Desintegración (minutos)	AGROSAVIA (2014)	1,42	1,38	1,35	0,035

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se describe el procedimiento mediante el cual se evaluó cada variable:

- 1. Determinación del pH:** se tomaron tres muestras de 1 g de cada lote y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 ml con 99 ml de agua destilada. Cada muestra se agitó vigorosamente hasta su completa desintegración y formación de la suspensión. Con un potenciómetro Consort C931 (Consort BVBA, Turnhout, Bélgica) previamente calibrado se realizó la lectura de pH.

El pH es un parámetro importante porque puede afectar la permeabilidad de la membrana celular o la actividad de las enzimas fúngicas (Moore, 1996). El valor de pH obtenido debe ser comparado con el rango óptimo para el microorganismo formulado. En este caso el rango óptimo para *B. bassiana* se había establecido entre 5 y 9 en estudios previos (AGROSAVIA, 2014).

- 2. Determinación de la humedad:** de cada lote se pesaron tres muestras de 0,5 g, cada una se colocó en una balanza halógena de humedad Kern MLS 50-3 y se dejó a una temperatura de 110 °C hasta que no se presentó variación en el peso de las muestras. Se registró el porcentaje de pérdida de agua de cada muestra, el cual corresponde a su contenido de humedad.

La humedad establecida para los tres lotes estuvo por debajo del 5 %, lo que, posiblemente, reducirá el metabolismo de Bv060 y permitirá obtener una mayor estabilidad en el almacenamiento (Costa et al., 2002).

3. **Determinación de la humectabilidad:** en un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua se pusieron 5 g del granulado a evaluar (tres muestras por lote) sobre la superficie y con un cronómetro se registró el tiempo que este tardó en humedecerse completamente.

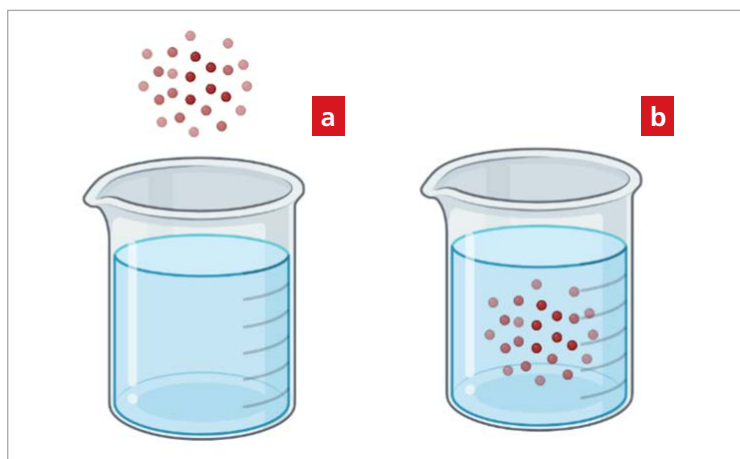


Figura 2.3. Evaluación del tiempo de humectabilidad; a. Granulado antes de suspender en el agua; b. Granulado completamente humectado.

Fuente: Elaboración propia

Esta variable se encuentra por encima de lo recomendado en la literatura, a saber, 1 minuto (Norma Técnica Colombiana [NTC 439], 2015). Con este resultado se evidenció la necesidad de mejorar esta variable fisicoquímica. Aunque este resultado no tiene un efecto directo sobre la eficacia del bioplaguicida, puede representar un efecto desfavorable en la percepción del usuario del producto si se compara con productos similares que se encuentran en el mercado y tienen un menor tiempo de humectabilidad.

4. **Determinación del tiempo de desintegración:** a un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua se adicionaron 5 g del granulado (tres muestras por lote) y tan pronto este se humectó, la suspensión se puso en agitación constante a 500 rpm y se registró el tiempo en que se desintegró completamente.

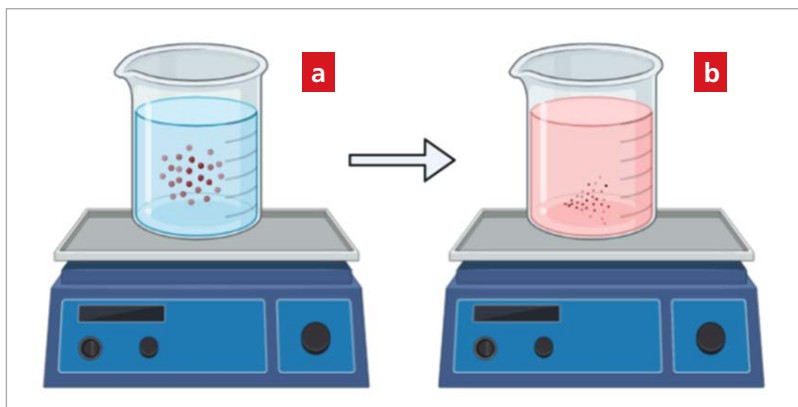


Figura 2.4. Tiempo de desintegración de un granulado; a. Tiempo inicial, granulado en agua completamente humectado; b. Desintegración total del granulado, formación de la suspensión.

Fuente: Elaboración propia

La desintegración tuvo lugar en un tiempo inferior a 2 minutos, valor que está en el límite de aceptación establecido por algunos autores (Hong-Ku et al., 2018). Sin embargo, sería conveniente establecer si el valor obtenido es aceptable o se debe intentar reducir (con respecto a productos similares en el mercado).

- 5. Tamaño de partícula:** una batería de tamices fue armada en orden descendente con los tamaños de malla de 2.000 micras, 1.000 micras, 850 micras, 500 micras, 150 micras y el colector; previamente se pesó cada tamiz.

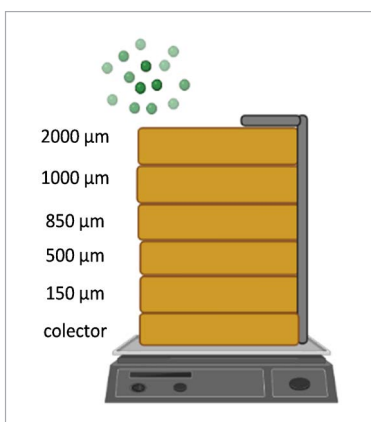


Figura 2.5. Determinación del tamaño de partícula por granulometría. Batería de tamices ordenada de acuerdo con el tamaño de la abertura de malla en orden descendente.

Fuente: Elaboración propia

En el tamiz de 2.000 micras se colocaron 100 g del granulado y se dejó vibrando a una amplitud de 2 por 10 minutos, tiempo después del cual se pesó el material retenido en cada tamiz y se calculó el porcentaje correspondiente. Los datos fueron utilizados para hacer un histograma de distribución de frecuencias con 6 rangos de clase (figura 2.6).

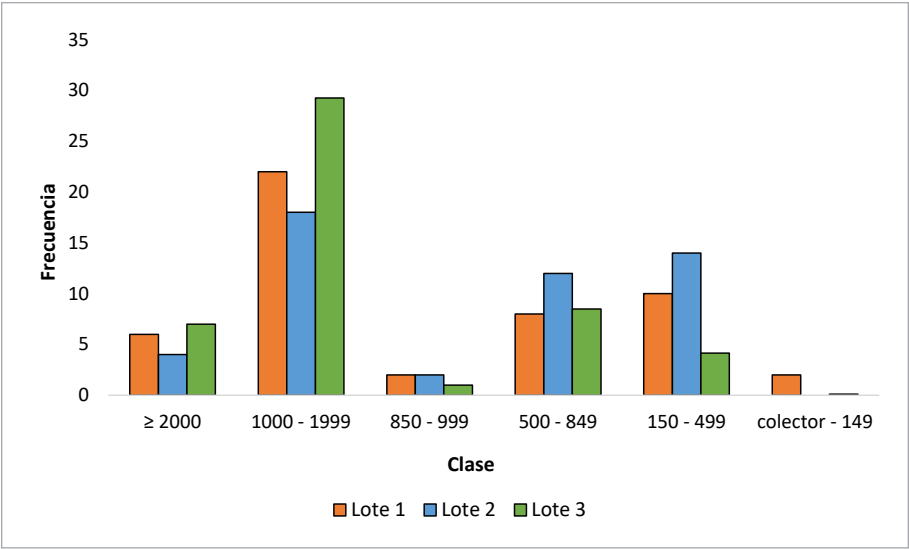


Figura 2.6. Distribución de tamaño de partícula de un granulado a base de *B. bassiana* Bv060.
Fuente: Elaboración propia

Caso de estudio II: concentrado emulsionable

Esta formulación fue elaborada con los conidios del hongo *B. Bassiana*. Este tipo de formulación corresponde a una suspensión oleosa. En la tabla 2.8 se presentan los promedios correspondientes a las variables fisicoquímicas evaluadas. Además, se determinó el tamaño de diámetro medio de gota, como se mencionará posteriormente.

Tabla 2.8. Caracterización fisicoquímica de un concentrado emulsionable a base de *B. bassiana* Bv060

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Desviación estándar (sd)
pH	7,89	7,79	7,84	0,05
Sedimentación	0,72	0,67	0,70	0,02
Viscosidad	1,21	1,34	1,21	0,12

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se menciona el procedimiento mediante el cual se analizó cada variable:

1. **Determinación del pH:** se tomaron tres muestras de cada lote, cada una de 1 ml y se reconstituyeron en 99 ml de agua destilada para formar la emulsión. Este volumen se colocó en un vaso de precipitado de 250 ml y con un potenciómetro previamente calibrado se tomó la lectura de pH.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de estudio I, esta es una variable fisicoquímica importante ya que puede afectar la permeabilidad de la membrana del microorganismo y su actividad enzimática (Moore, 1996). Por este motivo debe ser considerada para todos los tipos de formulaciones. En este caso el valor obtenido se encuentra dentro del rango óptimo establecido en estudios anteriores (AGROSAVIA, 2014).

2. **Evaluación del índice de sedimentación:** un volumen de 10 ml del concentrado emulsionable se colocó en una probeta graduada y se dejó en reposo a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días. El primer día se tomó la altura del volumen del concentrado emulsionable y después del tiempo de almacenamiento se determinó el volumen del sedimento formado. El cociente entre el volumen inicial y final correspondió al índice de sedimentación.

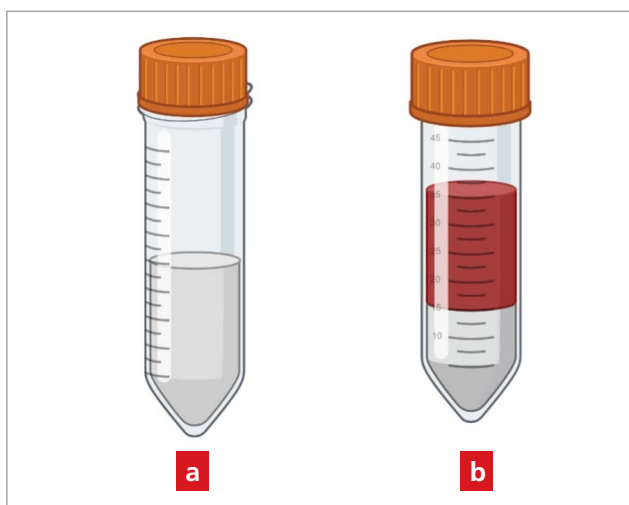


Figura 2.7. Determinación del índice de sedimentación a partir de la altura del sedimento formado; a. Suspensión inicial; b. Sedimento formado después de un tiempo de almacenamiento en reposo.

Fuente: Elaboración propia

Los valores obtenidos en el índice de sedimentación indican que se formó sedimento en el concentrado emulsionable durante el tiempo de almacenamiento, por el contrario, valores cercanos a 1 indican que hay una menor formación de sedimento (Bostijn et al., 2018). Sin embargo, en este tipo de productos biológicos, además del cálculo del índice de sedimentación, es importante establecer la facilidad de redispersión del producto mediante agitación manual. Esto indica que en el momento de su aplicación el sedimento formado en el producto se va a homogenizar completamente, lo cual garantiza la aplicación de la dosis con la que fue diseñado.

3. **Determinación de la viscosidad:** la viscosidad se determinó mediante un viscosímetro de bola utilizando una bola de acero inoxidable (SS 316) y determinando el tiempo en que esta tardó en caer. La viscosidad se calculó mediante la ecuación 2.1 (Gilmont, 1961):

$$k = \mu \div (pt - p) \times t$$

Donde $\mu = k (pt - p)$

μ = viscosidad en centipoises (cps)

pt = densidad de la bola (g/ml); 2,53 para el vidrio; 8,03 para el acero inoxidable y 16,6 para el tantalum

p = densidad del líquido (g/ml)

t = tiempo de descenso (minutos)

k = constante del viscosímetro, la cual es obtenida por la medida de la viscosidad de un líquido estándar

4. **Tamaño de diámetro interno de gota:** un volumen de 20 μ l se depositó sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con una laminilla. Mediante un microscopio colocado en el objetivo de un microscopio óptico con el objetivo 40 $\times$, se realizó la lectura del diámetro de 100 gotas por réplica. Se utilizó un total de tres réplicas por lote (figura 2.4).

Mediante la observación a través del microscopio óptico se evidenció la formación de gotas esféricas correspondientes a la fase interna (oleosa). Estas se encontraron

dispersas en la fase externa (agua). Para los tres lotes se observó una tendencia similar, de acuerdo con la cual el mayor número de gotas se encontraron en el rango de tamaño de 7,5 a 19,5 micras y de 19,6 a 31,5 micras. Una menor proporción de gotas se encontró en el rango de 55,6 a 67,5 micras. El tamaño del diámetro de las gotas de la fase interna de la emulsión evidenció que al reconstituir en agua el concentrado emulsionable se formó una macroemulsión en el que las gotas tuvieron un tamaño mayor a 0,1 micras (Salager et al., 2001). Además, la amplia variación en el diámetro de las gotas sugiere que con el tiempo la emulsión puede mostrar signos de inestabilidad (Salager, 1999), tales como cremado o formación de coágulos.

Perspectivas

El incremento en la demanda de productos para el control de plagas agrícolas que tengan un menor impacto sobre la salud y el medio ambiente es un reto para los productores de plaguicidas biológicos. Así pues, el objetivo es ofrecer productos que mantengan la estabilidad y la eficacia con la cual fueron diseñados en cada lote de producción y que sean competitivos por presentar características que los diferencien. Estas características solo pueden lograrse si se les asigna la importancia requerida a las variables fisicoquímicas de acuerdo con el tipo de formulación durante la etapa de desarrollo y de producto terminado.

Por lo tanto, constituye un desafío para los fabricantes y los laboratorios de plaguicidas biológicos incluir como parte fundamental del control de calidad las variables fisicoquímicas mas allá del pH y la humedad, que son las que generalmente se tienen en cuenta pero no son suficientes para valorar el comportamiento del producto en las diferentes etapas de elaboración, distribución y aplicación.

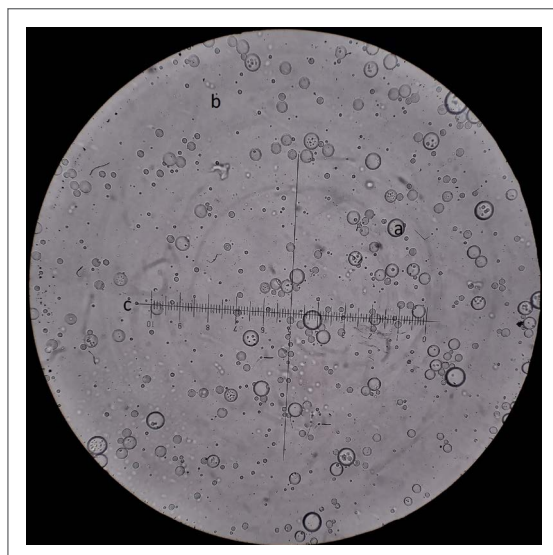


Foto: Erika Grijalba B.

Figura 2.8. Vista al microscopio óptico de una emulsión aceite agua con un objetivo de 40x; a. Gota de aceite fase interna; b. Fase externa, agua; c. Escala del micrómetro.

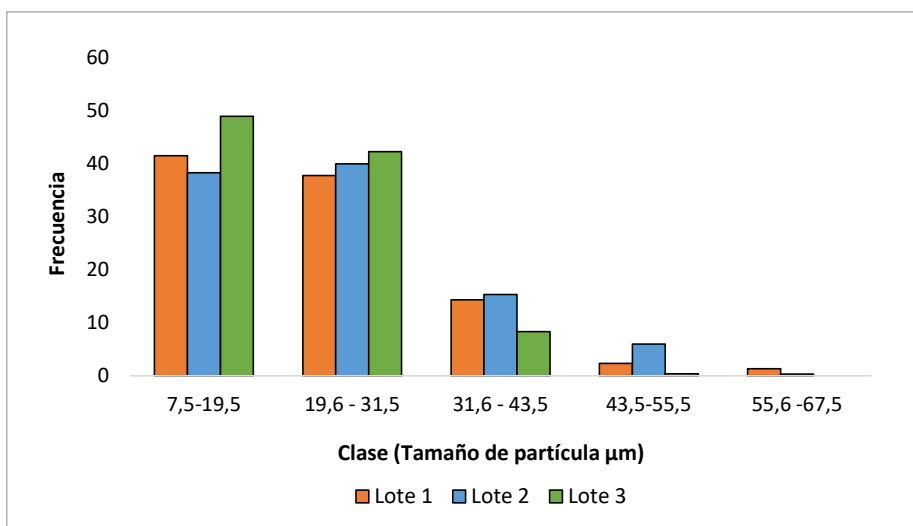


Figura 2.9. Distribución de tamaño de partícula de una emulsión formada a partir de la reconstitución de un concentrado emulsionable a base de *B. bassiana* Bv060.

Fuente: Elaboración propia

Referencias

- Aroonrat, T. A., Supphantharika, M., & Ketunuti, U. (2003). Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis* based-biopesticides. *Journal of economic entomology*, 96(2), 292-299. <https://doi.org/10.1093/jee/96.2.292>
- Bali, V., Ali, M., & Ali, J. (2010). Novel nanoemulsions for minimizing variations in bioavailability of ezetimibe. *Journal of Drug Targeting*, 18(7), 506-519. <https://doi.org/10.3109/1061186090354836>
- Bostijn, N., Renterghem, J. V., Dhondt, W., Vervaet, C., & De Beer, T. (2018). A continuous manufacturing concept for a pharmaceutical oral suspension. *European Journal of pharmaceutical sciences*, 123(1), 576-583. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.015>
- Brookfield Engineering Labs. (2000). *More solutions to sticky problems*. Brookfield Engineering Labs.
- Brown, T. L., Lemay, H. E., Bursten, B. E., Murphy, C. J., Woodward, P. M., & Stoltzfus, M. W. (1997). *Chemistry: The central science*. Pearson.
- Carstensen, J. T. (1998). *Pharmaceutical preformulation*. CRC Press.
- Chan, E. S., Wong, S. L., Leen, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z. B., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S. H., & Yim, Z. H. (2011). Effects of starch filler of the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate polymers*, 83(1), 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.044>
- Collaborative International Pesticides Analytical Council [Cipac]. (1995). *Handbook volumen F: Physico chemical methods for technical and formulated pesticides*. Editores Dobrat & Martijn.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2014). Un bioplaguicida para el control de crisomélidos en soya [Informe técnico final]. AGROSAVIA.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019). *Análisis fisicoquímico de bioplaguicidas sólidos*. AGROSAVIA.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., & Viñas, I. (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol

- agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 873-878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x>
- Crowder, T. M., Rosati, J. A., Schroeter, J. D., Hichey, A. J., & Martonen, T. B. (2002). Fundamental effects of particle morphology on lung delivery: prediction of Stokes' law and the particular relevance to dry powder inhaler formulation and development. *Pharmaceutical Research*, 19(3), 239-245. <https://doi.org/10.1023/a:1014426530935>
- Cueva, R. (2018). Evaluación de dos atributos de calidad críticos en la producción de formas farmacéuticas sólidas utilizando la espectroscopía de infrarojo cercano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(4), 465-476
- Deveswaran, R., Bharath, S., Furtado, S., Abraaham, S., Basavaraj, B. V., & Madhavan, V. (2010). Isolation and evaluation of tamarind seed polysaccharide as a natural suspending agent. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 1(4), 360-363.
- Faria, M., & Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43(3), 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Freudig, B., Hogenkamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical engineering and processing*, 38(1), 525-532. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00049-5)
- Gansic, S., & Brankica, T. (2013). Biopesticide formulations, possibility of applications and future trends. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(2), 97-102. <https://doi.org/10.2298/pif1302097g>
- Gil, J., Vargas, L., Flórez, O., & Tobón, G. (2008). Efecto del solvente de recristalización y del tamaño de partícula sobre la humectabilidad del ibuprofeno. *Vitae*, 16(1), 49-54.
- Gilmont, R., & Maurer, P. W. (1961). A generalized equation for rotameters with spherical floats. *Instruments and control systems*, 34(11), 2071.
- Gray, A., Egan, S., Bakalis, S., & Zhang, Z. (2016). Determination of microcapsule physicochemical structural, and mechanical properties. *Particuology*, 24(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.06.002>
- Harris, D. (2018). Particulates in semi-solid pharmaceutical products. En Merkus, H., Meesters, G., Oostra, W. (Eds), *Particles and nanoparticles in pharmaceu-*

- tical products. AAPS advances in the pharmaceutical sciences* (pp. 399-428). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94174-5_1
- Hong-Ku, W., Li-Li, S., Fang, L., Zhi-Ying, W., & Chuan-Wang, C. (2018). Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control. *Journal of integrative agriculture*, 17(3), 613-620. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61811-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61811-2)
- Kim, E. H. J., Chen, X. D., & Pearce, D. (2000). Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 26(3), 197-212. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00334-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00334-4)
- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Envirommentalis*, 28(1), 35-44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Kudo, Y., Yasuda, M., & Matsusaka, M. (2020). Effect of particle size distribution on flowability of granulated lactose. *Advanced Powder Technology*, 31(1), 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2019.10.004>
- Lisansky, S. G., Quinlan, R. J., & Tassoni, G. (1993). The *Bacillus thuringiensis* production handbook. CPL Press.
- List, P. H., & Muazzam, U. A. (1979). Quellung-die treibende Kraft beim tablettenzerfall. 1 Mitteilung. *Pharmazeutische industrie*, 41(5), 459-464.
- Macedo, J., Fernandes, L., Formiga, F., Reis, M., Nagashima, T., Soares, L., Socrates, E., & Egito, T. (2006). Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E1-E7 <https://doi.org/10.1208/pt070121>
- Markl, D., & Zeitler, J. A. (2017). A review of disintegration mechanisms and measurement techniques. *Pharmaceutical Research*, 34(5), 890-917. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2129-z>
- Nogami, H., Hasegawa, J., Miyamoto, M. (1967). Studies of powdered Preparations XX disintegration of the aspirin tablets containing starches as disintegrating agent. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 15(3), 179-89.
- Norma Técnica Colombiana [NTC 439]. (2015). Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación.
- Particle Sciences. (2011). *Drug development services. Technical brief. Volume 2*. Particle Sciences.

- Peppas, N. A., & Colombo, P. (1989). Development of disintegration forces during water penetration in porous pharmaceutical systems. *Journal of Controlled Release*, 10(3), 245-250. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(89\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(89)90074-6)
- Rosen, M. J. & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley Online Library.
- Salager, J. L. (1999). Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. Cuaderno FIRP 747-B. Propiedades de las emulsiones y su medición. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Salager, J. L., Antón, R., Anderrez, J., & Aubry, J. M. (2001). Formulación de microemulsiones por el método del HLD. *Techniques de l'Ingénieur*, Vol. Génie des Procédés, artículo J2: 157, 1-20.
- Schubert, H. (1978). Optimierung der Größe und Porosität von Instantagglomeraten in bezug auf eine schnelle Durchfeuchtung. *Verfahrenstechnik*, 12(1), 296-301.
- Shakeel, F., Haq, N., Alanazi, F. K., & Alsarra, I. A. (2014). Effects of oils and surfactants on physicochemicals characterization and *in vitro* dissolution of glibenclamide from self-emulsifying formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 24(1), 78-85. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50011-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50011-1)
- Shekunov, B., Chatopadhyay, P, Tong, H., & Chow, A. (2007). Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharmaceutical research*, 24(2), 203-227. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9146-7>
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1997). Métodos potenciométricos. En *Fundamentos de química analítica*. Reverte.
- Sunk-II, A., Yung-Kyung, L., & Hae-Soo, K. (2019). Physicochemical and sensory properties of milk supplemented with lactase microcapsules coated with enteric coating materials. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6959-6970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15865>
- Takasaki, H., Sakurai, A., Katayama, T., Matsuura, Y., Ohyagi, N., Mizoguchi, M., Takano, J., Wada, K., Matsui, K., Nagato, T., Ishikawa, A., & Yonemochi, E. (2019). Importance of free water in controlling granule and tablet properties in a novel granulation method, green fluidized bed granulation (GFGB). *International Journal of pharmaceuticals*, 570(1), 118647. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118647>

- Vemmer, M., & Patel, A. (2013). Review of encapsulation methods for microbial biological control agents. *Biological control*, 67(3), 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- Vo, A., Feng, X., Patel, D., Mohammad, A., Kozak, D., Choi, S., Ashraf, M., & Xu, X. (2020). Factors affecting the particle size distribution and rheology of brinzolamide ophthalmic suspensions. *International Journal of Pharmaceutics*, 586(1), 119495. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119495>
- Xiangkun, M., Junjie, Y., Mina, Y., Xiaole, Y., Yongfeng, L. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain 29 by spray drying to control rice blast disease. *Biological control*, 85(1), 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.004>
- Yang, M. W., & Lin, S. Y. (2003). A method for correcting the contact angle from the $\theta/2$ method. *Colloids Surfaces A*, 222(1-3), 199-210. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00064-5)
- Zárate, C. A., Cotes, A. M., Villamizar, L. (2010). Estudio de la estabilidad en almacenamiento de tres formulaciones oleosas a base de *Nomuraea rileyi*. En V. Coria, B. Lara, G. Orozco, J. Muñoz, R. Sánchez (Eds.), *XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Inifap, Cirpac, Uruapan* (pp. 399e403). Michoacán, México.
- Zhang, S., Wan, Q., Xu, X., Xing, Y., Ding, J., Yang, S., Sun, W., Lu, M., Pan, B. (2019). A novel oil-based suspension of a micro-environmental, pH-modifying solid dispersion for parenteral delivery: Formulation and stability evaluation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 179(1), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.001>
- Zhang, Z. H., Peng, H., P., Woo, M., Zeng, Z., Brennan, M., Brennan, C. (2020). Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll microcapsules by spray drying: Effect of WPI ratios on the physicochemicals and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering*, 267(1), 109729. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109729>