



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

TRANSESTERIFICACIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS DE ACEITES COMERCIALES

Alumno: Carlos Alberto Sánchez Barrero

Tutor: Prof. D. Antonio Ortiz Hernández
Depto.: Química Orgánica e Inorgánica

Septiembre, 2018

Escuela Politécnica Superior de Linares

Grado en Ingeniería Química Industrial

TRABAJO FIN DE GRADO

**TRANSESTERIFICACIÓN
ASISTIDA POR MICROONDAS
DE ACEITES COMERCIALES**

Alumno: Carlos Alberto Sánchez Barrero

Tutor: Prof. D. Antonio Ortiz Hernández
Depto.: Química Orgánica e Inorgánica

Firma Alumno:



Firma Tutor:

ORTIZ
HERNANDEZ
ANTONIO
JOSE -
52550569P

Firmado digitalmente
por ORTIZ
HERNANDEZ
ANTONIO JOSE -
52550569P
Fecha: 2018.08.15
16:36:49 +02'00'

Septiembre, 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. LEYENDA	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 La polinización como relación simbiótica entre plantas y animales	8
3.1.1 <i>Función de las abejas en los ecosistemas</i>	8
3.2 Métodos de síntesis de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga	9
3.2.1 <i>Método clásico</i>	9
3.2.2 <i>Asistida por microondas</i>	10
3.2.3 <i>Asistida por ultrasonidos</i>	11
3.3 Feromona de cría a partir de aceites comerciales	12
3.3.1 <i>Efectividad de la feromona comercial sobre las colonias</i>	12
3.3.2 <i>Tratamiento de las colmenas con Superboost®</i>	13
3.3.3 <i>Composición de la feromona comercial</i>	13
3.3.4 <i>Inconvenientes de la feromona</i>	14
3.3.5 <i>Producción de la feromona a partir de aceites transesterificados</i>	15
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Materiales Empleados	18
5.2 Reactor de microondas	18
5.3 Equipo de ultrasonidos	19
5.4 Transesterificación de aceites por el método clásico	19
5.5 Transesterificación de aceites asistida por microondas	19
5.6 Transesterificación de aceites asistida por ultrasonidos	20
5.7 Esterificación asistida por microondas de ácidos grasos saturados	20
5.8 Programación lineal	21
5.9 Detección GC-FID	22
5.10 Cromatografía de gases-masas (GC-MS)	22
5.11 Formulación de emisores	22
5.12 Pruebas en campo	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1 Comparación cualitativa de los distintos métodos de transesterificación	24
6.2 Producción de feromona	24
6.2.1 <i>Caracterización de las feromonas de laboratorio</i>	30
6.3 Pruebas en campo de la feromona de laboratorio	32
7. CONCLUSIONES	33
8. LÍNEAS FUTURAS	34
9. ANEXOS	35
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del producto SuperBoost®.....	14
Tabla 2. Precios de los ácidos grasos.....	16
Tabla 3. Resultados cromatograma Oliva MeOH	25
Tabla 4. Resultados cromatograma Soja MeOH	25
Tabla 5. Resultados cromatograma Linaza MeOH.....	25
Tabla 6. Resultados cromatograma Oliva EtOH.....	25
Tabla 7. Contenido porcentual experimental en ácidos de cada aceite	26
Tabla 8. Tiempos de retención experimentales de los ésteres.....	26
Tabla 9. Composiciones proporcionales de aceites y producto comercial en ésteres metílicos	27
Tabla 10. Composiciones proporcionales de aceites y producto comercial en ésteres etílicos	27
Tabla 11. Soluciones de las programaciones lineales.....	28
Tabla 12. Comparación de valores teóricos y objetivos de los ésteres saturados con las soluciones de las programaciones lineales	28
Tabla 13. Cantidad total de ésteres etílicos y metílicos en el producto SuperBoost®	29
Tabla 14. Cantidad de cada componente metílico en la mezcla final	29
Tabla 15. Cantidad de cada componente etílico en la mezcla final	29
Tabla 16. Abundancia relativa de cada éster en la 1ª mezcla final.....	30
Tabla 17. Comparación de valores teóricos y experimentales de la 1ª mezcla final	30
Tabla 18. Abundancia relativa de cada éster en la 2ª mezcla final.....	31
Tabla 19. Comparación de valores teóricos y experimentales de la 2ª mezcla final	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la reacción de transesterificación de un triglicérido	10
Figura 2. Esquema del mecanismo de la reacción de transesterificación.....	10
Figura 3. Esquema del fundamento de las microondas.....	11
Figura 4. Miel recogida en colmenas tratadas y sin tratar	13
Figura 5. Comparación de la Vespa Velutina con las especies autóctonas.....	15
Figura 6. Esquema del proceso general.....	17
Figura 7. Aceites usados (Soja, Linaza y Oliva)	18
Figura 8. Microondas del laboratorio.....	18
Figura 9. Ultrasonidos del laboratorio	19
Figura 10. Esquema de la programación lineal metflica	21
Figura 11. Esquema del programa de temperaturas usado	22
Figura 12. Cromatograma del Oliva MeOH	35

1. RESUMEN

En este estudio el principal objetivo es poner a punto de un método de producción de feromona de cría de *Apis mellifera* a partir de aceites vegetales comerciales.

Para ello, se transesterifican los aceites mediante distintos métodos (asistencia de microondas, ultrasonidos y clásico), lo que permite una comparación entre los procedimientos sintéticos. Los resultados muestran que esta reacción se ve favorecida por la asistencia de los ultrasonidos y la radiación de microondas en comparación con el método clásico.

En cuanto a la mezcla feromonal, la proporción entre componentes es calculada mediante programación lineal para ajustarse a la óptima. A día de la entrega de este documento, no disponemos aún de los datos de campo definitivos, pero los resultados preliminares muestran diferencias significativas de las cantidades de polen y miel en colmenas cebadas con esta mezcla sintética y no hay diferencias significativas con las colmenas cebadas con el producto comercial *Superboost®*.

ABSTRACT

The main purpose of this work is to find a method to produce *Apis Mellifera* brood pheromone by using comercial vegetable oils.

In order to achieve this goal, vegetable oils are transesterified through different procedures (microwave or ultrasonic assisted and classical method). Thus, a comparison between methods can be made. The results show that both microwave radiation and ultrasonic assistance make a more effective reaction than classical method.

Regarding pheromonal mix, component proportions are calculated by linear programming in order to make an optimum mix. Definitive results are not available by the time that this project is submitted. However, preliminar results point out significative differences in pollen and honey quantities in sinthetic mix treated hives. Furthermore, there are no significant differences with the available comercial product *Superboost®*.

2. LEYENDA

Ésteres alcohólicos

EM: estearato de metilo

EE: estearato de etilo

PM: palmitato de metilo

PE: palmitato de etilo

OIM: oleato de metilo

OIE: oleato de etilo

LoM: linoleato de metilo

LoE: linoleato de etilo

LnM: linolenato de metilo

LnE: linolenato de etilo

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos

FAEE: Ésteres etílicos de ácidos grasos

Cantidades de ésteres en aceites o mezcla comercial (programación lineal)

EMO: estearato de metilo proporcional en aceite de oliva

EMS: estearato de metilo proporcional en aceite de soja

EML: estearato de metilo proporcional en aceite de linaza

EMCom: estearato de metilo proporcional en la mezcla comercial

PMO: palmitato de metilo proporcional en aceite de oliva

PMS: palmitato de metilo proporcional en aceite de soja

PML: palmitato de metilo proporcional en aceite de linaza

PMCom: palmitato de metilo proporcional en la mezcla comercial

OIMO: oleato de metilo proporcional en aceite de oliva

OIMS: oleato de metilo proporcional en aceite de soja

OIML: oleato de metilo proporcional en aceite de linaza

OIMCom: oleato de metilo proporcional en la mezcla comercial

LoMO: linoleato de metilo proporcional en aceite de oliva

LoMS: linoleato de metilo proporcional en aceite de soja

LoML: linoleato de metilo proporcional en aceite de linaza

LoMCom: linoleato de metilo proporcional en la mezcla comercial

LnMO: linolenato de metilo proporcional en aceite de oliva

LnMS: linolenato de metilo proporcional en aceite de soja

LnML: linolenato de metilo proporcional en aceite de linaza

LnMCom: linolenato de metilo proporcional en la mezcla comercial

Proporciones de aceites en la mezcla metílica (programación lineal)

X: proporción de Oliva MeOH añadido al total de la mezcla metílica

Y: proporción de Soja MeOH añadido al total de la mezcla metílica

Z: proporción de Linaza MeOH añadido al total de la mezcla metílica

Aceites transesterificados

Oliva MeOH: aceite de oliva transesterificado con metanol

Soja MeOH: aceite de soja transesterificado con metanol

Linaza MeOH: aceite de linaza transesterificado con metanol

Oliva EtOH: aceite de oliva transesterificado con etanol

Soja EtOH: aceite de soja transesterificado con etanol

Linaza EtOH: aceite de linaza transesterificado con etanol

3. INTRODUCCIÓN

3.1 La polinización como relación simbiótica entre plantas y animales

Las interacciones (Stein, K. et al. 2017) entre plantas con flores y sus polinizadores animales proporcionan a ambos un beneficio mutuo, siendo además esta relación un componente fundamental en la biodiversidad del ecosistema.

La polinización, especialmente la realizada por insectos, es un elemento clave en el funcionamiento de un ecosistema. Esto es debido a que, además de garantizar la reproducción sexual de las plantas, los rendimientos de las cosechas son estabilizados, se mantiene la variabilidad genética de los cultivos y se contrarresta la autopolinización, lo que significa una mayor resistencia del sistema.

3.1.1 *Función de las abejas en los ecosistemas*

Los polinizadores (Bradbear, N. 2009) tienen un papel fundamental en las relaciones del ecosistema, así como en su conservación, variabilidad genética en la flora, y en la especialización y evolución de las especies. Dentro de los polinizadores, las abejas son una de las especies más imprescindibles. Un gran número de especies desaparecería si las abejas se extinguieran, esto ocurre en ecosistemas tan diversos como la sabana, los bosques tropicales o los manglares. Esto es debido a que la producción de semillas, bayas y frutos es muy dependiente de la polinización de los insectos, siendo la abeja el más importante de todos ellos. En áreas de cultivo, las abejas son necesarias para la polinización de los cultivos.

Además, la polinización (Stein, K. et al. 2017) realizada por abejas aumenta de forma destacable el rendimiento y calidad de las cosechas, además, la exclusión de polinizadores propicia la autopolinización, que deriva en un descenso de la producción y su calidad.

En resumen, (Bradbear, N. 2009) el papel fundamental de las abejas en el ecosistema es su trabajo como polinizadoras. Otras especies animales también están conectadas con las abejas, bien sea porque se alimentan de la miel o las crías, de polen o de cera, bien porque son parásitos de las abejas o simplemente porque viven en la colmena o sus alrededores.

3.1.2 Reducción de la población de abejas

Durante las últimas décadas ha habido una pérdida destacable de polinizadores en los ecosistemas, incluyendo la abeja melífera. De hecho, en Estados Unidos (Presidential Memorandum 2014) este descenso de la población se ha tomado como una seria amenaza para la apicultura y la polinización, por lo que se han tomado medidas federales como un plan para la información de la población o el aumento del hábitat disponible.

Por su parte, la Comisión Europea (European Commission [en línea]) también ha tomado medidas al respecto para los países miembros, las cuales van desde la elaboración de informes hasta la realización de proyectos de investigación como el SWARMONITOR, un proyecto para monitorizar el estado de una colmena, o el SMARTBEES, que busca identificar los aspectos cruciales en la resistencia de la colmena frente a virus y a *Varroa*, un género de ácaros del que se hablará posteriormente.

Las pérdidas de individuos parecen ser un cúmulo de factores, entre los que se encuentran una nutrición pobre, la reducción de su hábitat, parásitos y patógenos, la falta de diversidad genética y la exposición a pesticidas.

Pero es quizá, la aplicación masiva de insecticidas neonicotinoides, el mayor riesgo global contra las poblaciones de abejas. Los efectos de dosis subletales (Wu Y.Y. et al. 2017) sobre *A. mellifera* han generado la prohibición por parte de los Estados miembros de la UE del uso de tres pesticidas neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid y tiametoxam) en espacios abiertos.

3.2 Métodos de síntesis de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga

3.2.1 Método clásico

En la reacción de transesterificación de un aceite o grasa animal, los triglicéridos reaccionan con un alcohol, generalmente metanol o etanol, produciendo ésteres (biodiésel) y glicerina, tal como se muestra en la figura. Para que la reacción transcurra a una velocidad adecuada, es necesaria la presencia de un catalizador en el medio, que puede ser ácido o básico. Algunos de los catalizadores más usados son el ácido sulfúrico o el hidróxido de potasio.

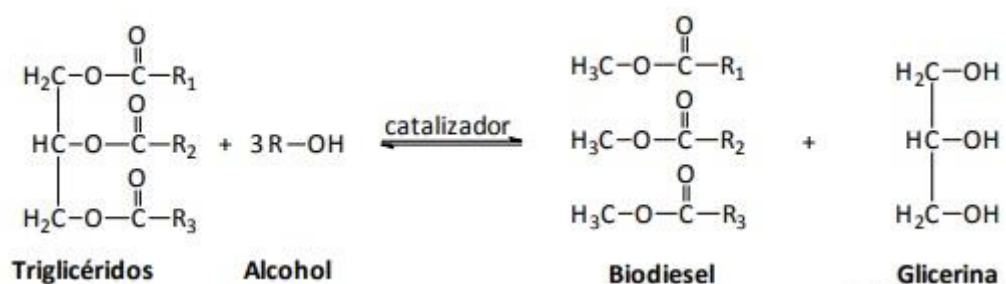


Figura 1. Esquema de la reacción de transesterificación de un triglicérido

El mecanismo propuesto (Figura 2) para la reacción catalizada básicamente, que será el usado, empieza por el ataque nucleófilo del grupo metoxi a un carbono carbonílico y posterior eliminación.

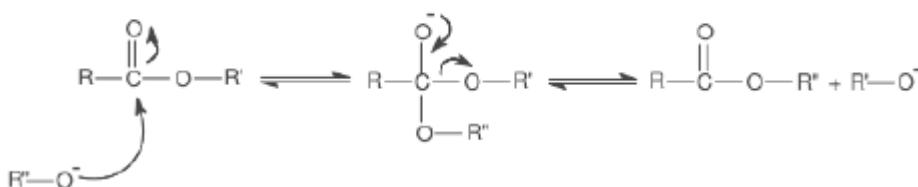


Figura 2. Esquema del mecanismo de la reacción de transesterificación

La reacción de transesterificación clásica necesita agitación continua debido a que hay dos fases inmiscibles (alcohol+catalizador y aceite), también necesita una temperatura de unos 60-70°C. La transesterificación clásica de los triglicéridos a ésteres metílicos grasos (FAME) es lenta, por lotes y además no es total, ya que no todos los ácidos grasos se convierten en ésteres de alquilo. Por si fuera poco, la reacción debe hacerse a reflujo durante al menos 60 minutos. Todos estos factores hacen que la reacción clásica no sea sostenible medioambientalmente debido a la gran cantidad de recursos consumidos. Es por esto que se deben buscar otras alternativas para hacer la reacción más eficiente como puede ser el uso de microondas o ultrasonidos.

3.2.2 Asistida por microondas

Las moléculas polares (Sajjadi, B. et al. 2014) dentro del espectro de microondas tratan de alinearse con las líneas de campo magnético, que son constantemente cambiadas. De esta forma, la molecular polar tiene que rotar rápidamente, lo que resulta en una liberación de energía en forma de calor debido a la fricción entre las moléculas.

La reacción de transesterificación asistida por microondas implica la aparición de “puntos calientes”, lugares donde la temperatura alcanza valores muy superiores a los de la masa reaccionante. De esta forma, el calentamiento por microondas es mucho más eficiente si se compara con los métodos clásicos.

El calentamiento, además, actúa en la escala molecular. Esto deriva en un notable decrecimiento del tiempo necesario de reacción. Si con los métodos clásicos las reacciones de transesterificación duran más de una hora; con la ayuda de microondas, el tiempo se reduce a un máximo de diez o quince minutos.

Por si fuera poco, las reacciones asistidas con microondas tienen un mejor rendimiento si las comparamos con la reacción clásica. Tampoco es necesario el uso de reflujo ni de calentamiento externo.

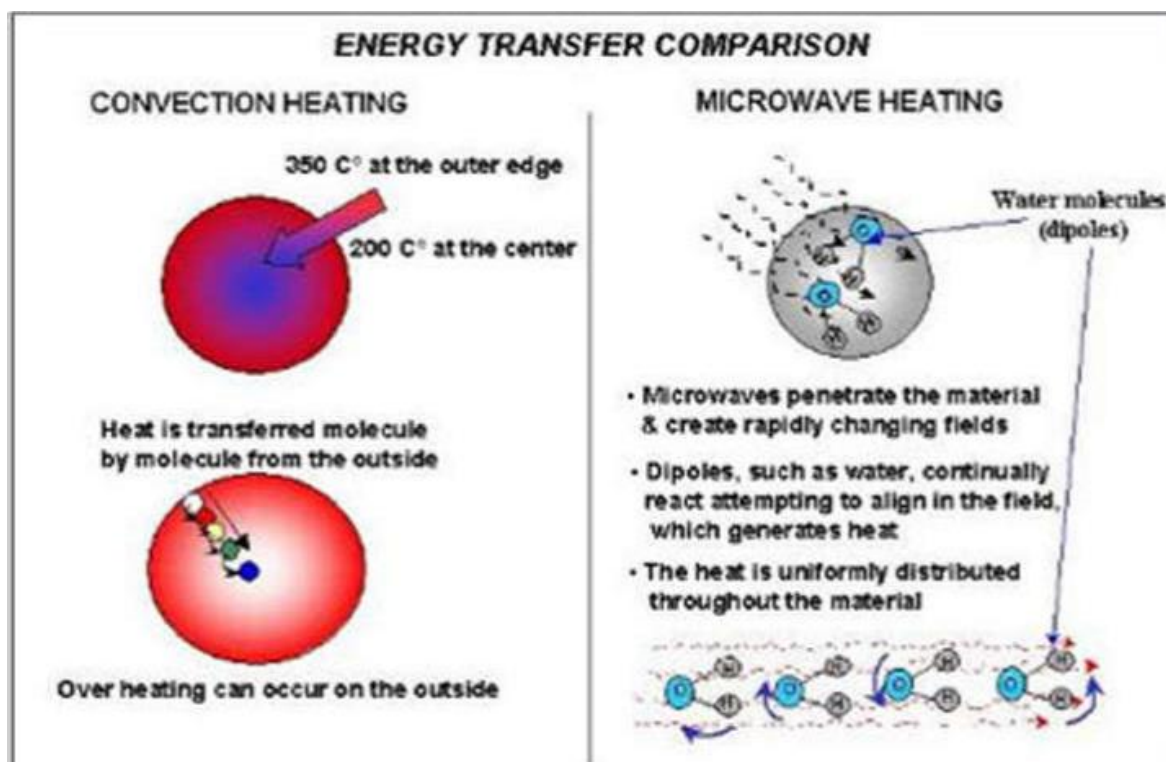


Figura 3. Esquema del fundamento de las microondas

3.2.3 Asistida por ultrasonidos

Los ultrasonidos (Buchori, L. et al. 2016) son aquellos sonidos cuya frecuencia es superior a la que un humano puede oír, el rango de frecuencias concreto va de los 20kHz a los 100MHz. Además, los ultrasonidos son una fuente de mejora de los parámetros de algunas reacciones, tales como la velocidad de reacción, el rendimiento, la conversión o el tiempo de reacción. A veces, modifican incluso el propio mecanismo de la reacción.

Para la transesterificación de triglicéridos con un alcohol asistida por ultrasonidos se usa una frecuencia baja dentro del rango anteriormente mencionado. Los ultrasonidos proporcionan la energía mecánica para el mezclado, así como la energía de activación necesaria para el inicio de la reacción.

La reacción entre las dos fases inmiscibles (triglicérido y alcohol+catalizador) se producirá únicamente en la interfase entre los líquidos. La velocidad de transferencia de masa puede ser aumentada por los ultrasonidos. En este proceso, la energía proporcionada por la sonda creará cavidades en los líquidos inmiscibles, que formaran microburbujas. Este proceso de cavitación deriva en una profunda emulsificación de ambas fases. Además, la cavitación puede contribuir al incremento local de temperatura, lo que se traduce en una mejor reacción. Es por esto que no se requiere el uso de agitación ni de aporte de calor externo.

3.3 Feromona de cría a partir de aceites comerciales

3.3.1 Efectividad de la feromona comercial sobre las colonias

El comportamiento y la fisiología (Moeri, O. et al. 2011) de la abeja *Apis Mellifera* está determinado por un gran número de feromonas. Una de las más importantes es la feromona de cría, ya que es en gran medida responsable del futuro de la colonia.

Se ha determinado que esta feromona es una mezcla de diez ésteres de ácidos grasos que son producidos en las glándulas salivales de las larvas.

Entre sus efectos en la colmena, se sabe que la feromona de cría está relacionada con el momento la primera salida de las abejas obreras al exterior. Además, se ha observado un incremento del número de individuos que recolectan polen, así como de la frecuencia y cantidad de recolección por viaje, entre otros efectos. Es por esto que las colmenas son más vigorosas cuando la feromona de cría está presente, lo que tiene un marcado sentido evolutivo.

A pesar del gran número de beneficios potenciales del tratamiento con feromona de cría, el desarrollo de un producto comercial ha sido dificultado por varios motivos, como por ejemplo que cuatro de los diez componentes son inestables. Esto se ha suplido mediante la adición de butilhidroquinona terciaria (TBHQ) a la mezcla.

3.3.2 Tratamiento de las colmenas con Superboost®

Las colmenas se tratan con la feromona en varias ocasiones. En primer lugar se busca un mayor crecimiento de la colmena tras el invierno. Tras los experimentos realizados (Moeri, O. et al. 2011), se concluye que la colmena tratada tiene un mayor número de individuos, mayor área de cría en el panal, mayor consumo de polen y un mayor número de colmenas hijas. Además, la producción de polen de las plantas alrededor de la colmena aumenta.

Por otra parte, hay también tratamientos que se centran en la producción de miel, a veces se combinados en varias tomas (Lait, C et al. 2012). En cualquier caso, la producción de miel aumenta considerablemente cuando la colmena es tratada con la feromona de cría, tal y como puede verse en la figura 4.

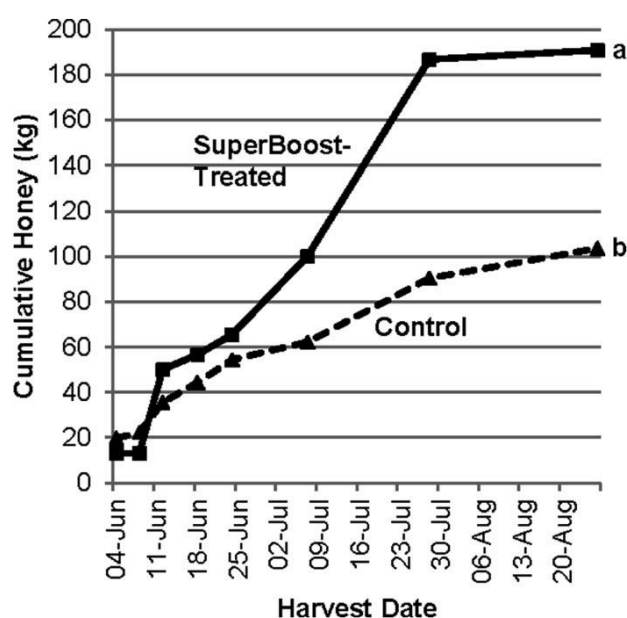


Figura 4. Miel recogida en colmenas tratadas y sin tratar

3.3.3 Composición de la feromona comercial

SuperBoost® es (Moeri, O. et al. 2011) un producto comercial registrado cuyos componentes principales son una mezcla de diez sustancias no volátiles que se encuentran en la feromona de cría de abejas. Estos componentes se listan en la tabla 1.

SuperBoost® necesita además otros productos en menor proporción, como la butil hidroquinona terciaria (TBHQ). Este componente es un antioxidante que se añade para evitar la oxidación de algunas sustancias presentes en la feromona.

Componente	Porcentaje (%)
Palmitato de metilo (PM)	2,11
Palmitato de etilo (PE)	4,19
Estearato de metilo (EM)	17,30
Estearato de etilo (EE)	8,04
Oleato de metilo (OIM)	21,66
Oleato de etilo (OIE)	7,50
Linoleato de metilo (LoM)	8,09
Linoleato de etilo (LoE)	3,82
Linolenato de metilo (LnM)	16,53
Linolenato de etilo (LnE)	10,77
Butilhidroquinona terciaria	0,05

Tabla 1. Composición del producto SuperBoost®

3.3.4 Inconvenientes de la feromona

El principal problema de la feromona es que algunos de sus componentes pueden atraer a especies que atacan a las abejas o a sus crías. Aquí se nombran algunos ejemplos:

- **Ácaros del género *Varroa*.** Algunos componentes (Le Conte et al. 1989) de la feromona, en concreto, los palmitatos y el linoleato de metilo atraen a los ácaros del género *Varroa*. Este ácaro se adhiere a las abejas y se alimenta de la hemolinfa de estas. Esto provoca un acortamiento de su vida, anomalías en el comportamiento y un aumento de la posibilidad de contraer otras infecciones.
- ***Vespa Velutina*.** Se han identificado (Ortiz, A. et al. 2018) algunos semioquímicos de la avispa asiática *Vespa Velutina* como el oleato de etilo y el estearato de etilo, los cuales tienen una respuesta positiva en electroantenografía.

La *Vespa Velutina* (Leza, M. et al. 2017) es una especie de avispa invasora introducida en Europa en 2004. Actualmente está presente en Francia, Italia, España, Portugal, Alemania, Bélgica, Reino Unido y Suiza. Este insecto se alimenta de abejas melíferas (*Apis Mellifera*), pero también de otros polinizadores e insectos, lo que repercute enormemente en los ecosistemas. Además, algunas actividades económicas como la producción de miel también se pueden ver gravemente afectadas. En la figura 5 se puede ver una comparación de la *Vespa Velutina* con las especies autóctonas.

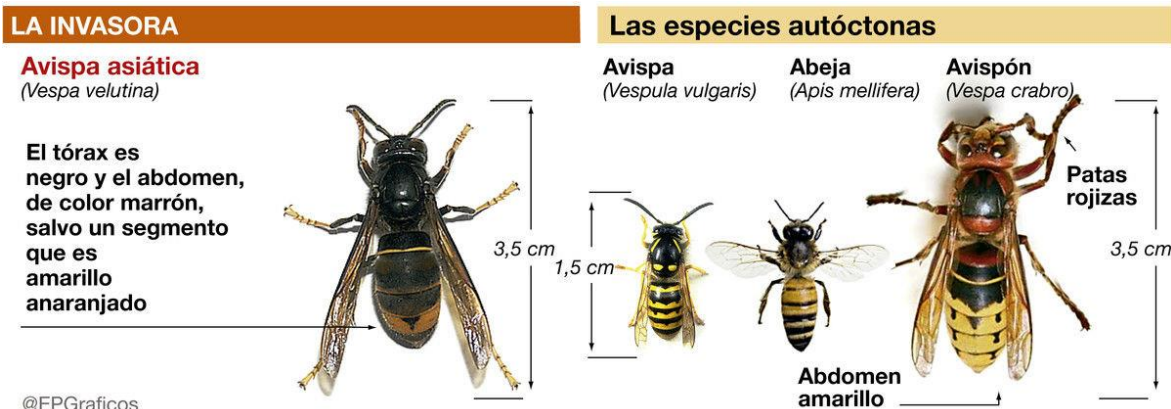


Figura 5. Comparación de la Vespa Velutina con las especies autóctonas

Aunque estas especies pueden causar problemas a la colmena, se ha decidido probar la eficacia de esta feromona de todos modos. En primer lugar, porque los ácaros Varroa son un problema común de los apicultores por lo que sería interesante comprobar si es mejor tratar o no las colmenas.

En segundo lugar, la *Vespa Velutina* aún no está extendida por toda España, por lo que hay zonas libres de ella donde poder probar la feromona sin preocupación. Cierto es que la invasión se puede extender en el futuro, pero se ha decidido no tener en cuenta este hecho, ya que se pueden tomar medidas futuras para su control.

3.3.5 Producción de la feromona a partir de aceites transesterificados

Debido a la composición que presenta la feromona comercial, cuyos efectos ya han sido demostrados (Moeri, O. et al. 2011), se ha decidido producir esta a partir de aceites comerciales transesterificados.

Los aceites vegetales están principalmente por ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga. La transesterificación de estos aceites dará lugar a los ésteres de esos ácidos grasos. Por ejemplo, si un aceite contiene ácido oleico, dará lugar a oleato de etilo o de metilo, dependiendo del alcohol usado en la reacción.

Una ventaja del uso de aceites vegetales es que estos presentan antioxidantes. Estas sustancias no deben tener problema en aguantar las reacciones de transesterificación, luego la feromona que se haga a partir de aceites tendrá una pequeña proporción de antioxidantes.

No existe un aceite con el perfil de ácidos grasos tal que pueda dar lugar a la mezcla comercial de feromona, pero sí existen muchos tipos de aceites, cada uno de ellos rico en uno o varios ácidos grasos, cuyos ésteres alcohólicos están incluidos en la feromona de cría. La idea es obtener la feromona comercial a partir de las mezclas de varios aceites una vez transesterificados con metanol o etanol.

Debido al alto precio (Sigma-Aldrich [en línea]) de algunos ácidos insaturados, sobre todo linoleico y linolénico y al bajo precio de los saturados, se decidió buscar aceites ricos en ácidos insaturados, mezclarlos en las proporciones adecuadas y perfilar la mezcla final si fuera necesario añadiendo ésteres saturados al final.

Ácidos	Cantidad	Precio (€)
Palmítico	1 Kg (95 %)	44
Esteárico	1 Kg (95 %)	44
Oleico	1 L (90%)	44
Linoleico	1 Kg (95%)	400
Linolénico	10 mL (70%)	106

Tabla 2. Precios de los ácidos grasos

Por lo tanto, los aceites escogidos para intentar hacer la feromona serán:

- **Aceite de oliva.** Es un aceite muy fácil de conseguir en la provincia de Jaén debido a la numerosa producción de este en la zona. Se destina principalmente para el consumo humano. Es muy rico en ácido oleico, aspecto interesante ya que el oleato de metilo es el componente en mayor proporción de la mezcla final. Su precio oscila dependiendo de la calidad de este, pero suele estar en torno a 4 o 5 euros el litro.
- **Aceite de soja.** Es un aceite accesible en las grandes superficies, así como en compra online. Es rico en ácido linoleico y se destina también a consumo humano, siendo este menos extendido que el aceite de oliva. Su precio está en torno a 2,5 euros por litro.
- **Aceite de linaza.** Es un aceite que no se suele destinar al consumo humano sino a la protección de madera que está en el exterior. Es muy rico en ácido alfa-linolénico, sobre todo después de haber sido tratado (Chen, T.C. y Ju, Y.H. 2001). Puede encontrarse a un precio asequible por internet o en tiendas de pinturas o bricolaje. Su precio es de unos 12 euros por litro.

4. OBJETIVOS

- Obtener un producto de similar efecto al de la feromona comercial Superboost a un precio asequible
- Elección de aceites comerciales asequibles como fuente de ésteres de ácidos grasos.
- Puesta a punto de un método de transesterificación asistida por microondas de aceites comerciales (oliva, soja y linaza).
- Viabilidad del uso de ultrasonidos como método de transesterificación de aceites.
- Uso de programación lineal para la optimización de mezclas complejas.

A continuación, en la figura 6, se resumen las partes en las que se estructura el trabajo para lograr estos objetivos.



Figura 6. Esquema del proceso general

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales Empleados

Los materiales empleados fueron los ácidos palmítico y esteárico, así como los aceites comerciales de oliva, soja y linaza. También se utilizaron metanol y etanol absoluto (Panreac). Por último, como catalizadores se usaron el ácido sulfúrico y el hidróxido de potasio.



Figura 7. Aceites usados (Soja, Linaza y Oliva)

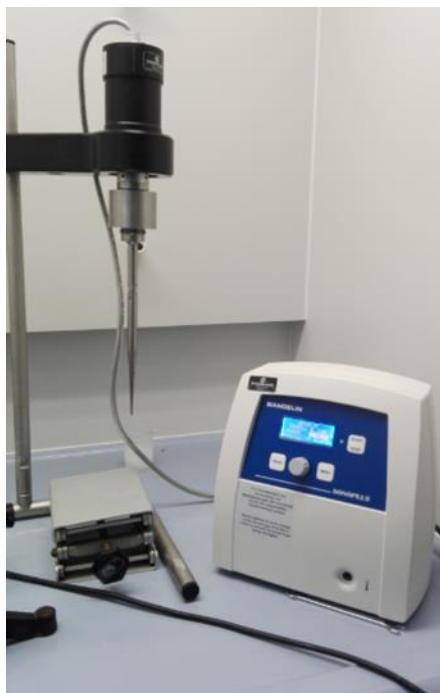
5.2 Reactor de microondas



Figura 8. Microondas del laboratorio

El equipo microondas es un CEM Corporation que usa el software Synergy. Es un equipo monopolo que funciona a 2450MHz. Se usan reactores de vidrio de 10 mL de volumen. El programa usado para ácidos grasos fue de 4 minutos, 120°C, 120 psi, agitación media y potencia de 200W. Para aceites, el mismo programa con duración de 10 minutos.

5.3 Equipo de ultrasonidos



Se utilizó un equipo de ultrasonidos BANDELIN con generador GM3200, 200W de potencia máxima, 20kHz de frecuencia, rango de potencia entre 25-150W y 2,7Kg de peso. Para realizar transesterificaciones se usa el 40% de la potencia y un minuto de tiempo.

Figura 9. Ultrasonidos del laboratorio

5.4 Transesterificación de aceites por el método clásico

Se disuelven 0,4 g de KOH en 15 mL de metanol o etanol. Una vez disueltos, se calientan 9 mL de aceite en un matraz de fondo redondo con agitación hasta unos 35°C. Se mezclan el aceite y el metanol con KOH y se añaden 0,5 mL de diclorometano.

Se calienta la mezcla hasta unos 60-70°C y se deja durante dos horas a reflujo con un Dean-Stark. Transcurrido ese tiempo habrá dos fases, que se separan con un embudo de decantación. La fase superior será la que contiene los ésteres alquílicos.

Finalmente, se caracteriza el líquido obtenido con el cromatógrafo de gases (1 μ L en 1 mL de hexano).

5.5 Transesterificación de aceites asistida por microondas

Se prepara (Ortiz, A. J. y López, A.M. 2018) una disolución de 100 mL 0,05M de KOH en metanol y 100 mL 0,05M de KOH en etanol.

Se introducen 5 mL de la disolución alcohólica deseada en el reactor del microondas junto con 1g de aceite y un agitador magnético.

Se inicia la activación por microondas (10 minutos, 120°C, 120 psi, agitación media y potencia de 200W). Tras acabar la reacción se vierte el contenido en un vial y se deja reposar un tiempo. La cantidad de glicerina creada es muy inferior en comparación con la cantidad de biodiésel.

Finalmente, se caracteriza el líquido obtenido con el cromatógrafo de gases (1 μ L en 1 mL de hexano).

5.6 Transesterificación de aceites asistida por ultrasonidos

A 20 g de aceite (Ortiz, A. J. y López, A.M. 2018) se le añaden 11 ml de disolución 0,5%w/w de KOH en metanol (1:9 relación molar). Se somete la mezcla a ultrasonidos (us) al 40% de potencia y 1 minuto. Tras la reacción, se extrae con hexano la mezcla, (1 x 15 ml). Se elimina la fase acuosa (glicerina) y a la fase orgánica se le quita el hexano con el rotavapor.

Finalmente, se caracteriza el líquido obtenido con el cromatógrafo de gases (1 μ L en 1 mL de hexano).

5.7 Esterificación asistida por microondas de ácidos grasos saturados

Se vierten (Ortiz, A. J. y López, A.M. 2018) en el reactor del microondas 5mmol de ácido graso saturado, 3 mL de metanol o etanol, 0,25 mL de ácido sulfúrico y un agitador magnético.

Se inicia el procedimiento del microondas (4 minutos, 120°C, 120 psi, agitación media y potencia de 200W). Una vez acabada la reacción se decanta el contenido, añadiendo hexano para facilitar la separación. El hexano es posteriormente retirado con el rotavapor.

Finalmente, se caracteriza el sólido obtenido con el cromatógrafo de gases (1 mg en 1 mL de hexano).

5.8 Programación lineal

Se sabe la composición de la feromona comercial. Para formar esa feromona a partir de aceites transesterificados, primero se calcula la cantidad de cada ácido que posee cada aceite (se transesterifica y se calcula experimentalmente).

Después, se calcula qué cantidad de cada aceite se necesita para conseguir la mezcla deseada mediante dos programaciones lineales, una para los ésteres metílicos y otra para los etílicos. Inicialmente, se intentaron usar todas las sustancias como criterio para la programación lineal, pero esto deriva en que existen 5 condiciones distintas que cumplir, por lo que el programa no pudo encontrar ninguna solución.

Finalmente, para las condiciones de contorno se usan las cantidades de ácidos insaturados (oleico, linoleico y linolénico), ya que estos son los más caros. Los ésteres saturados (palmitato y estearato), se añaden posteriormente en la proporción adecuada.

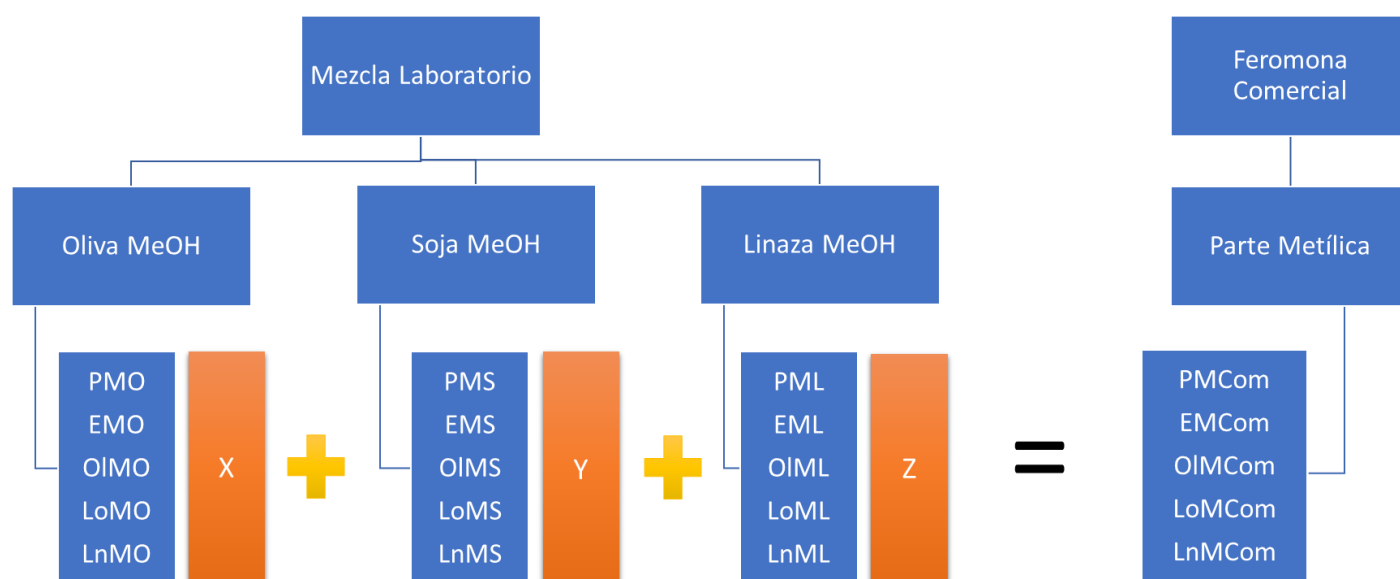


Figura 10. Esquema de la programación lineal metílica

Las condiciones de contorno escogidas para la programación lineal metílica son las siguientes:

$$OIMO \cdot X + OIMS \cdot Y + OIML \cdot Z = OIMCom \quad (1)$$

$$LoMO \cdot X + LoMS \cdot Y + LoML \cdot Z = LoMCom \quad (2)$$

$$LnMO \cdot X + LnMS \cdot Y + LnML \cdot Z = LnMCom \quad (3)$$

Además, al ser X, Y y Z proporciones, estas deben sumar 1.

Hay que recordar que:

- X es la proporción de Oliva MeOH añadido al total de la mezcla metílica
- Y es la proporción de Soja MeOH añadido al total de la mezcla metílica
- Z es la proporción de Linaza MeOH añadido al total de la mezcla metílica

Del mismo modo se realiza para la programación etílica, cambiando esta vez solo los valores solución de la mezcla comercial.

5.9 Detección GC-FID

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) Agilent 7820A con una columna SP-2380 (Supelco) de dimensiones 30mx0,25mmx0,2µm con detector de llama (FID). La temperatura del inyector fue 110°C, la del detector 300°C. El software usado fue EZChrom Elite y el programa de temperaturas el que se indica en la figura 11.

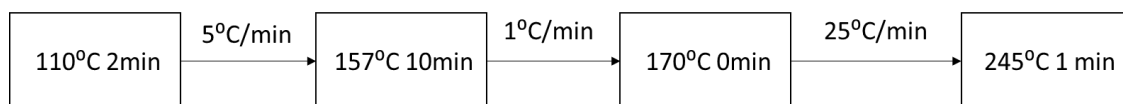


Figura 11. Esquema del programa de temperaturas usado

5.10 Cromatografía de gases-masas (GC-MS)

La determinación de los productos obtenidos se hizo mediante cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS).

El equipo utilizado fue un Focus GC-DSQ II GC-MS Thermo Scientific. El equipo consta de un cromatógrafo Focus II (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas DSQ II de cuadrupolo simple (Thermo Scientific). El cromatógrafo está equipado con un inyector split-splitless y una columna capilar DB-5 (30 m x 0.25mm, 0.25 µm film). El programa de temperaturas utilizado fue el mismo usado en el análisis mediante GC. La temperatura del inyector a 280 °C y la línea de transferencia a 280°C. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: Impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV, temperatura de 200°C, un barrido de scan de 0.6 s (tiempo de ciclo 0.2s) y con un rango de masas de 40 a 450 amu. La identificación se hizo mediante su coincidencia con las bases de datos NIST y Wiley 275L.

5.11 Formulación de emisores

Se disponen de viales de LDPE cuyas dimensiones son 32x6x8, longitud x i.d x e.d (mm) en los que se incluyen 200 mg de mezcla final y termosellados con un film barrera de aluminio.

5.12 Pruebas en campo

Las pruebas en campo se realizan de forma externa a este trabajo. Los viales fueron enviados a su destinatario y fue este quien se ocupó de la distribución y la toma de resultados de campo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comparación cualitativa de los distintos métodos de transesterificación

En primer lugar, hay que aclarar que los tres métodos probados son viables para el objetivo final, la producción de feromona. No obstante, se ha observado que el método clásico es muy poco eficiente si lo comparamos con los demás, ultrasonidos y microondas.

Usar microondas o ultrasonidos como asistencia a las reacciones de esterificación y transesterificación tiene numerosas ventajas. Por ejemplo, el tiempo de reacción disminuye notablemente y no es necesario estabilizar la temperatura del sistema. Además, el gasto energético y de recursos del método clásico es mucho mayor debido a la necesidad de usar refrigerante y mantener la temperatura de reacción durante varias horas.

La elección entre el uso de microondas o de ultrasonidos ya es más difícil. Si bien las reacciones con ultrasonidos duran algo menos de tiempo, la separación entre las fases es más lenta. Por su parte, el microondas permite un mejor control de las variables del proceso y la separación de fases es mucho más rápida.

Es por esto que se concluye que el uso de microondas es el mejor método para la reacción de transesterificación de aceites vegetales, seguido muy de cerca por los ultrasonidos. El método clásico debe ser evitado siempre que sea posible.

6.2 Producción de feromona

Se calcula experimentalmente la proporción de ácidos que contiene cada aceite. Esto se ha hecho calculando mediante GC y GC-MS. Estos datos se usarán en las programaciones lineales. A continuación se presentan los resultados de los distintos cromatogramas realizados (tablas 3-6).

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
PM	23,18	12,16
EM	32,60	3,19
OIM	34,82	76,44
LoM	36,58	6,18
LnM	38,28	2,03

Tabla 3. Resultados cromatograma Oliva MeOH

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
PM	23,23	2,87
EM	32,65	0,54
OIM	34,74	29,08
LoM	36,70	67,51
LnM	38,34	0,00

Tabla 4. Resultados cromatograma Soja MeOH

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
PM	23,25	6,08
EM	32,65	4,49
OIM	34,71	19,53
LoM	36,64	15,63
LnM	38,43	54,27

Tabla 5. Resultados cromatograma Linaza MeOH

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
PE	24,87	12,46
EE	34,77	3,17
OIE	35,89	75,29
LoE	37,20	4,94
LnE	38,80	1,21

Tabla 6. Resultados cromatograma Oliva EtOH

Cabe destacar que en los cromatogramas aparecen proporciones pequeñas de compuestos no identificados, por lo que los porcentajes pueden variar ligeramente entre cada muestra.

% Ácido	Aceite Oliva	Aceite Soja	Aceite Linaza
Palmitico	12,16	2,87	6,08
Esteárico	3,19	0,54	4,49
Oleico	76,44	29,08	19,53
Linoleico	6,18	67,51	15,63
Linolénico	2,03	0,00	54,27

Tabla 7. Contenido porcentual experimental en ácidos de cada aceite

Hay que saber que en la programación lineal se usaron los datos de la tabla 7. En el caso del ácido linolénico del aceite de soja (LnMS), el valor de 0% indicado en la tabla 7 es un error puesto que el aceite de soja sí contiene ácido linolénico. El error fue descubierto demasiado tarde, cuando los viales con la mezcla final habían sido enviados. Posteriormente, y a modo de prueba, se determinó que el porcentaje es de aproximadamente un 7% y que este factor no afectaba demasiado a la programación lineal. A efectos prácticos se considera que este error no ha ocurrido.

Con los cromatogramas realizados se puede construir una tabla con los tiempos de retención de cada éster para el programa del cromatógrafo usado.

Éster	Tiempo de Retención (min)
Palmitato de metilo	23,11
Palmitato de etilo	24,76
Estearato de metilo	32,65
Oleato de metilo	34,58
Estearato de etilo	34,66
Oleato de etilo	35,69
Linoleato de metilo	36,56
Linoleato de etilo	37,17
Linolenato de metilo	38,32
Linolenato de etilo	38,78

Tabla 8. Tiempos de retención experimentales de los ésteres

Para el cálculo de la cantidad de cada componente que debe llevar la mezcla habrá que realizar dos programaciones lineales, una para los ésteres metílicos y otra para los ésteres etílicos.

Es por esto que las composiciones de cada aceite y del producto comercial se expresan en proporción respecto de cada tipo de éster, es decir, cuando se dice que el producto comercial tiene una proporción de 0,0321 en palmitato de metilo (PMCom), se quiere decir que de todos los ésteres metílicos de la mezcla comercial (siendo el total la unidad), 0,0321 serán palmitato de metilo.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtienen las siguientes tablas 9 y 10.

Componente Metílico	Aceites			Producto Comercial
	Oliva	Soja	Linaza	
Palmitato de metilo (PM)	0,1216	0,0287	0,0608	0,0321
Estearato de metilo (EM)	0,0319	0,0054	0,0449	0,2635
Oleato de metilo (OIM)	0,7644	0,2908	0,1953	0,3299
Linoleato de metilo (LoM)	0,0618	0,6751	0,1563	0,1228
Linolenato de metilo (LnM)	0,0203	0,0000	0,5427	0,2518

Tabla 9. Composiciones proporcionales de aceites y producto comercial en ésteres metílicos

Componente Eílico	Aceites			Producto Comercial
	Oliva	Soja	Linaza	
Palmitato de etilo (PE)	0,1216	0,0287	0,0608	0,1221
Estearato de etilo (EE)	0,0319	0,0054	0,0449	0,2343
Oleato de etilo (OIE)	0,7644	0,2908	0,1953	0,2185
Linoleato de etilo (LoE)	0,0618	0,6751	0,1563	0,1113
Linolenato de etilo (LnE)	0,0203	0,0000	0,5427	0,3138

Tabla 10. Composiciones proporcionales de aceites y producto comercial en ésteres eílicos

Mediante la herramienta Solver de Microsoft Excel se realizan sendas programaciones lineales. Las condiciones de contorno escogidas son las que delimiten los ésteres de ácidos insaturados. De modo que, para los ésteres metílicos, las condiciones de contorno son las indicadas más abajo (ecuaciones 4-9):

$$OlMO \cdot X + OlMS \cdot Y + OlML \cdot Z = OMCom \quad (4)$$

$$LoMO \cdot X + LoMS \cdot Y + LoML \cdot Z = LoMCom \quad (5)$$

$$LnMO \cdot X + LnMS \cdot Y + LnML \cdot Z = LnMCom \quad (6)$$

$$0,7644 \cdot X + 0,2908 \cdot Y + 0,1953 \cdot Z = 0,2185 \quad (7)$$

$$0,0618 \cdot X + 0,6751 \cdot Y + 0,1563 \cdot Z = 0,1113 \quad (8)$$

$$0,0203 \cdot X + 0,0000 \cdot Y + 0,5427 \cdot Z = 0,3138 \quad (9)$$

No hay que olvidar que $X+Y+Z=1$ porque se trabaja con proporciones.

Así se obtienen las proporciones indicadas en la tabla 11, las cuales indican la cantidad de cada aceite transesterificado en la mezcla correspondiente (etílica o metílica).

Mezcla	X	Y	Z
Metílica	0,4535	0,0745	0,4720
Etílica	0,2456	0,0365	0,7179

Tabla 11. Soluciones de las programaciones lineales

Sin embargo, las cantidades teóricas obtenidas con estas mezclas serían muy distintas a las que tiene la feromona comercial (Tabla 12).

Éster saturado	Proporción en su mezcla (metílica o etílica)	Proporción objetivo	Diferencia
Palmitato de metilo (PM)	0,0720	0,0321	0,0399
Estearato de metilo (EM)	0,0336	0,2636	-0,2300
Palmitato de etilo (PE)	0,0516	0,1221	-0,0705
Estearato de etilo (EE)	0,0302	0,2343	-0,2041

Tabla 12. Comparación de valores teóricos y objetivos de los ésteres saturados con las soluciones de las programaciones lineales

Es por esto que deben añadirse algunos ésteres de forma externa, excepto en el caso del PM que sí existe un valor cercano. El porcentaje en peso a añadir será la diferencia entre la proporción objetivo y la teórica. Se ha decidido redondear al alza debido a que los ésteres saturados son mucho más baratos. Es por esto que se añade finalmente un 24% de EM a la mezcla metílica y un 8 % de PM y 21 % de EE a la mezcla etílica.

A partir de los cálculos realizados con programación lineal, se determina la composición cuantitativa de la mezcla y para ello, se preparan 4000 mg de muestra, cantidad necesaria para disponer de un volumen suficiente para la formulación de los emisores que se pondrán en las colmenas.

COMPONENTE	CANTIDAD (mg)
Mezcla Final	4000,0
Ésteres Metílicos (65,70%)	2626,9
Ésteres Etílicos (34,30%)	1373,1

Tabla 13. Cantidad total de ésteres etílicos y metílicos en el producto SuperBoost®

Los porcentajes de cada tipo de éster se obtienen de la composición de la feromona comercial, la cual está formada por un 65,70% de ésteres metílicos y un 34,30% de ésteres etílicos. Se ha obviado la presencia de otros componentes ya que están en menor proporción.

A continuación, se calcula la cantidad de cada componente a partir de la programación lineal y la adición posterior de ésteres.

ÉSTERES METÍLICOS	CANTIDAD (mg)
Oliva MeOH	905,5
Soja MeOH	148,7
Linaza MeOH	942,3
Estearato de metilo (24% de los metílicos)	630,4
Total ésteres metílicos	2626,9

Tabla 14. Cantidad de cada componente metílico en la mezcla final

ÉSTERES ETÍLICOS	Cantidad (mg)
Oliva EtOH	239,4
Soja EtOH	35,6
Linaza EtOH	699,9
Estearato de etilo (21% de los etílicos)	288,4
Palmitato de etilo (8% de los etílicos)	151,7
Total ésteres etílicos	1373,1

Tabla 15. Cantidad de cada componente etílico en la mezcla final

Finalmente, se prepara la feromona en el laboratorio mezclando los componentes de las tablas anteriores. Se hacen dos mezclas distintas una para el polen y otra para la miel.

6.2.1 Caracterización de las feromonas de laboratorio

La primera mezcla final, realizada en marzo de 2018, tiene la composición indicada en la tabla 16.

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
Palmitato de metilo	23,11	4,06
Palmitato de etilo	24,76	6,51
Estearato de metilo	32,65	26,33
Oleato de metilo + Estearato de etilo	34,60	27,03
Oleato de etilo	35,69	5,7
Linoleato de metilo	36,56	6,39
Linoleato de etilo	37,17	1,41
Linolenato de metilo	38,32	16,08
Linolenato de etilo	38,78	4,5

Tabla 16. Abundancia relativa de cada éster en la 1ª mezcla final

Si comparamos estos resultados con la proporción teórica, vemos que hay diferencias en algunos de los componentes, esto puede deberse a las pequeñas variaciones de composición entre aceites, además de la presencia de otros componentes minoritarios de estos, como los antioxidantes. No hay que olvidar también que la programación se hizo con algún valor erróneo de partida, como ya se indicó anteriormente. Como la mezcla finalmente iba a ser probada en campo, se decidió continuar con esta composición y ver los resultados.

%Área GC	Éster	Proporción Teórica	Diferencia
0,0414	Palmitato de metilo	0,0322	0,0092
0,0664	Palmitato de etilo	0,0603	0,0061
0,2686	Estearato de metilo	0,1209	0,1478
0,2758	Oleato de metilo + Estearato de etilo	0,2738	0,0020
0,0582	Oleato de etilo	0,1115	-0,0533
0,0652	Linoleato de metilo	0,0605	0,0047
0,0144	Linoleato de etilo	0,0568	-0,0424
0,1641	Linolenato de metilo	0,1240	0,0401
0,0459	Linolenato de etilo	0,1601	-0,1142

Tabla 17. Comparación de valores teóricos y experimentales de la 1ª mezcla final

Hay que tener en cuenta además que algunos picos del cromatograma no se separaron completamente, en concreto los del oleato de metilo y el estearato de etilo, los cuales tienen un tiempo de retención muy parecido. Tras la incapacidad de separarlos, se decidió mostrar la unión de ambos componentes.

Del mismo modo se prepara una segunda mezcla, en junio de 2018.

Éster	Tiempo de Retención (min)	Abundancia relativa (% Área)
Palmitato de metilo	23,11	12,29
Palmitato de etilo	24,76	1,10
Estearato de metilo	32,65	18,64
Oleato de metilo + Estearato de etilo	34,60	30,46
Oleato de etilo	35,69	4,50
Linoleato de metilo	36,56	7,20
Linoleato de etilo	37,17	1,80
Linolenato de metilo	38,32	19,33
Linolenato de etilo	38,78	4,69

Tabla 18. Abundancia relativa de cada éster en la 2ª mezcla final

En la segunda mezcla, la composición es parecida a la primera, aunque con ligeras desviaciones. Esto se debe seguramente a la preparación de las muestras, la cual se hizo de manera separada. No obstante, las diferencias no son muy grandes.

%Área GC	Éster	Proporción Teórica	Diferencia
0,1229	Palmitato de metilo	0,0322	0,0907
0,0110	Palmitato de etilo	0,0603	-0,0493
0,1864	Estearato de metilo	0,1209	0,0655
0,3046	Oleato de metilo + Estearato de etilo	0,2738	0,0308
0,0450	Oleato de etilo	0,1115	-0,0665
0,0720	Linoleato de metilo	0,0605	0,0115
0,0180	Linoleato de etilo	0,0568	-0,0388
0,1933	Linolenato de metilo	0,1240	0,0693
0,0469	Linolenato de etilo	0,1601	-0,1132

Tabla 19. Comparación de valores teóricos y experimentales de la 2ª mezcla final

6.3 Pruebas en campo de la feromona de laboratorio

Como ya se ha dicho anteriormente, se prepararon dos feromonas de composición parecida. Se enviaron 15 viales con 200mg de muestra cada uno. Las pruebas en campo fueron realizadas de forma externa a este trabajo.

Pese a no disponer de los resultados definitivos (a día de la presentación del trabajo no se disponen de ellos), una primera aproximación muestra un incremento en la producción de miel, por lo que la mezcla de laboratorio parece ser efectiva.

7. CONCLUSIONES

- Las transesterificaciones asistidas por microondas o ultrasonidos son más eficientes que las que usan método clásico, por lo que no se recomienda el uso de este.
- Es posible sintetizar un atrayente análogo a la feromona comercial de *Apis Mellifera* a partir de aceites comerciales, aportando cantidades adicionales de ésteres de ácidos saturados. A falta de confirmación definitiva, los efectos de la mezcla son parecidos a los del producto comercial SuperBoost®.
- Con el título “Síntesis asistida por microondas o ultrasonidos de la feromona de cría de *A. mellifera*” parte de este trabajo se ha incluido en una comunicación al IX Congreso Nacional de Apicultura que se celebrará en octubre 2018 en Tenerife.

8. LÍNEAS FUTURAS

- Averiguar qué componentes provocan un mayor efecto en la colmena para hacer un producto más rico en estos.
- Intentar minimizar los componentes de la mezcla que atraen a los posibles peligros de la colmena (*Vespa Velutina*, ácaros *Varroa*). Desarrollar medidas en contra de estas amenazas.
- Realizar un análisis profundo de costes.
- Analizar la escalabilidad del proceso para una producción mayor.
- Análisis de la producción de un polímero biodegradable (PLA) a partir de la glicerina sobrante y uso de este como emisor de campo de la feromona.

9. ANEXOS

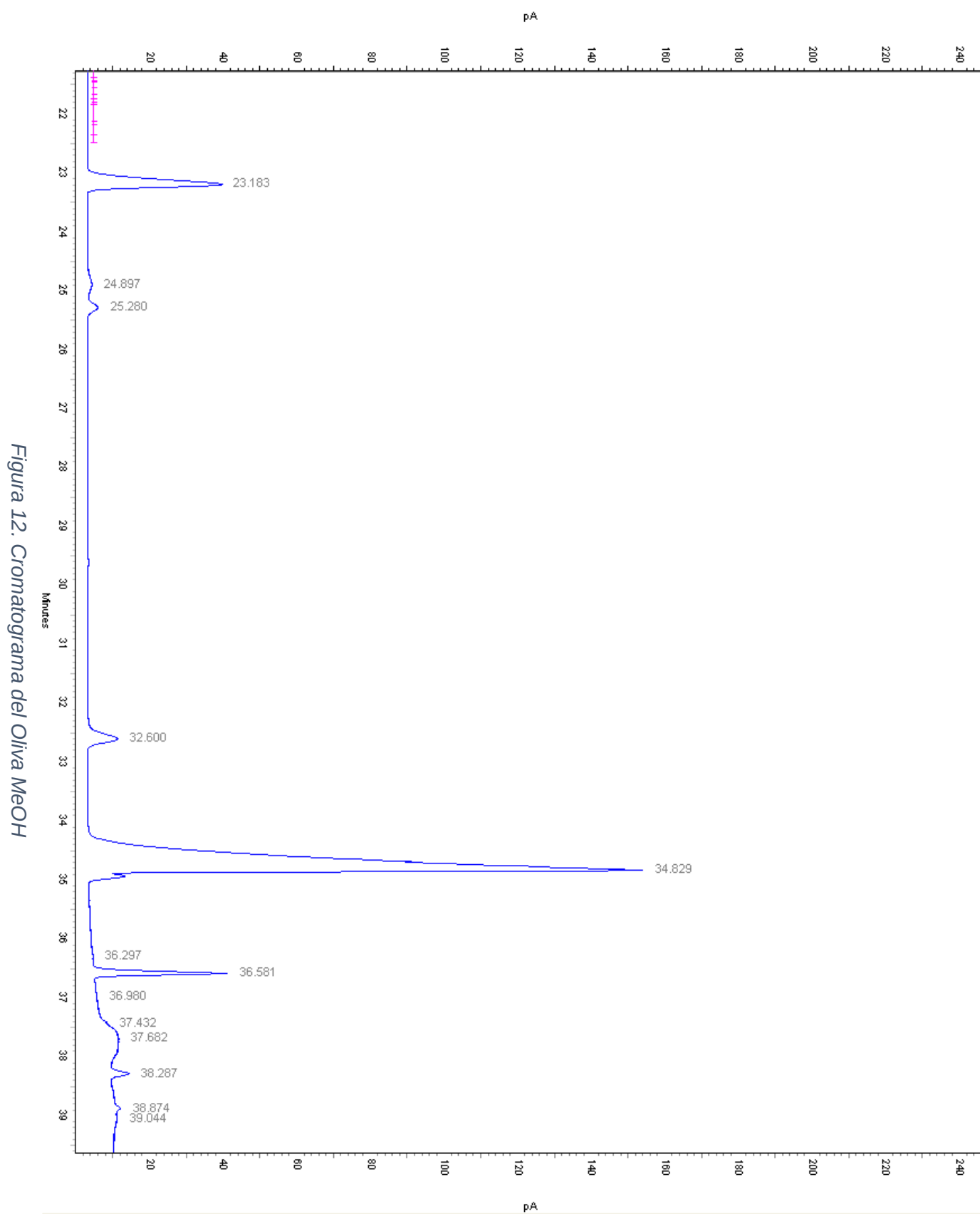


Figura 12. Cromatograma del Oliva MeOH

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADBEAR, N. Bees And Their Role In Forest Livelihoods. FAO: 2009.

BUCHORI, L., ISTADI, I. y PURWANTO, P. Advanced Chemical Reactor Technologies for Biodiesel Production from Vegetable Oils - A Review. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*, 2016, 3 (11), 406-430.

CHEN, T.C. y JU, Y.H. Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates from Borage and Linseed Oil Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2001, 5 (78), 485-488.

COLLISON, C. A Closer Look: Superboost®. *Bee Culture*. 2016.

EUROPEAN COMMISSION [en línea]. Honey Bees Research Projects. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/research_en

LAIT, C.G., et al. Treatment with Synthetic Brood Pheromone (SuperBoost®) Enhances Honey Production and Improves Overwintering Survival of Package Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology*, 2012, 2 (105), 304-312.

LE CONTE, Y., ARNOLD, G., TROUILLER, J. y MASSON, C. Identification of a Brood Pheromone in Honeybees. *Naturwissenschaften*, 1990, 7 (77), 334-336.

LE CONTE, Y., et al. Attraction of the Parasitic Mite Varroa to the Drone Larvae of Honey Bees by Simple Aliphatic Esters. *Science*, 1989, 4918 (245), 638-639.

LEZA, M., ANGEL MIRANDA, M. y COLOMAR, V. First Detection of *Vespa Velutina Nigrithorax* (Hymenoptera: Vespidae) in the Balearic Islands (Western Mediterranean): A Challenging Study Case. *Biological Invasions*, 2018, 7 (20), 1643-1649.

MOERI, O.E., et al. SuperBoost (R) Synthetic Brood Pheromone Enhances Spring Build-Up of Overwintered Honey Bee Colonies. *Journal of Apicultural Research*, 2011, 4 (50), 265-271.

OBAMA, B. Presidential Memorandum -- Creating a Federal Strategy to Promote the Health of Honey Bees and Other Pollinators. The White House: 2014.

ORTIZ, A. J. et al. Síntesis asistida por microondas o ultrasonidos de la feromona de cría de *A. mellifera*: IX Congreso Nacional de Apicultura en Tenerife, a celebrar del 25 al 27 de octubre de 2018.

ORTIZ, A. J. y LÓPEZ, A.M. Optimización de la feromona de cría de *Apis Mellifera Iberiensis* para su utilización comercial. TAUJA: 2018.

ORTIZ, A. J. y RODRÍGUEZ, V. Primeros ensayos para la identificación de un semioquímico con actividad atrayente para la avispa asiática *Vespa Velutina Lepeletier*, 1836. TAUJA: 2018.

SAJJADI, B., AZIZ, A.R.A. y IBRAHIM, S. Investigation, Modelling and Reviewing the Effective Parameters in Microwave-Assisted Transesterification. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2014, s/n (37), 762-777.

SIGMA-ALDRICH [en línea]. Precios de ácidos grasos. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

STEIN, K., et al. Bee Pollination Increases Yield Quantity and Quality of Cash Crops in Burkina Faso, West Africa. *Scientific Reports*, 2017, 17691 (7).

WU, Y., et al. Sublethal Effects of Imidacloprid on Targeting Muscle and Ribosomal Protein Related Genes in the Honey Bee *Apis Mellifera* L. *Scientific Reports*, 2017, 15943 (7).

Figura 1. Esquema de la reacción de transesterificación de un triglicérido. Disponible en: <http://calderon.cud.uvigo.es/bitstream/11621/8/1/Memoria%20Barros%20Pi%C3%B1ero%20Definitiva.pdf>

Figura 2. Esquema del mecanismo de la reacción de transesterificación Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Mecanismo-de-reaccion-de-transesterificacion-en-medo-basico-10_fig1_264236699

Figura 3. Esquema del fundamento de las microondas. Disponible en: <https://www.ewi.ca/microwave-information.html>

Figura 4. Miel recogida en colmenas tratadas y sin tratar. Lait, C. et al. 2012.

Figura 5. Comparación de la Vespa Velutina con las especies autóctonas
Disponible en: <http://juan-e-isa.blogspot.com/2017/09/vespa-velutina-la-avispa-asiatica.html>

Figura 6. Esquema del proceso general. Imagen de la *Apis Mellifera*. Disponible en: insectoid.info/bees/honey-bees/spanish-bee/

Figura 6. Esquema del proceso general. Imagen de una colmena de abejas.
Disponible en: <https://www.beeculture.com/closer-look-foraging-behavior/>

Figura 6. Esquema del proceso general. Imagen de gráfico esquemático.
Disponible en: <http://estadisticaparaelmanageexcel.blogspot.com/2012/06/importancia-y-utilidad-graficas.html>