

DESCRIPCIÓN

"FORMULACIÓN DE LIBERACIÓN LENTA"

Campo técnico

La presente invención se refiere a una formulación de liberación lenta, en particular a una formulación repelente de insectos que tiene un efecto de larga duración.

Antecedentes de la técnica

Los artrópodos terrestres y voladores representan los vectores más comunes para la transmisión de enfermedades a los seres humanos. Debido al aumento global de las temperaturas, se ha producido una expansión del número de regiones afectadas por estas enfermedades al convertirse en hábitats adecuados para sus respectivos vectores.

Un método para combatir las picaduras de estos artrópodos, y más concretamente de insectos, es utilizar repelentes de insectos. Los principios activos utilizados actualmente en la mayoría de los repelentes de insectos tópicos disponibles en el mercado son repelentes espaciales. Existen varios repelentes de insectos tópicos sintéticos aprobados en el mercado, entre los que se incluyen la DEET (*N,N*-dietiltoluamida), picaridina e IR3535, pero ninguno de ellos es ideal. Por ejemplo, la DEET tiene un olor penetrante, deja una sensación aceitosa y puede disolver plásticos y tejidos sintéticos. Asimismo, existe la percepción pública de que estas moléculas sintéticas son perjudiciales para la salud, lo que ha provocado un rápido crecimiento del mercado de alternativas naturales.

Se conoce una amplia gama de moléculas naturales que proporcionan un efecto repelente de insectos, pero la mayoría son demasiado volátiles y solo proporcionan protección durante un periodo de tiempo muy corto. De hecho, el *p*-mentano-3,8-diol (PMD), que es activo contra una gran variedad de insectos, es el único repelente de insectos natural reconocido por la Organización Mundial de la Salud, y tiene un punto de ebullición lo suficientemente elevado como para permitir que se evapore lentamente a lo largo de varias horas.

Los productos repelentes comerciales suelen tener una duración efectiva de entre 4 y 6 horas después de cada aplicación. Sin embargo, a medida que las especies de insectos que preocupan en un entorno determinado son desplazadas por

otras especies invasoras, los productos repelentes establecidos en el mercado pueden dejar de ofrecer una protección adecuada. Utilizando un ejemplo no limitativo, los repelentes de insectos tópicos disponibles en el mercado han sido diseñados para combatir los mosquitos que pican por la mañana o por la noche, donde es conveniente una corta duración de la acción. Con la expansión sin precedentes de la población de la especie de mosquito *Aedes* que se alimenta durante el día (comúnmente conocido como el mosquito tigre asiático), responsable de la transmisión del Zika, el virus del dengue y chikungunya, se requieren múltiples aplicaciones de los repelentes y formulaciones actualmente disponibles. Debido a los ocupados estilos de vida, la aplicación periódica de repelentes se olvida fácilmente hasta que se produce una picadura, dejando al usuario expuesto a la contracción de enfermedades. Para mitigar este problema, se pueden aplicar productos repelentes tradicionales que contienen mayores concentraciones de principio activo, pero el aumento de la exposición puede dar lugar a múltiples problemas como toxicidad e irritación.

Los repelentes tópicos y espaciales son moléculas volátiles que, tras su evaporación, proporcionan una zona protectora por encima de la piel o en el área circundante que impide que los mosquitos se posen y/o piquen a través de complejos mecanismos que no se conocen del todo. Cada principio activo tiene una tasa mínima de evaporación efectiva (MEER). Una tasa de evaporación superior a este umbral da lugar a una pérdida no productiva, lo que reduce el período de tiempo durante el cual el repelente es eficaz, tras lo cual la concentración ya no es suficiente para cumplir la MEER.

El desarrollo de productos repelentes de insectos que permiten la liberación controlada de sus principios activos debería superar muchos problemas relacionados con los actuales al aumentar la duración y, al mismo tiempo, reducir la concentración de principio activo necesaria. Debido a la menor cantidad de principio activo necesaria, esto supondría beneficios adicionales, como la reducción del olor, la reducción de la irritación y se evitaría la sensación grasa normalmente asociada a estos productos.

Asimismo, tales métodos serían atractivos porque potencialmente permitirían utilizar otros repelentes naturales, que actualmente no pueden utilizarse debido a su mayor volatilidad, lo cual es importante ya que una gama más amplia de moléculas repelentes viables podría reducir los incidentes de resistencia.

Se han divulgado dos soluciones técnicas principales para la liberación lenta de repelentes de insectos: la estrategia de atrapamiento y la estrategia de precursores.

En la estrategia de atrapamiento, la liberación lenta del repelente de insectos se obtiene por atrapamiento, por ejemplo, dentro de microcápsulas (por ejemplo, documento EP-A-0348550), lipoesferas (documento EP-A-0502119), matrices de polímeros (documento US4774082) o copolímeros (documento US6180127) a partir de las cuales el principio activo se libera lentamente con el tiempo desde la superficie de interés tras la aplicación del producto repelente a toda la superficie o, como en el caso de las pulseras repelentes, a una zona del cuerpo.

En la estrategia de precursores, la alteración de las características fisicoquímicas del principio activo mediante la preparación de un profármaco o la conjugación con una molécula portadora adecuada ofrece un método alternativo de liberación controlada, donde el principio activo se libera por mecanismos ambientales que pueden prolongar el tiempo durante el cual se mantiene la MEER, evitando al mismo tiempo la necesidad de aplicar un gran exceso de principio activo.

El uso de precursores, como profármacos y conjugados, es bien conocido en el ámbito farmacéutico. En cuanto a los principios activos repelentes de insectos, la conjugación de moléculas volátiles repelentes de insectos con compuestos que reducen la solubilidad en agua, tales como ácidos grasos (documento US-A-2004/014811), la preparación de profármacos de éster y éter solubles en agua (documento EP-A-2439188), acetales cíclicos con anillos de cinco y seis miembros como precursores de repelentes de insectos (documento WO-A-99/00377), conjugados solubles en agua con uno o más restos de azúcar (documentos JP-A-2000-096078, JP-A-H01-213291), conjugados con ácidos policarboxílicos o polioles para mejorar la solubilidad en agua (documento WO-A-2016/071521), conjugados con ácido hialurónico (documento WO-A-2016/071521), conjugados con portadores cristalinos (documento WO-A-2010/144755), conjugados a reticulados, composición de gel polimérico (documento US6846491), conjugados con vainillina (documentos WO-A-2007082306, WO-A-2017/081445), conjugados con cetonas o aldehídos (documento GB-A-2581375) y 3'-cetoglucósidos (documento WO-A-2021/160670).

La solicitud de patente europea EP-A-2862442 divulga una composición que comprende al menos un monoterprenoide, al menos un ácido y al menos un emulsionante.

Dichos métodos de la técnica anterior muestran desventajas con respecto a la aplicación de liberación lenta eficaz del repelente de insectos.

A pesar de las diversas propuestas disponibles en el estado de la técnica, todavía existe la necesidad de utilizar nuevas formulaciones para la liberación lenta de materiales activos, que muestren una tasa de liberación suficiente del principio activo para realizar el efecto, en particular un efecto repelente.

El aislamiento selectivo de *cis*-PMD y/o *trans*-PMD representa un desafío para el experto en la materia, y se han divulgado varias propuestas en la técnica.

Por ejemplo, en el documento CA-A-108341740 se divulga un método para preparar PMD, que se caracteriza por que se utiliza citronelal como materia prima, óxido de grafeno como catalizador, y agua como disolvente, y la configuración *cis*- y *trans* de dicho PMD se purifica disolviéndola en un disolvente orgánico, que es acetato de etilo, *n*-hexano o mezclas de los mismos a una temperatura de 50-80 °C y, a continuación, la temperatura se baja hasta temperatura ambiente para obtener cristales de *cis*-PMD, y de las aguas madres se obtiene *trans*-PMD.

En el documento US5959161 se divulga un método para producir para-mentano-3,8-diol que comprende la etapa de tratar citronelal con una solución acuosa de ácido sulfúrico de 0,02 a 1,0 % en peso en concentración, posteriormente, se separan el *cis*- y *trans*-PMD mediante cromatografía en columna utilizando un disolvente mixto de éter y *n*-hexano.

Por lo tanto, es necesario contar con un proceso eficiente para el aislamiento del *cis*- y/o *trans*-PMD.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es una formulación de liberación lenta.

Otro aspecto de la invención es el uso de dicha formulación.

Otro aspecto de la invención es la formulación de liberación lenta para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención es un método de uso de dicha formulación.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende dicha formulación.

Otro aspecto de la invención es el uso del compuesto PMD glucovainillina acetal de fórmula (II) para la liberación controlada de PMD.

Otro aspecto de la invención es un proceso para aislar *cis/trans*-PMD racémico.

Figuras

La Figura 1 muestra los ocho estereoisómeros de PMD.

Las figuras 2.1 y 2.2 muestran las estructuras químicas de otros compuestos repelentes de insectos.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es una formulación de liberación lenta, que comprende:

- a) *p*-mentano-3,8-diol (PMD),
- b) un glucósido,
- c) un ácido orgánico, y
- d) una sal de haluro de metal divalente

Los autores de la presente invención han desarrollado una formulación que comprende PMD, un glucósido, un ácido orgánico y una sal de haluro de metal divalente, que puede liberar PMD en las superficies, tal como la piel humana. Sorprendentemente, debido a un perfil de liberación más lineal, la formulación de la invención es capaz de liberar una concentración eficaz de PMD, un alcohol volátil, sobre la piel humana para actuar, por ejemplo, como repelente de insectos, durante un largo período, que normalmente tiene una duración de al menos 24 horas, es decir, mayor que el observado con el suministro del alcohol repelente libre.

Los autores de la presente invención han desarrollado una formulación que comprende un glucósido, que proporciona una liberación lenta en comparación con el PMD libre, cuando se combina con el PMD libre, un ácido orgánico y una sal de haluro de metal divalente.

Como se muestra en los ejemplos, diferentes glucósidos son adecuados para la liberación lenta de PMD, tales como, por ejemplo, metil- α -glucósido, hexil

glucósido, fenil- β -glucósido, geranil- β -glucósido, metil- α -D-manopiranosido, metil- α -D-galactopiranosido y PMD glucovainillina acetal.

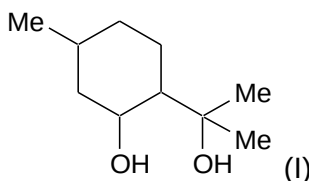
En la presente descripción, así como en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la", incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los intervalos definidos por la preposición y los términos "entre ... y ..." o por los términos "de ...a..." incluyen también los dos extremos de los mismos. El término "aproximadamente" se refiere a una desviación de más/menos el 10 %, preferentemente más/menos el 5 %. Los porcentajes se expresan en % en peso (% p), a menos que se indique lo contrario.

Según la IUPAC, el término "resto" se utiliza para indicar una parte de una molécula.

Como se usa en el presente documento, el término "repelente" se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para repeler cualquier insecto. En el presente documento, el repelente tal como se define tiene un uso preferido para repeler insectos voladores (por ejemplo, mosquitos). Sin embargo, se prevé que la formulación insecticida descrita también pueda ser eficaz contra los ácaros, garrapatas (enfermedad de Lyme) y muchos otros insectos y sus huevos y larvas.

PMD

El alcohol 2-(2-hidroxiopropan-2-il)-5-metilciclohexan-1-ol también es también conocido como *p*-mentano-3,8-diol (PMD), y corresponde a la siguiente estructura (I):



En el contexto de la invención, el término "PMD" se refiere a *p*-mentano-3,8-diol y representa cualquier estereoisómero, mezclas racémicas o mezclas diastereoisómeras derivadas del compuesto de fórmula (I).

El PMD para uso en la presente invención puede derivarse de una fuente natural, sintética, o una mezcla de las mismas. El PMD para uso en la presente invención puede ser una forma sustancialmente pura del compuesto, es decir, con una pureza por RMN o CG superior al 95 %, 97 % o 99 %, un extracto bruto, o un extracto bruto

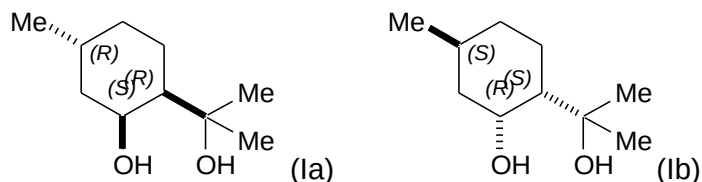
modificado químicamente, por ejemplo, mediante tratamiento en condiciones ácidas de un extracto bruto de fuente natural.

La pureza del PMD puede determinarse mediante CG utilizando un método divulgado en la bibliografía, por ejemplo, en Barasa *et al.*, Repellent Activities of Stereoisomers of *p*-Menthane-3,8-diols Against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), J. Med. Entomol., 2002, 39(5), 736-741.

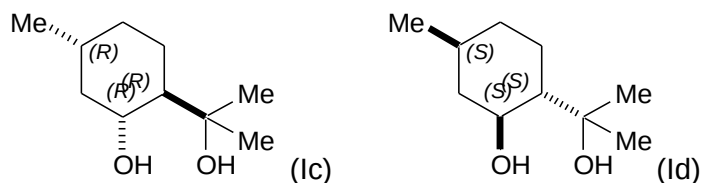
La pureza del PMD puede determinarse por RMN usando un método divulgado en la bibliografía, por ejemplo, en Borrego *et al.*, Effect of the Stereoselectivity of para-Menthane-3,8-diol Isomers on Repulsion toward *Aedes albopictus*, J. Agric. Food Chem., 2021, 69(37), 11095-11109.

Se sabe que el PMD existe en dos formas isoméricas geométricas, es decir, los isómeros *cis* y *trans*. En conjunto, hay 8 isómeros de PMD, como se divulga en la figura 1. Esta invención abarca cualquier isómero individual y también cualquier combinación de uno o más isómeros.

El *cis*-PMD racémico está compuesto por una mezcla de los siguientes enantiómeros:



El *trans*-PMD racémico está compuesto por una mezcla de los siguientes enantiómeros:



Algunos estereoisómeros diferentes de PMD, solos, como mezclas racémicas o mezclas diastereoméricas, muestran un efecto repelente, como se divulga en Barasa *op. cit.* Los diferentes isómeros muestran una diferencia en el efecto repelente hacia los mosquitos *Aedes albopictus* según Borrego. *op. cit.* Las propiedades repelentes de insectos del PMD también se divulgan en Carroll. *et al.*, PMD a Registered Botanical Mosquito Repellent with DEET-Like Efficacy, J. Am. Mosquito Control Assoc.,

2006, 22(3), 507-514) o Barnard *et al.*, Laboratory Evaluation of Mosquito Repellents Against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* y *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae), J. Med. Entomol., 2004, 41(4), 726-730.

También se ha divulgado la actividad antiséptica, antibiótica, fungicida, bactericida, antiviral y de crecimiento del cabello del PMD, por ejemplo, en los documentos US-A-2004/0247708, US-A-2007/0178048, EP-A-0934741, WO-A-01/05226, Smither *et al.*, Investigative study into whether an insect repellent has virucidal activity against SARS-CoV-2, Microbiol. Soc., 2021, 102(4) (DOI 10.1099/jgv.0.001585).

El PMD racémico y sus enantiómeros están comercializados por, por ejemplo, Takasago, Sigma-Aldrich, Parchem, o BOC Sciences, o puede prepararse de acuerdo con el procedimiento divulgado en Barasa *et al.*, *op. cit.* o en Zimmerman *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2367-2370, o en Yuasa *et al.*, Org. Proc. Res. Devel., 2000, 4(3), 159-161. El PMD también puede obtenerse mediante modificación ácida del aceite de *Corymbia citriodora* (el eucalipto limón), también conocido como aceite de *Eucalyptus citriodora*, hidratado, ciclado, que se cultiva comercialmente (por ejemplo, se cultiva comercialmente en Brasil y otros países latinoamericanos). Citriodiol® (Citrefine), que es un producto formado a partir de una simple modificación química en condiciones ácidas del extracto de las hojas de *Corymbia citriodora*. Comprende aproximadamente 70 % en peso de una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico. Este producto comercial comprende además cantidades menores de componentes terpenoides lineales y cíclicos, tales como citronelal, isómeros de citronelol e isopulegol. El aceite de *Eucalyptus citriodora*, hidratado, ciclado también lo comercializan otros proveedores como Chemian Technology SARL (en representación de Chemian Technology Limited (Reino Unido) y Fulltec GmbH.

En una realización, el PMD se selecciona de cualquiera de los ocho estereoisómeros de PMD, *cis*-PMD racémico, *trans*-PMD racémico y mezclas de los mismos.

En una realización, el PMD es una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico.

En una realización, el PMD se selecciona de *trans*-PMD racémico y *cis*-PMD racémico, que proporciona una formulación de liberación controlada sin olor y bajo olor.

En una realización, el PMD es *trans*-PMD racémico.

En una realización, el PMD es *cis*-PMD racémico. Dicho compuesto es más sencillo de producir que el *trans*-PMD racémico, proporciona una liberación más lenta de las formulaciones de la invención que la mezcla de *cis/trans*-PMD pura y tiene un olor mucho menor que el Citriodiol®.

En una realización, el PMD se selecciona del enantiómero de fórmula (Ia), enantiómero de fórmula (Ib), enantiómero de fórmula (Ic) y enantiómero de fórmula (Id).

En una realización, el PMD es un extracto natural bruto modificado químicamente de *Corymbia citriodora*.

Glucósido

La formulación de la invención comprende un glucósido. El glucósido incorporado a la formulación de liberación lenta de la invención es capaz de liberar eficazmente PMD a una velocidad controlada, cuando se aplica a una superficie y cuando está presente en combinación con un ácido orgánico y una sal de haluro metálico divalente. Dicho PMD, que está presente en forma libre en la formulación de liberación lenta, es un eficaz repelente de insectos con un efecto de larga duración, como se muestra en los ejemplos, y también muestra actividad antiséptica, antibiótica, fungicida, bactericida, antiviral y de crecimiento del cabello, como se expuso anteriormente.

En el sentido de la presente invención, el término "glucósido" se refiere a acetales mixtos (cetales) derivados de formas cíclicas de un compuesto de azúcar reductor, en donde el grupo hidroxilo anomérico está reemplazado por un grupo -OR. El compuesto ROH se denomina "aglicona" y el propio residuo de hidrato de carbono se denomina "glicona".

En el caso de que el azúcar sea glucosa, los términos "glucósido" y "glucopiranosido" se utilizan indistintamente.

En una realización, el glucósido es un azúcar reductor unido a un hidrato de carbono a través de un enlace glucosídico, en donde el enlace glucosídico puede ser alfa (α) o beta (β), y en donde el azúcar es un monosacárido, un sacárido con un grado de polimerización comprendido entre 1,1 y 1,9, un disacárido o un trisacárido.

En una realización, el azúcar reductor se selecciona de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.

En una realización, el azúcar reductor es un monosacárido seleccionado de azúcares L y D.

En una realización, el azúcar reductor es un monosacárido seleccionado, por ejemplo, de glucosa, galactosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, talosa, fucosa, xilosa y 2-desoxiglucosa, *N*-acetilglucosamina y mezclas de los mismos; preferentemente de D-glucosa, D-galactosa, D-alosa, D-altrosa, D-manosa, D-gulosa, D-idosa, D-talosa y mezclas de los mismos; más preferentemente D-glucosa o D-galactosa; y aún más preferentemente el azúcar es D-glucosa.

En una realización, el azúcar reductor es un disacárido seleccionado, por ejemplo, de lactosa, maltosa, celobiosa, quitobiosa, kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, soforosa, laminaribiosa, gentiobiosa, turanosa, maltulosa, leucrosa, isomululosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, rutinosa, rutinulosa, xilobiosa y mezclas de los mismos; preferentemente lactosa o maltosa; y más preferentemente lactosa.

En una realización, el azúcar reductor es un trisacárido seleccionado, por ejemplo, de nigerotriosa, maltotriosa, maltotriulosa y mezclas de los mismos; preferentemente maltotriosa.

En una realización, un grupo hidroxilo primario presente en el azúcar puede funcionalizarse como éter, amina, éster, amida, sulfato, fosfato, carbonato o carbamato.

En una realización, el resto no hidrato de carbono (aglicona) es un resto alcohólico (-OR). El alcohol (ROH) puede seleccionarse de alcoholes alifáticos o aromáticos. Un sacárido con un grado de polimerización comprendido entre 1,1 y 1,9, preferentemente entre 1,2 y 1,6, es el resto de azúcar de un alquilpoliglucósido, que es un producto industrial obtenido a partir de materias primas renovables cuando el resto de alcohol se selecciona de una cadena de hidrocarburo C₈-C₁₈. Preferentemente el resto de azúcar es glucosa.

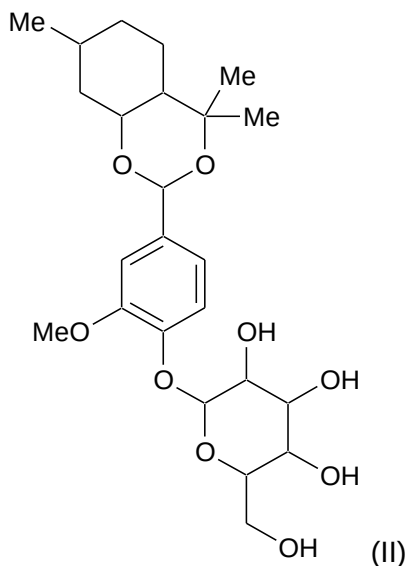
En una realización preferida, el glucósido se selecciona de metil- α -glucósido, hexil glucósido, fenil- β -glucósido, geranil- β -glucósido, metil- α -D-manopiranosido, metil- α -D-galactopiranosido y conjugado de PMD-glucovainillina; preferentemente seleccionado de metil- α -glucósido y conjugado de PMD-glucovainillina.

En una realización, el glucósido es metil- α -glucósido.

En una realización, el glucósido es un conjugado de PMD-glucovainillina.

Compuesto conjugado de PMD-glucovainillina

El compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II) es:



En la presente descripción, el compuesto de fórmula (II) puede denominarse indistintamente conjugado de PMD-glucovainillina, donde la estereoquímica relativa no está definida; conjugado de *cis*-PMD-glucovainillina, *cis*-PMD acetal o *cis*-acetal donde el compuesto se forma usando *cis*-PMD; conjugado de *trans*-PMD-glucovainillina, *trans*-PMD acetal, o *trans*-acetal donde se forma el compuesto usando *trans*-PMD.

En una realización, el PMD se selecciona de cualquiera de los ocho estereoisómeros de PMD, *cis*-PMD racémico, *trans*-PMD racémico y mezclas de los mismos, preferentemente PMD es una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico, y en donde el resto de azúcar es D-glucosa.

En una realización, el PMD es *trans*-PMD racémico.

En una realización preferida del conjugado de PMD-glucovainillina, el PMD es una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico y la mitad del azúcar es glucosa.

En una realización más preferida, el compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II) es el conjugado, en donde PMD es una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico y la mitad del azúcar es glucosa, preferentemente D-glucosa.

Glucovainillina

La glucovainillina es el compuesto resultante de la funcionalización de la vainillina (4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído, N.º CAS 121-33-5) con un resto de azúcar. Si el resto de azúcar es D-glucosa, entonces el producto se llama glucovainillina (vainillina 4-O-β-D-glucósido, N.º CAS 494-08-6).

La glucovainillina es un producto natural principal en muchas plantas, incluidas las vainas de vainilla, y se hidroliza mediante una combinación de enzimas endógenas y exógenas durante la producción natural de vainillina.

Sin embargo, la vainillina natural y, por lo tanto, la glucovainillina es muy cara debido a la oferta limitada. Por consiguiente, la vainillina se produce principalmente mediante métodos sintéticos y cada vez más mediante métodos biosintéticos, como se divulga, por ejemplo, en García-Bofill *et al.*, Enzymatic synthesis of vanillin catalysed by a eugenol oxidase, Applied Catalysis A, 2019, 582, 117117, ninguno de los cuales emplea glucovainillina como precursor.

La glucovainillina se puede producir a partir de vainillina utilizando métodos químicos tradicionales, como se divulga en, por ejemplo, Fischer *et al.*, Synthesis of certain glucosides, Berichte, 1909, 42(2), 1465-76. Por otra parte, los métodos químicos de O-glucosilación de alcoholes aromáticos (sustratos fenólicos) con diversos azúcares son bien conocidos y divulgados, por ejemplo, en Jacobsson *et al.*, Aromatic O-glycosylation, Carbohydrate Research, 2006, 341, 1266–1281.

La glucovainillina también es comercializada, por ejemplo, por Carbosynth Ltd.

El compuesto conjugado de glucovainillina de fórmula (II) incorporado a la formulación de liberación lenta de la invención es capaz de liberar eficazmente PMD a una velocidad controlada, para ser un eficaz repelente de insectos.

Procedimiento para preparar el compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II)

El proceso para preparar el compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II) comprende la reacción de glucovainillina con PMD en presencia de una cantidad catalítica de un ácido orgánico o inorgánico, opcionalmente en presencia de un disolvente.

En una realización preferida, el catalizador ácido se selecciona de ácido cítrico y un compuesto de ácido sulfónico, como una resina ácida Dowex.

En una realización, la formación del acetal se produce sin la presencia de ningún disolvente. En otra realización, la reacción tiene lugar en presencia de un disolvente, preferentemente seleccionado de acetonitrilo y un alcohol C₁-C₄, más preferentemente seleccionado de acetonitrilo y etanol, y aún más preferentemente el disolvente es etanol.

Normalmente, la reacción tiene lugar a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 60 °C, preferentemente entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 55 °C, y más preferentemente aproximadamente 50 °C. En la realización sin disolventes se implementa un calentamiento inicial para obtener un líquido fundido a partir de los productos de partida.

Sorprendentemente, dado que el azúcar está desprotegido, no se observa por RMN que se formen otros acetales en un grado significativo, diferente del representado por la fórmula (II).

La mezcla de conjugado *cis/trans*-PMD-glucovainillina se puede ajustar a la proporción deseada mediante la elección adecuada de ácido y disolvente.

En una realización, usando un exceso de mezcla de *cis/trans*-PMD, el conjugado de *cis*-PMD-glucovainillina se forma casi exclusivamente utilizando ácido cítrico como catalizador y acetonitrilo como disolvente, mientras que, utilizando un ácido fuerte (por ejemplo, resina ácida Dowex) en el mismo disolvente, se obtiene una mezcla 1:0,5 de conjugados *cis/trans*-PMD-glucovainillina. En cambio, utilizando los mismos ácidos y etanol como disolvente, se obtienen mezclas 1:0,7 y 1:1 de conjugados de *cis/trans*-PMD-glucovainillina respectivamente. Por consiguiente, la reacción se puede ajustar fácilmente para proporcionar la proporción de producto isomérico deseada mediante la elección adecuada de las condiciones de reacción, como ácido y disolvente.

En una realización, el conjugado de PMD-glucovainillina se obtiene del Citriodiol® y glucovainillina utilizando resina ácida Dowex, filtrando la resina y luego disolviéndola en agua.

En una realización, el conjugado de PMD-glucovainillina también se forma en Citriodiol® puro o Citriodiol® en un disolvente y puede usarse sin aislamiento.

Uso del compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II)

Otro aspecto del objeto de la invención es el uso del compuesto conjugado de PMD-glucovainillina de fórmula (II) para la liberación controlada de PMD a partir de la formulación de liberación lenta de la invención.

El conjugado de PMD-glucovainillina, incluido en la formulación de liberación lenta de la invención, puede aplicarse al tratamiento de diversas indicaciones, tales como repeler una amplia variedad de, por ejemplo, mosquitos, moscas, garrapatas, ácaros, jejenes, mosquitas pequeñas de arena, piojos, y sus huevos y larvas.

Ácido orgánico

La formulación de la invención comprende un ácido orgánico. El ácido orgánico incorporado a la formulación de liberación lenta de la invención es capaz de liberar eficazmente PMD cuando se aplica a una superficie a una velocidad controlada cuando está presente en combinación con un glucósido y una sal de haluro metálico divalente. El PMD libre, incluido en la formulación, es un eficaz repelente de insectos con un efecto de larga duración.

Los ácidos orgánicos adecuados para incluirse en dicha formulación son ácidos sulfónicos, ácidos monocarboxílicos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, ácidos hidroxicarboxílicos y aminoácidos.

En una realización, el ácido orgánico es un ácido sulfónico, por ejemplo, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico o taurina.

En una realización, el ácido orgánico es un ácido carboxílico, por ejemplo, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico o ácido benzoico.

En una realización, el ácido orgánico es un ácido hidroxicarboxílico, por ejemplo, ácido láctico, ácido tartárico, ácido glicólico, ácido málico, ácido mandélico (ácido 2-hidroxi-2-fenilacético) o ácido cítrico.

En una realización, el ácido orgánico es un aminoácido, por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, serina, treonina, metionina, cisteína, lisina, arginina, histidina, prolina, fenilalanina, tirosina o triptófano.

En una realización preferida, el ácido orgánico se selecciona de ácido cítrico, ácido succínico y formas anhidras o hidratos de los mismos. En una realización

se utiliza ácido cítrico como forma anhidra o como hidrato, preferentemente monohidrato. En una realización, se utiliza ácido succínico.

En una realización, el ácido orgánico puede estar en equilibrio con la base conjugada correspondiente, en donde la relación entre las especies depende del valor de pH de la formulación.

Sal de haluro de metal divalente

La formulación de la invención comprende una sal de haluro de metal divalente. El haluro de metal divalente incorporado a la formulación de liberación lenta de la invención es capaz de liberar eficazmente PMD cuando se aplica a una superficie a una velocidad controlada cuando está presente en combinación con un glucósido y un ácido orgánico, siendo un eficaz repelente de insectos.

Las sales de haluro de metal divalente adecuadas para incluirse en la formulación de la invención son, por ejemplo, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, bromuro de magnesio, yoduro de cinc, cloruro de cinc, bromuro de cinc o cloruro de cobalto.

En una realización, la sal de haluro de metal divalente se selecciona de cloruro de cinc, cloruro de magnesio y cloruro de calcio.

En una realización, la sal de haluro de metal divalente es cloruro de calcio.

En una realización, la sal de haluro de metal divalente es cloruro de magnesio.

En una realización, la sal de haluro de metal divalente es cloruro de cinc.

Formulación de liberación lenta

La formulación de liberación lenta comprende PMD, un glucósido, un ácido orgánico y una sal de haluro de metal divalente.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende por mol de PMD:

- a) entre 0,01 y 2, preferentemente entre 0,02 y 1,5, más preferentemente entre 0,03 y 1,2, más preferentemente entre 0,05 y 1, y aún más preferentemente entre 0,07 y 0,75 moles de un glucósido.

- b) entre 0,05 y 3, preferentemente entre 0,06 y 2,5, más preferentemente entre 0,08 y 2, más preferentemente entre 0,09 y 1,7, más preferentemente entre 0,1 y 1,5 moles y aún más preferentemente entre 0,12 y 1,24 moles de un ácido orgánico, y
- c) entre 0,01 y 5 moles, preferentemente entre 0,02 y 2 moles, más preferentemente entre 0,03 y 1 mol, y aún más preferentemente entre 0,06 y 0,58 moles de sal de haluro de metal divalente.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, un glucósido seleccionado de metil- α -glucósido, hexil glucósido, fenil- β -glucósido, geranil- β -glucósido, metil- α -D-manopiranosido, metil- α -D-galactopiranosido y conjugado de PMD-glucovainillina; preferentemente seleccionado de metil- α -glucósido y conjugado de PMD-glucovainillina, un ácido orgánico seleccionado de ácido cítrico y ácido succínico, y una sal de haluro metálico divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio, bromuro de magnesio, yoduro de cinc, cloruro de cinc, bromuro de cinc y cloruro de cobalto.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, un glucósido seleccionado de conjugado de PMD-glucovainillina y metil- α -glucósido, un ácido orgánico seleccionado de ácido cítrico y ácido succínico, y una sal de haluro metálico divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de cinc.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, un conjugado de PMD-glucovainillina, ácido cítrico y una sal de haluro de metal divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de cinc.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, metil- α -glucósido, ácido cítrico y una sal de haluro de metal divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de cinc.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, un conjugado de PMD-glucovainillina, ácido succínico y una sal de haluro metálico divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de cinc.

En una realización, la formulación de liberación lenta comprende PMD, metil- α -glucósido, ácido succínico y una sal de haluro metálico divalente seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y cloruro de cinc.

En una realización, el contenido de PMD en la formulación de liberación lenta es capaz de proporcionar al menos 0,1, preferentemente 0,2 mg de PMD por centímetro cuadrado de superficie.

La liberación de PMD se logra generalmente mediante una variedad de composiciones y dispositivos cosméticos que se usan ampliamente y son conocidos por los expertos en la materia. Algunos ejemplos no limitativos incluyen soluciones, cremas, polvos, pastas, pulverizaciones, lociones, películas o impregnados en o sobre materiales, tales como toallitas, máscaras y barras, productos sanitarios o superficies.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de una formulación de liberación lenta como repelente de insectos.

También forma parte de la invención la formulación de liberación lenta para uso como medicamento. En particular, para uso como antiséptico, antibiótico, fungicida, bactericida o antiviral.

Como se muestra en la sección de Ejemplos, la formulación de liberación lenta de la invención proporciona sorprendentemente una liberación lenta y prolongada de PMD. La eficacia de la formulación de liberación lenta se demuestra evaluando el efecto repelente de insectos del PMD. Dicha formulación permite un efecto repelente de insectos duradero y significativamente mejorado en comparación con los productos comerciales, tales como, por ejemplo, Mosiguard® y DEET (véase los Ejemplos 11 y 17). Como se muestra en el Ejemplo 13 y en el Ejemplo 19, *trans*-PMD y *cis*-PMD, respectivamente, dan un repelente de liberación controlada, mostrando un olor mucho menor en comparación con un repelente que contiene Citriodiol®.

También forma parte de la invención un método de uso de la formulación de liberación lenta, que comprende la aplicación de dicha formulación, ya sea directamente o en forma de composición, sobre una superficie.

La formulación de la invención se puede aplicar a cualquier superficie, como superficies blandas como la piel, pelo, ropa, plantas o cultivos, almacenamiento de cereales o superficies duras, como madera, materiales sintéticos o materiales cerámicos. En una realización, la formulación se aplica sobre la piel.

La fabricación de formulaciones que incluyen PMD, un glucósido, un ácido orgánico y un haluro de metal divalente es una cuestión de trabajo rutinario para el experto. La información sobre la preparación de composiciones en forma de

soluciones, cremas, pastas, polvos, pulverizaciones, lociones y películas se pueden encontrar en manuales bien conocidos, tales como, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 20^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2000, Filadelfia, Parte 5", Fabricación farmacéutica.

Sorprendentemente, la formulación de liberación lenta es capaz de liberar el PMD libre presente en ella cuando se combina con un glucósido, un ácido orgánico y una sal de haluro de metal divalente.

Como se muestra en los Ejemplos, la liberación lenta se obtiene con diferentes glucopiranósidos (Ejemplo 7), diferentes glucósidos (Ejemplo 16), diferentes ácidos orgánicos (Ejemplos 9 y 14) y diferentes haluros de metales divalentes (Ejemplo 15). Ambos ensayos *in vitro* (Ejemplo 17) e *in vivo* (Ejemplo 11) muestran las ventajas de las formulaciones de liberación lenta que contienen Citriodiol® o PMD puro de la invención en comparación con composiciones comercializadas.

Composición

También forma parte del objeto de la invención una composición que comprende la formulación de liberación lenta.

En una realización, la composición comprende la formulación de liberación lenta y un componente cosméticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, "cosméticamente aceptable" significa que el o los productos o el o los compuestos que el término describe son adecuados para su uso en contacto con tejidos (por ejemplo, la piel) sin toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica excesivas y similares. Este término no pretende limitar el ingrediente/producto, que describe su uso únicamente como cosmético

En una realización, la composición comprende:

- a) entre 5 % en peso y 80 % en peso de la formulación de liberación lenta, y
- b) entre 20 % en peso y 95 % en peso de un componente cosméticamente aceptable,

donde se ajustan los porcentajes de los componentes para que el resultado sea del 100 %.

La composición comprende preferentemente entre 10 % en peso y 75 % en peso de la formulación de liberación lenta, más preferentemente entre 15 % en peso y 70 % en peso, más preferentemente entre 25 % en peso y 65 % en peso, y aún más preferentemente entre 30 % en peso y 60 % en peso.

La composición comprende un componente cosméticamente aceptable, que en el contexto de la invención, se selecciona de un vehículo cosméticamente aceptable, un ingrediente cosmético, y mezclas de los mismos.

Un vehículo (o portador) cosméticamente aceptable es un vehículo en el que los ingredientes cosméticos están disueltos, emulsionados, dispersos o suspendidos. Dicho vehículo se selecciona de agua, un vehículo no acuoso miscible en agua, tal como etanol o isopropanol, y un vehículo no acuoso inmiscible en agua, tales como, por ejemplo, aceite vegetal, ésteres grasos, triglicéridos de cadena media o alcanos. Preferentemente la composición incluye agua como vehículo.

En una realización, el ingrediente cosmético se selecciona preferentemente de: tensioactivos (emulsionantes), compuestos lipídicos, emolientes, factores de consistencia, agentes espesantes, estabilizantes, hidrotropos, agentes conservantes, esencias, colorantes, compuestos de silicona, grasas, ceras, lecitinas, fosfolípidos, factores de protección solar UV, agentes formadores de película, y mezclas de los mismos.

La forma física de la composición para el uso de acuerdo con la invención no es importante. Dicha composición se puede convertir en una amplia variedad de tipos de productos que incluyen, pero sin limitación, composiciones sólidas y líquidas tales como soluciones, lociones, cremas, geles, barras, pulverizaciones, pomadas, lavados líquidos limpiadores y barras sólidas, champús, pastas, polvos, espumas, mousses, leches, emulsiones, dispersiones, suspensiones o toallitas.

Las composiciones tópicas útiles en la presente invención pueden formularse como soluciones. Las soluciones pueden incluir preferentemente un disolvente acuoso (por ejemplo, de aproximadamente 0 % en peso a aproximadamente 95 % en peso o de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 85 % en peso de un disolvente acuoso cosméticamente aceptable). Más preferentemente, dichas composiciones pueden contener aproximadamente 20 % en peso de disolvente acuoso, aunque esto puede variar dependiendo de la formulación. Dichos disolventes pueden incluir etanol, isopropanol, glicerol (glicerina), propilenglicol, polietilenglicol, mezclas de

los mismos y similares), en combinación con agua. En una realización, la composición tópica útil en la presente invención se puede formular como una solución que contiene un emoliente. Dicha composición contiene preferentemente de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de un emoliente. Como se usa en el presente documento, "emolientes" se refiere a los materiales utilizados para prevenir o aliviar la sequedad, así como para la protección de la piel. En una realización, la solución es una mezcla anhidra que comprende un disolvente no acuoso, que comprende, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 85 % en peso de un disolvente no acuoso cosméticamente aceptable.

Se puede preparar una loción a partir de una solución. Las lociones normalmente contienen de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de un emoliente y de aproximadamente 50 % en peso a aproximadamente 90 % en peso de agua.

Otro tipo de producto puede ser una crema. Una crema normalmente comprende de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de un emoliente y de aproximadamente 45 % en peso a aproximadamente 85 % en peso de agua.

Otro tipo de producto puede ser una pomada. Una pomada puede estar constituida por una base simple de aceites vegetales o de hidrocarburos semisólidos. Una pomada puede contener de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 100 % en peso de un emoliente, y de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un agente espesante.

Las composiciones tópicas útiles en la presente invención también pueden formularse preferentemente como emulsiones. En una realización, la composición contiene agua y una fase lipófila y se presenta en forma de emulsión o dispersión, tales como, por ejemplo, el tipo aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O), emulsión múltiple (W/O/W), o emulsión tipo PIT, o microemulsión. Si el vehículo es una emulsión, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso del vehículo deben estar compuestos por uno o más emulsionantes. Los emulsionantes pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos o anfóteros.

La composición tópica útil en la presente invención se puede formular como un gel. Los agentes gelificantes adecuados para geles acuosos incluyen, pero sin limitación, gomas naturales, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y acrilato, y

derivados de celulosa (por ejemplo, hidroximetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa). Los agentes gelificantes adecuados para aceites (tales como aceites vegetales, ésteres) incluyen, pero sin limitación, ceras, sílices modificadas, derivados de celulosa, poliamidas, poliuretanos y derivados del ácido L-glutámico. Tales geles normalmente comprenden entre aproximadamente 0,1 % en peso y 20 % en peso de tales agentes gelificantes.

Las composiciones útiles para el uso de la presente invención se preparan generalmente mediante métodos convencionales tales como los conocidos en la técnica de elaboración de composiciones tópicas. Dichos métodos normalmente pueden implicar mezclar los ingredientes en una o más etapas hasta un estado relativamente uniforme, con o sin calentamiento, enfriamiento, aplicación de vacío y similares.

Tensioactivos (emulsionantes)

En una realización, la composición puede incluir tensioactivos (emulsionantes) para facilitar la solución, emulsión, dispersión o suspensión de componentes cosméticos.

Los tensioactivos pueden ser aniónicos, no iónicos, catiónicos y/o anfóteros.

El contenido de tensioactivos suele estar comprendido entre 1 % en peso y 30 % en peso, preferentemente entre 2 % en peso y 20 % en peso, más preferentemente entre 3 % en peso y 10 % en peso, e incluso más preferentemente entre 4 % en peso y 8 % en peso.

Son ejemplos típicos de tensioactivos aniónicos, por ejemplo, jabones, alcanos sulfonados, olefinas sulfonadas, sulfatos de alquilo, sulfatos de éter de alcohol graso, glicerol éter sulfatos, éter sulfatos de ácido graso, mono- y di-alquilsulfosuccinatos, mono- y di-alquilsulfosuccinamatos, ácidos etercarboxílicos y sus sales, isetionatos de ácidos grasos, sarcosinatos de ácidos grasos, taururos de ácidos grasos, *N*-acilaminoácidos.

Ejemplos típicos de tensioactivos no iónicos son, por ejemplo, alcoholes grasos polialcoxilados, ácidos grasos polialcoxilados, amidas de ácidos grasos polialcoxilados, aminas grasas polialcoxiladas, triglicéridos alcoxilados, éteres mixtos,

alquilpoliglucósidos, *N*-ésteres de alquil sorbitán, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietoxilados y óxidos de amina.

Ejemplos típicos de tensioactivos catiónicos son, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario y sales cuaternizadas de ésteres de trialcanolaminas y ácidos grasos, por ejemplo, Esterquats.

Ejemplos típicos de tensioactivos anfóteros son, por ejemplo, alquilbetaínas, alquilamidobetaínas, aminopropionatos, aminoglicinatos, betaínas y sulfobetaínas de imidazolinio.

Los tensioactivos anteriormente mencionadas son exclusivamente compuestos conocidos, cuya estructura y preparación son bien conocidas por los expertos en la materia, y se pueden encontrar, por ejemplo, en X. Domingo's book, *A guide to the surfactants world*, Proa, Barcelona, 1995.

Componentes lipídicos y emolientes

La composición suele contener compuestos lipídicos y emolientes adicionales para optimizar sus propiedades organolépticas y dermatológicas.

Los compuestos lipídicos y emolientes normalmente están contenidos en una cantidad total de entre 1 % en peso y 50 % en peso, preferentemente entre 5 % en peso y 25 % en peso, y más preferentemente entre 5 % en peso y 15 % en peso.

Compuestos lipídicos adecuados son alcoholes de Guerbet a base de alcoholes grasos con 6 a 18 átomos de carbono, preferentemente con 8 a 10 átomos de carbono (como el producto Eutanol® G de la empresa BASF), ésteres de ácidos grasos C₆₋₂₂ lineales con alcoholes C₆₋₂₂ lineales, ésteres de ácidos carboxílicos C₆₋₁₃ ramificados con alcoholes C₆₋₂₂, tales como miristato de miristilo, palmitato de miristilo, estearato de miristilo, estearato de behenilo, isoestearato de behenilo, oleato de behenilo, behenato de behenilo, erucato de behenilo o miristato de erucilo.

Asimismo, son adecuados los ésteres de ácidos grasos C₆₋₂₂ lineales con alcoholes ramificados, especialmente 2-etilhexanol (por ejemplo el producto Cetiol® 868 de la empresa BASF), y miristato de isopropilo; ésteres de ácido alquilhidroxicarboxílico C₁₈₋₃₈ con alcoholes grasos C₆₋₂₂ lineales o ramificados; ésteres de ácidos grasos lineales y/o ramificados con alcoholes polihídricos y/o alcoholes de Guerbet; triglicéridos a base de ácidos grasos con 6 a 10 átomos de carbono (por ejemplo el producto Mirytol® 318 de la empresa BASF); mezclas líquidas de mono/di/triglicéridos a base de ácidos grasos

con 6 a 18 átomos de carbono; ésteres de alcoholes grasos con 6 a 22 átomos de carbono y/o alcoholes de Guerbet con ácidos carboxílicos aromáticos, especialmente ácido benzoico; ésteres de ácidos dicarboxílicos con 2 a 12 átomos de carbono con alcoholes lineales o ramificados de 1 a 22 átomos de carbono, o polioles con 2 a 10 átomos de carbono y 2 a 6 grupos hidroxilo; aceites vegetales; alcoholes primarios ramificados; ciclohexanos sustituidos; carbonatos de alcohol graso C₆₋₂₂ lineal y ramificado, tales como, por ejemplo, carbonatos de dicaprililo (por ejemplo, el producto Cetiol® CC de la empresa BASF); éteres dialquílicos lineales o ramificados simétricos o asimétricos con 6 a 22 átomos de carbono por grupo alquilo, tales como éteres dicaprilílicos (por ejemplo, el producto Cetiol® OE de la empresa BASF); hidrocarburos alifáticos o nafténicos, tales como escualano, escualeno o dialquilociclohexanos, y mezclas de los mismos.

Factores de consistencia y espesantes

Generalmente se utilizan factores de consistencia y espesantes en la composición para ajustar la viscosidad y el comportamiento reológico.

Entre los factores de consistencia que entran en consideración se encuentran, en primer lugar, alcoholes grasos con una cadena de 12 a 22 átomos de carbono, preferentemente de 16 a 18 átomos de carbono, y además glicéridos parciales, ácidos grasos o ácidos grasos hidroxilados.

Agentes espesantes adecuados son, por ejemplo, anhídrido silícico hidrófilo (como los productos Aerosil® de la empresa Evonik); polisacáridos, especialmente goma de xantano, goma guar, agar-agar, alginatos y tilosas, carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa, así como mono- y diésteres de polietilenglicol de ácidos grasos de mayor peso molecular; poliacrilatos (por ejemplo Carbopol® y tipos de Pemulen® de la empresa Lubrizol; Synthalene® de la empresa Sigma, tipos Keltrol® de la empresa CP Kelco; tipos Sepigel® y Simulgel® de la empresa Seppic; tipos Salcare® de la empresa Allied Colloids), poliacrilamidas, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona.

Hidrótropos

Para mejorar la fluidez de la composición, también es posible usar hidrótropos, tales como, por ejemplo, etanol, alcohol de isopropilo o polioles. Los polioles aquí considerados tienen preferentemente de 2 a 15 átomos de carbono y al menos dos grupos hidroxilo. Los polioles también pueden contener otros grupos funcionales,

especialmente grupos amino, o modificarse con nitrógeno. Son ejemplos típicos glicerol; alquilenglicoles, tales como, por ejemplo, etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol, butilenglicol, hexilenglicol, así como polietilenglicoles con un peso molecular promedio de 100 a 1.000 daltons; mezclas técnicas de oligoglicerol con un grado de autocondensación de 1,5 a 10, por ejemplo, mezclas técnicas de diglicerol con un contenido de diglicerol del 40 % en peso al 50 % en peso; compuestos de metilol, como especialmente trimetilolmetano, trimetilolpropano, trimetilolbutano, pentaeritritol y dipentaeritritol; alquilglucósidos con una cadena de 1 a 8 átomos de carbono en el resto alquilo; alditoles C₅₋₁₂, tales como sorbitol o manitol; azúcares con 5 a 12 átomos de carbono, tales como glucosa o sacarosa; amino azúcares, tales como glucamina; dialcoholaminas, tales como dietanolamina o 2-amino-1,3-propanodiol.

En una realización, glicerol, propilenglicol y sus mezclas se utilizan como hidrótopo en la composición.

Agentes conservantes

Los conservantes adecuados para usar en la composición incluyen, a modo de ejemplo, fenoxietanol, 3-(4-clorofenoxi)-1,2-propanodiol (clorfenesina), pentanodiol o ácido sórbico, y las clases de sustancias adicionales indicadas en el anexo V del Reglamento (CE) N.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Una composición que comprende la formulación de liberación lenta de la invención y un ingrediente cosmético, tal como un polímero formador de película, p. ej., una combinación de acetato de polivinilo y polivinilpirrolidona, y un aceite, p. ej., miristato de isopropilo, proporciona un efecto repelente mucho más prolongado en comparación con un producto comercial (véase Ejemplo 11).

En una realización, la composición comprende otro compuesto repelente de insectos, que se selecciona de aceites esenciales, repelentes de insectos naturales, repelentes sintéticos y mezclas de los mismos.

Otro compuesto repelente de insectos se selecciona de, por ejemplo, DEET (*N,N*-dietil-meta-toluamida), icaridina (picaridina), DEPA (*N,N*-dietilfenilacetamida), IR3535, *N*-butil-acetanilida, MGK Repelente 264, *N*-Metilnedecanamida, AI3-35765, AI3-37220 (SS220), MGK Repelente 326, geraniol, timol, eugenol, carvacrol, vainillina, limoneno, nootkatona, espatulenol, ftalato de dibutilo (DBP), ftalato de dimetilo (DMP), carbonato de dimetilo (DMC), ftalato de dioctilo, benzoato de bencilo, indalona, nepetalactona, antranilato de metilo, antranilato de etilo,

ácido ciclohexano propiónico, ácido nonanoico, ácido 2-etilhexanoico, ácido undecilénico, ácido láctico, diol, 2-butil-2-etil-1,3-propanodiol, Rutgers 612, un piretroide, un carbamato, y mezclas de los mismos. Las estructuras químicas de algunos compuestos repelentes de insectos se muestran en las Figuras 2.1 y 2.2. Preferentemente, la composición comprende otro compuesto repelente de insectos seleccionado de geraniol, nootkatona, aceite de neem, DEET, icaridina, IR3535 y mezclas de los mismos.

Proceso para aislar *cis/trans*-PMD

Otro aspecto de la invención es un proceso para aislar *cis/trans*-PMD racémico de un extracto que contiene PMD.

El proceso comprende:

- 1) añadir una sal seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y mezclas de los mismos, a una solución de un extracto que contiene PMD,
- 2) separar el sólido obtenido en la etapa 1), y
- 3) aislar *cis/trans*-PMD racémico del sólido separado en la etapa 2).

En una realización preferida, el proceso comprende:

- a) disolver el extracto en un disolvente, preferentemente una mezcla de un hidrocarburo C₅-C₁₂ y un alcohol alifático; preferentemente el alcohol alifático se selecciona de metanol, etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, *n*-butanol, *i*-butanol, *sec*-butanol, *n*-pentanol, *i*-pentanol, alcohol amílico, alcohol neopentílico, alcohol *sec*-amílico, 3-pentanol, metil isopropil carbinol y 2-metil-2 butanol; más preferentemente el disolvente es una mezcla de hexanos y etanol,
- b) añadir una sal seleccionada de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y mezclas de los mismos,
- c) agitar la mezcla obtenida en la etapa b) a temperatura ambiente,
- d) separar el sólido obtenido tras la agitación de la etapa c),
- e) disolver el sólido obtenido en la etapa d) en una mezcla de agua y un disolvente inmiscible en agua; preferentemente el disolvente inmiscible en agua se selecciona de hexano, ciclohexano, diclorometano, 1,2-dicloroetano, cloroformo, dietil éter, *t*-butilmetil éter, acetato de etilo, benceno, tolueno, xilenos, 1-butanol,

2-butanol, *n*-pentanol, *i*-pentanol, alcohol amílico, alcohol neopentílico, alcohol *sec*-amílico, 3-pentanol, metil isopropil carbinol y 2-metil-2 butanol; más preferentemente el disolvente inmiscible en agua es hexano,

- f) separar la fase de hexano de la etapa e), y
- g) secar y eliminar el hexano por destilación.

En una realización, el alcohol alifático en la etapa a) está presente en una cantidad catalítica, por ejemplo, entre el 0,01 y el 0,1 %, preferentemente entre el 0,02 y el 0,07 %, más preferentemente aproximadamente el 0,05 %, expresado en (v/v) respecto al volumen total del disolvente.

El proceso permite el aislamiento de *cis/trans*-PMD racémico procedente de un extracto que contiene PMD en una recuperación prácticamente cuantitativa del PMD contenido en el extracto.

En una realización, el extracto que contiene PMD es el producto comercial Citriodiol®.

En los siguientes ejemplos, se muestra la preparación de los compuestos de la invención y los experimentos relacionados con las pruebas de rendimiento de la formulación de liberación lenta.

Ejemplos

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un Varian Mercury 400 (400,1 Mz para ^1H y 100,6 MHz para ^{13}C) en cloroformo deuterado, agua deuterada o dimetilsulfóxido deuterado. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se adquirieron utilizando un instrumento de espectrometría de masas LC/MSD-TOF (Agilent Technologies).

La evolución de las reacciones y las mezclas de producto se supervisaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de gel de sílice 60 comerciales o por RMN de ^1H utilizando los instrumentos anteriores. Para la cromatografía, se empleó gel de sílice de calidad para columna (tamaño de malla de 0,040 - 0,063 mm).

Se adquirió *cis/trans*- PMD racémico de aproximadamente 95 % de pureza de Boc Sciences y se usó sin tratamiento adicional o los isómeros *cis*- y *trans* (aproximadamente una mezcla 6:4) se separaron por cromatografía en columna sobre sílice usando acetato de etilo/hexano 1:3. El isómero *cis* de elución más rápida era

idéntico mediante la RMN de ^1H al auténtico (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-5-metilciclohexanol adquirido en Sigma-Aldrich (Merck).

Los términos "*cis/trans*-PMD", "*cis*-PMD" y "*trans*-PMD" en los ejemplos se refieren respectivamente a "*cis/trans*-PMD racémico", "*cis*-PMD racémico" y "*trans*-PMD racémico", a menos que se indique de otra manera.

Citriodiol[®], que comprende aproximadamente 70 % en peso de una mezcla de *cis*-PMD racémico y *trans*-PMD racémico, que muestra una proporción de *cis*-PMD racémico/*trans*-PMD racémico de aproximadamente 1,9:1, fue un obsequio de Citrefine Ltd.

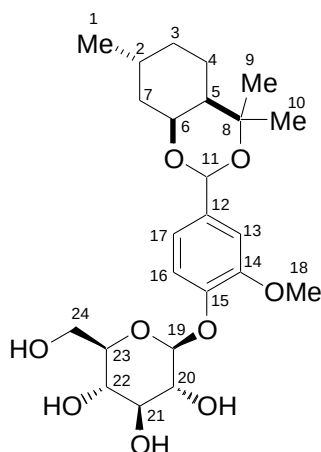
La glucovainillina se adquirió en Carbosynth Ltd o se produjo internamente utilizando procedimientos estándar de la bibliografía.

Todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (Merck) o en diversas fuentes comerciales a través de Cymit Química.

La membrana Hemotek, una fina membrana de colágeno, se adquirió en Hemotek Ltd. (Reino Unido).

La incubación se realizó a 32 °C en un dispositivo estándar.

Ejemplo 1: Preparación del conjugado de *cis*-PMD racémico-glucovainillina

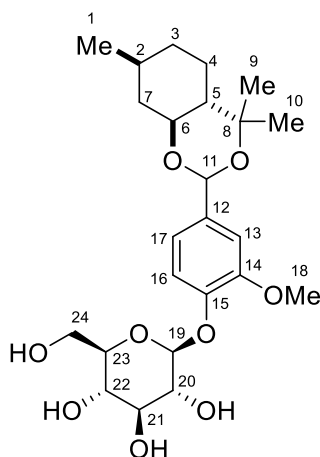


Una mezcla de glucovainillina (1,03 g, 3,2 mmol), *cis*-para-mentano-3,8-diol racémico (2,04 g, 11,9 mmol) y ácido cítrico monohidrato (0,24 g, 1,2 mmol) se suspendió en acetonitrilo (10 ml) y se agitó a 50 °C durante 21 h.

La solución resultante se concentró por destilación a presión reducida y se purificó por cromatografía sobre sílice mediante elución en gradiente usando EtOAc/hexano 1:1 para eliminar el diol residual seguido de MeOH/diclorometano 1:10 para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco inodoro (1,42 g, 92 %).

La espectrometría de masas, y la RMN de ^1H y C^{13} se utilizaron para caracterizar el compuesto.

Ejemplo 2: Preparación del conjugado de *trans*-PMD racémico-glucovainillina



Una mezcla de glucovainillina (0,5 g, 1,6 mmol), *trans*-para-mentano-3,8-diol racémico (1,0 g, 5,8 mmol) y ácido cítrico monohidrato (0,1 g, 0,52 mmol) se suspendió en acetonitrilo (2 ml) y se agitó a 50 °C durante 22 h.

La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía sobre sílice mediante elución en gradiente usando EtOAc/hexano 1:1 para eliminar el diol residual seguido de MeOH/diclorometano 1:10 para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco inodoro (0,73 g, 74 %). Se observó que el sólido (50 mg) se disolvía fácilmente en agua (0,1 ml).

La espectrometría de masas, y la RMN de ^1H y C^{13} se utilizaron para caracterizar el compuesto.

Ejemplo 3: Procedimiento general para la preparación del conjugado de *cis/trans*-PMD racémico-glucovainillina de Citriodiol®

Citriodiol® es un producto comercializado que comprende aproximadamente 70 % en peso de una mezcla de *cis*- y *trans*-PMD racémico, que

muestra una proporción de *cis*-PMD racémico/*trans*-PMD racémico de aproximadamente 1,9:1.

Una mezcla de glucovainillina, Citriodiol® y Dowex® 50WX8, resina de ácido sulfónico, se suspendió en etanol y se agitó a 50 °C durante 23 h. La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente, se filtró para dar la mezcla de reacción bruta de PMD glucovainillina acetal como filtrado. El residuo se lavó con etanol (2 x 1 ml) y los filtrados se combinaron para dar una solución de color amarillo pálido.

Se tomó una alícuota de la solución y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para dar el concentrado de reacción bruto de PMD glucovainillina acetal. Tras la integración de las señales de C11 de acuerdo con el sistema de numeración mostrado arriba (95,6 ppm para *cis*-PMD acetal frente a la suma de las señales a 94,8 ppm y 94,9 ppm para el *trans*-PMD acetal) del espectro de RMN de C¹³ del residuo en CDCl₃, la relación de *cis/trans*-acetales resultó ser 1:2,6. A continuación, este material se concentró mediante destilación a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice mediante elución en gradiente usando EtOAc/hexano 1:1 para eliminar el diol residual seguido de MeOH/diclorometano 1:10 para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido vítreo.

Los materiales utilizados en los Ejemplos 5, 6, 9 y 10 siguientes se prepararon de acuerdo con este procedimiento general, pero de diferentes lotes usando diferentes proporciones de Citriodiol®/glucovainillina, como se muestra en la tabla I:

TABLA I

Componente/Ejemplo	3	5	6	9 y 10
Glucovainillina (mg)	200	1900	600	600
Citriodiol® (mg)	580	2000	2000	2000
Dowex® 50WX8 (mg)	40	400	316	240

Etanol (ml)	2	15	6	6
Rendimiento aislado (%)	55	N/A	N/A	N/A

N/A: El material no fue aislado, solo se determinaron las proporciones PMD/acetal

Ejemplo 4: Medición por RMN de ^1H de la pérdida de PMD de discos de papel que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD racémico y *trans*-PMD glucovainillina acetal con diferentes cantidades de ácido cítrico y cloruro de calcio

Para medir la pérdida de PMD de discos de papel que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD y *trans*-PMD-glucovainillina acetal (en adelante: *trans*-acetal) con diferentes cantidades de ácido cítrico y cloruro de calcio, se prepararon las siguientes mezclas como se muestra en la Tabla II:

TABLA II

Experimento N.º	Solución madre 1 (µl)	Solución madre 2 (µl)	Solución madre 3 (µl)	Solución madre 4 (µl)	D ₂ O (µl)	MeOH-D ₄ (µl)
4,1	80	0	80	50	0	0
4,2	80	0	80	0	50	0
4,3	0	160	0	0	50	0
4,4	0	160	0	0	0	50

Las soluciones madre utilizadas en las mezclas anteriores contenían los siguientes componentes:

- Solución madre 1: 200 mg de *cis/trans*-PMD y 130 mg de *trans*-PMD glucovainillina acetal puro en 0,5 ml de MeOH-d₄.
- Solución madre 2: 200 µl de solución madre 1 diluida con 200 µl de MeOH-d₄.
- Solución madre 3: 400 mg de ácido cítrico en 1 ml de MeOH-d₄.

- Solución madre 4: Se disolvieron 0,7 g de cloruro de calcio anhidro en 1 ml de óxido de deuterio.

Las soluciones madre se agregaron a viales de vidrio en el orden y las cantidades que se muestran en la Tabla I anterior.

Después de mezclar homogéneamente, se agregaron gota a gota 50 µl de cada mezcla sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro que posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente una cuarta parte de cada disco de papel después de 2 h y 18,5 h, se enjuagó con DMSO-d₆ (0,9 ml) y se analizó por RMN de ¹H. Otra cuarta parte del papel tratado con la mezcla del Experimento N.º. 2 fue tratado y analizado de la misma manera después de 90,5 h. La proporción *cis*-PMD/*trans*-acetal se determinó comparando las integrales de sus protones metílicos de la RMN de ¹H a 1,17 y 1,26 ppm respectivamente.

Se observó una pequeña cantidad de isomerización de *cis/trans*-acetal en el Experimento 4.1, por lo que las proporciones *cis*-PMD y *trans*-PMD se determinaron con respecto a las integrales de acetal combinadas a 1,41 y 1,26 ppm. Los resultados encontrados en diferentes momentos se muestran en la Tabla III a continuación:

TABLA III

Experimento N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> -PMD/Acetal total			proporción <i>trans</i> -PMD/Acetal total		
	2 h	18,5 h	90,5 h	2 h	18,5 h	90,5 h
4,1	2,72	2,25	0,96	1,99	2,00	1,02
4,2	1,58	0,52	NR	1,34	0,57	NR
4,3	1,92	1,09	NR	1,68	1,11	NR
4,4	1,78	0,64	NR	1,51	0,58	NR

NR = no realizado

Los resultados del Experimento 4.1 (*cis/trans*-PMD, *trans*-PMD glucovainillina acetal, ácido cítrico y cloruro de calcio) muestran claramente que ambos

cis-PMD y *trans*-PMD se perdieron a un ritmo mucho más lento a partir de una mezcla de isómeros de PMD y *trans*-acetal (0,27 eq. con respecto al PMD total) en presencia de ácido cítrico (1 eq. con respecto al PMD total) y cloruro de calcio (1,7 eq. con respecto al PMD total) que en su ausencia (Experimentos 4.2, 4.3 y 4.4).

En todos los ejemplos siguientes, donde se utilizó una mezcla de *cis*- y *trans*-PMD (p. ej., Citriodiol®), solo se ha analizado la pérdida de *cis*-PMD porque los picos de RMN de ¹H son más fáciles de analizar debido a la menor superposición de picos. Sin embargo, en todos los casos, las proporciones de los isómeros de PMD son cuantitativamente similares (es decir, ambos isómeros de PMD se retienen aproximadamente en un grado similar como se demuestra en este ejemplo).

Ejemplo 5: Medición por RMN de ¹H de la pérdida de PMD de discos de papel o membrana Hemotek que contiene una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD y *trans*-PMD glucovainillina acetal (*trans*-acetal) puro o concentrado de reacción en bruto de PMD-glucovainillina acetal en etanol y agua

Para medir la pérdida de PMD de discos de papel o membranas Hemotek que contienen una mezcla isomérica de *cis*- y *trans*-PMD y *trans*-PMD glucovainillina acetal en etanol y agua, en presencia y ausencia de ácido cítrico y cloruro de calcio, se prepararon las siguientes mezclas como se muestra en la Tabla IV:

TABLA IV

Exp. N.º	Solución madre 1 (µl)	Solución madre 2 (µl)	Solución madre 3 (µl)	Solución madre 4 (µl)	D ₂ O (µl)	EtOH (µl)	Superficie
5,1	80	80	50	0	0	0	Papel
5,2	80	80	50	0	0	0	Hemotek
5,3	0	80	50	80	0	0	Papel
5,4	0	0	0	80	50	80	Papel

Hay que señalar que el Experimento N.º 5.1 es una repetición del Experimento N.º 4.1 del Ejemplo 4, pero usando etanol en lugar de MeOH-D₄.

Se prepararon las siguientes soluciones madre:

- Solución madre 1: 400 mg de *cis/trans*-PMD y 260 mg de *trans*-PMD glucovainillina acetal en etanol absoluto (1 ml).
- Solución madre 2: 400 mg de ácido cítrico en 1 ml de etanol absoluto.
- Solución madre 3: 0,7 g de cloruro de calcio anhidro disueltos en 1 ml de óxido de deuterio.
- Solución madre 4: 200 mg del concentrado de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal del Ejemplo 3 disuelto en 200 µl de etanol absoluto.

Las soluciones madre se agregaron a viales de vidrio en el orden y las cantidades que se muestran en la tabla anterior para obtener soluciones transparentes e incoloras después de mezclarlas a fondo, excepto en el Experimento N.º 5.3 que era una solución de color púrpura pálido.

Se agregaron gota a gota 50 µl de cada mezcla sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro o membrana Hemotek, como se indica en la tabla anterior y posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente la mitad de cada disco después de 17,5 h, se enjuagó con DMSO-d₆ (0,9 ml) y se analizó por RMN de ¹H. En los experimentos 3 y 4, donde las mezclas iniciales estaban en equilibrio, la proporción de *cis*-PMD/*trans*-acetal se determinó comparando las integrales de sus protones metílicos de los espectros de RMN de ¹H a 1,17 y 1,26 ppm respectivamente. En los experimentos 1 y 2, se produjo cierta isomerización *cis/trans*acetal y por lo tanto las proporciones *cis*-PMD/Acetal total se determinaron a partir de la integral de la señal ppm a 1,17 y las integrales combinadas de las señales a 1,41 y 1,26 ppm.

La solución madre 1 dio una proporción *cis*-PMD/acetal de 3,07 por RMN de ¹H que se tomó como la relación de tiempo cero para los Experimentos N.º 1 y 2.

La solución madre 4 dio una proporción *cis*-PMD/acetal de 1,17 por RMN de ¹H que se tomó como la relación de tiempo cero para las Reacciones 3 y 4.

La Tabla V muestra los resultados obtenidos en este ejemplo:

TABLA V

Experimento N.º / Tiempo	Proporción <i>Cis</i> -PMD/acetal	
	0 h	17,5 h

5,1	3,07	2,25
5,2	3,07	2,72
5,3	1,17	1,18
5,4	1,17	0,85

Puede observarse que:

- la pérdida de *cis*-PMD del Experimento N.º 5.1 fue comparable a la del Experimento N.º 4.1 del Ejemplo 4, lo que demuestra que los resultados son reproducibles.
- la pérdida de *cis*-PMD del papel (Experimento N.º 5.1) y de la membrana Hemotek (Experimento N.º 5.2) fueron muy similares, lo que demuestra que el efecto es independiente del tipo de superficie.
- la pérdida de *cis*-PMD de la mezcla de Citriodiol®/*trans*-acetal en presencia de ácido cítrico y cloruro de calcio (Experimento N.º 5.3) fue sustancialmente menor que en ausencia de ellos (Experimento N.º 5.4).

Ejemplo 6: Medición de la pérdida de PMD de la mezcla de reacción en bruto de PMD-glucovainillina acetal usando diferentes cargas de ácido cítrico y cloruro de calcio en papel

Para medir la pérdida de PMD de discos de papel que contienen *cis*-PMD y *trans*-PMD glucovainillina acetal por RMN de ¹H usando diferentes cargas de ácido cítrico y cloruro de calcio, como se muestra en la Tabla VI, se prepararon las siguientes composiciones:

TABLA VI

Formulaciones	Ácido cítrico · H ₂ O (mg)	CaCl ₂ en agua 0,7/1 (p/v) (µl)	proporción <i>cis</i> - PMD/ <i>trans</i> -acetal	% <i>cis</i> - PMD restante
			20,5 h	
6,1	24	50	1,18 ¹	11,6
6,2	0	0	0,89 ¹	8,7

(comparativa)				
6,3	36	75	1,80 ²	17,7
6,4	48	100	3,48 ²	34,2
6,5	72	150	5,23 ²	51,4
6,6	72	50	3,60 ³	35,4
6,7	24	150	1,60 ³	15,7

¹ Tiempo: 20,5 h; ² Tiempo: 19 h; ³ Tiempo: 21 h

Las composiciones se prepararon mezclando 1 ml de Solución madre 1, que contiene una mezcla de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal preparada como se muestra en el Ejemplo 3, con cantidades de ácido cítrico y cloruro de calcio como se divulga en la Tabla VI.

Se agregaron gota a gota 50 µl de cada mezcla sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro, como se indica en la tabla anterior y posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente una cuarta parte de cada disco en los momentos indicados, se enjuagó con DMSO-d₆ (0,9 ml) y se analizó por RMN de ¹H. La proporción de *cis*-PMD/*trans*-acetal se determinó comparando las integrales de sus protones metílicos de los espectros de RMN de ¹H a 1,17 y 1,26 ppm respectivamente.

La solución madre 1 dio una proporción *cis*-PMD/*trans*-acetal de 10,18 por RMN de ¹H que se tomó como la proporción de tiempo cero. El % de *cis*-PMD restante se calculó utilizando el valor a las 20,5 h teniendo en cuenta dicho valor en el tiempo cero.

Este experimento demuestra que la combinación de ácido cítrico y cloruro de calcio proporciona un efecto de pérdida lenta de PMD.

Ejemplo 7: Medida de la pérdida de PMD de discos de papel que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD, ácido cítrico, cloruro de calcio y diferentes glucopiranosidos

Para medir la pérdida de PMD de discos de papel que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD, ácido cítrico, cloruro de calcio y diferentes glucopiranosidos, se prepararon las mezclas que se muestran en la Tabla VII:

TABLA VII

Exp. N.º	Glucopiranósido	Cantidad de glucopiranósido (mg)	Solución madre 1 (µl)	Solución madre 2 (µl)	Solución madre 3 (µl)
7,1	<i>trans</i> -acetal	20	110	80	50
7,2	Geranil-β-glucopiranósido	20	110	80	50
7,3	0	0	110	80	50
7,4	Fenil-β-glucopiranósido	20	110	80	50
7,5	Metil-α-glucopiranósido	20	110	80	50
7,6	<i>trans</i> -acetal	10	110	80	50

Se prepararon las siguientes soluciones madre:

- Solución madre 1: 300 mg de *cis/trans*-PMD disuelto en 0,8 ml de MeOH-d₄.
- Solución madre 2: 400 mg de ácido cítrico disueltos en 1 ml de MeOH-d₄.
- Solución madre 3: 0,7 g de cloruro de calcio anhidro disueltos en 1 ml de óxido de deuterio.

Los glucopiranósidos (20 mg) mostrados en la tabla anterior se pesaron en viales de vidrio paralelos y se agregaron las soluciones madre donde se muestra y en las cantidades que se muestran en la Tabla VII.

Después de mezclar homogéneamente, se agregaron gota a gota 50 µl de cada mezcla sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro que posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente una cuarta parte de cada disco de papel después de 3 h y 21 h, se enjuagó con DMSO-d₆ (0,9 ml) y se analizó por RMN de ¹H.

La proporción de *cis*-PMD/glucopiranósido se determinó utilizando las siguientes señales del espectro de RMN de ¹H:

- Experimento 7.1: Se observó que algunos de los *trans*-acetal se había convertido en *cis*-acetal debido al equilibrio con el *cis/trans*-PMD en solución antes de su adición al papel. Comparando las señales a 5,70 y 6,68 ppm, se observó que la proporción de *trans*-acetal/*cis*-acetal no se alteró significativamente una vez en la superficie del papel. Por consiguiente, la proporción de *cis*-PMD/Acetal total se determinó mediante comparación de las integrales de las señales de los espectros de RMN de ^1H del *cis*-PMD a 4,15 ppm y las señales de acetal combinadas a 5,70 y 5,68 ppm.
- Experimento 7.2: Picos a 4,15/5,08 ppm
- Experimento 7.3: Picos a 4,15/armónico del pico de disolvente a 1,17 ppm.
- Experimento 7.4: Picos a 4,15/4,84 ppm
- Experimento 7.5: Picos a 4,15/4,90 ppm
- Experimento 7.6: En cuanto al Experimento 7.1

La diferencia en la proporción se utilizó a continuación para determinar el alcance de la pérdida de PMD, que se muestra en la Tabla VIII:

TABLA VIII

Exp. N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> - PMD/glucopiranosido		pérdida de <i>cis</i> -PMD durante un período de 18 h (%)
	3 h	21 h	
7,1	1,88	1,56	17
7,2	1,30	0,73	44
7,3	5,9	0,15	97
7,4	0,68	0,71	-4
7,5	0,52	0,40	23
7,6	4,54	2,70	41

Se puede ver claramente que *cis*-PMD se pierde del papel a un ritmo significativamente más lento usando diferentes glucopiranosidos en presencia de ácido cítrico y cloruro de calcio que cuando no hay glucósido presente. Además, se puede

observar que todos los glucósidos probados tienen un efecto positivo en la retención de la pérdida de PMD.

Ejemplo 8: Medición de la pérdida de PMD de una mezcla de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio en comparación con una mezcla de *cis*-PMD y metil- α -glucopiranosido añadidos al papel con diferentes cargas

Para medir la pérdida de PMD de mezclas de *cis*-PMD y metil- α -glucósido, tanto en presencia como en ausencia de la combinación de ácido cítrico y cloruro de calcio, las soluciones madre se prepararon mezclando los materiales en las cantidades que se muestran en la Tabla IX, seguido de un calentamiento suave con una pistola térmica:

TABLA IX

Solución madre	<i>cis</i> -PMD (g)	Metil- α -glucósido (g)	Ácido cítrico. H ₂ O (g)	CaCl ₂ en agua 0,7/1 (p/v) (ml)	EtOH (ml)	H ₂ O (ml)
1	0,3	0,22	0	0	4	0,3
2	0,3	0,22	0,22	0,2	3,3	0,3

Se agregaron gota a gota 50 μ l de cada solución madre sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro y posteriormente se incubaron a 32 °C.

Aproximadamente una cuarta parte de cada disco se cortó después de 19 h y se enjuagó con DMSO- d_6 (0,9 ml). A cada muestra se le añadieron dos gotas de óxido de deuterio que posteriormente se analizó por RMN de 1H . La proporción de *cis*-PMD/metil- α -glucopiranosido se determinó comparando las integrales de sus protones de los espectros de RMN de 1H a 4,15/4,90 ppm respectivamente. Los datos obtenidos para las Soluciones madre 1 y 2 se presentan en la Tabla X a continuación como Experimento N.º 8.1 y 8.4 respectivamente.

Los datos del tiempo cero se obtuvieron mediante análisis de las soluciones madre como se indicó anteriormente.

Los experimentos posteriores se realizaron cargando gota a gota 0,25 y 0,5 ml de las Soluciones madre 1 y 2 en papeles paralelos de la misma manera que se

muestra más arriba. Los datos tomados a los tiempos 22,5 y 45 h también se indican en la Tabla X siguiente:

TABLA X

Exp. N.º		proporción <i>cis</i> -PMD/metil- α - glucopiranosido				% <i>cis</i> -PMD Restante en el papel		
	Tiempo	0 h	19 h	22,5 h	45 h	19 h	22,5 h	45 h
8,1	Sol. madre 1 (50 μ l) (comparativa)	1,54	0,28	NR	NR	18,2	ND	ND
8,2	Sol. madre 1 (0,25 ml) (comparativa)	1,54	NR	0,66	0,12	ND	42,9	7,8
8,3	Sol. madre 1 (0,5 ml) (comparativa)	1,54	NR	1,08	0,28	ND	70,1	18,2
8,4	Sol. madre 2 (50 μ l)	1,54	0,51	NR	NR	33,1	ND	ND
8,5	Sol. madre 2 (0,25 ml)	1,54	NR	1,08	0,36	ND	70,1	23,4
8,6	Sol. madre 2 (0,5 ml)	1,54	NR	1,22	0,54	ND	79,2	35,1

NR = no realizado

ND = no determinado

Los datos demuestran claramente que permanece significativamente más PMD en el papel en presencia de metil- α -glucopiranosido más ácido cítrico y cloruro de calcio que en presencia de metil- α -glucopiranosido solo en diferentes concentraciones de mezcla aplicada.

Ejemplo 9: Efecto de ácidos alternativos sobre la pérdida de PMD del papel

Para medir el efecto de ácidos alternativos sobre la pérdida de PMD del papel, se añadieron 50 μ l de solución de cloruro de calcio anhidro/agua 0,7:1 (p/v) a

0,5 ml de la mezcla de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal preparada como se muestra en el Ejemplo 3.

A alícuotas de 0,1 ml de la mezcla anterior se le añadieron cantidades de 10 mg de ácido *p*-toluenosulfónico y ácido tartárico para proporcionar las mezclas 1 y 2 respectivamente.

Cada una de las mezclas se aplicó a tres discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro que luego se incubaron a 32 °C.

Aproximadamente una cuarta parte de cada disco se cortó después de 27 h, se enjuagó con DMSO- d_6 (0,9 ml) y se analizó por RMN de 1H . La proporción de *cis*-PMD/*cis*-acetal se determinó comparando las integrales de sus protones metílicos de los espectros de RMN de 1H a 1,17 y 1,26 ppm respectivamente.

La proporción de tiempo cero se determinó mediante la integración de los mismos picos de la mezcla de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal.

Los resultados se muestran en la Tabla XI:

TABLA XI

Experimento N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> -PMD/ <i>trans</i> - acetal	
	0 h	27 h
9,1	11,3	9,85
9,2	11,3	3,32

Se observó un nivel bajo de pérdida de *cis*- PMD en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico y ácido tartárico.

Por consiguiente, se pueden utilizar diácidos y ácidos de pKa muy diferentes para proporcionar el mismo efecto de liberación lenta.

Ejemplo 10: Medición de la pérdida de *cis*-PMD de la mezcla de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal, aplicada sobre la piel tanto en presencia como en ausencia de un polímero

Para medir la pérdida de PMD de *cis*-PMD aplicado sobre la piel tanto en presencia como en ausencia de un polímero como Kollicoat® SR 30 D, se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Se disolvió ácido cítrico monohidrato (212 mg) en 3 ml de la mezcla de reacción en bruto de PMD glucovainillina acetal preparada como se muestra en el Ejemplo 3, y 150 μ l de una solución de cloruro de calcio anhidro/agua 0,7:1 (p/v) con calentamiento suave usando una pistola térmica.
- Mezcla 2: Se diluyeron Kollicoat® SR 30 D (0,2 g) y miristato de isopropilo (30 mg) con 1 ml de la Mezcla 1 para dar una solución viscosa, ligeramente opaca después de calentarla suavemente con una pistola térmica.

Cada mezcla (50 μ l) se extendió sobre un área circular de piel del antebrazo de 5 cm de diámetro. El área tratada con la Mezcla 2 fue notablemente menos pegajosa que el área tratada con la Mezcla 1.

Después de 4 horas, cada área se quitó con cinta adhesiva aplicando consecutivamente trozos de 2 x 2 cm x 5 cm de Sellotape® (Miarco Gamma Azul). A continuación, se combinaron las dos cintas utilizadas para pelar cada área, se enjuagó con DMSO- d_6 (1 ml) y la solución resultante se analizó por RMN de 1H .

La proporción de *cis*-PMD/*cis*-acetal se determinó comparando las integrales de sus protones metílicos de los espectros de RMN de 1H a 1,17 y 1,41 ppm respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla XII:

TABLA XII

Mezcla N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> -PMD/ <i>cis</i> - acetal	
	0 h	4 h
1	11,3	14,2
2	11,3	10,0

La proporción de *cis*-PMD/*cis*-acetal fue similar, lo que demuestra que la adición del polímero formador de película y miristato de isopropilo tiene un efecto positivo sobre la sensación en la piel de la mezcla repelente sin afectar significativamente a la tasa de pérdida de PMD.

Ejemplo 11: Efecto repelente *in vivo* – Experimentos comparativos

La siguiente serie de experimentos se realizaron en días separados, pero en condiciones similares. Por lo tanto, las mezclas de volúmenes conocidos que se muestran en las tablas a continuación se distribuyeron sobre una parte inferior de la pierna y la parte superior del pie de un único voluntario varón, de edad mediana, (área de piel aproximada calculada en 1200 cm²). La otra parte inferior de la pierna y el pie del mismo voluntario no fueron tratados o fueron tratados con un volumen conocido de otra mezcla. El voluntario se duchó entre experimentos y se alternaron las piernas tratadas y no tratadas.

En los períodos de tiempo posteriores a la aplicación de la mezcla que se muestran en las tablas a continuación, el voluntario se encontraba en un lugar conocido por estar poblado de mosquitos *A. albopictus* (Sant Cugat del Vallés, España). El voluntario contó el momento en que cada mosquito se posó en cada pierna y, después de sacudirlos, se trasladó a un lugar ligeramente diferente para evitar que el mismo mosquito se posara por segunda vez y reanudó el recuento y el movimiento durante un período de 30 minutos. Si más de un mosquito aterrizaba al mismo tiempo, se contaban todos.

Experimento A: Efecto repelente *in vivo* de la mezcla de Citriodiol®/metil- α -glucopiranosido/ácido cítrico/cloruro de calcio en comparación con Mosiguard® comercial

Se probaron las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Mosiguard® se adquirió por Internet a través de Amazon y estaba fabricado por Citrefine. Mosiguard® tenía un contenido de 30 % de Citriodiol® de acuerdo con la etiqueta.
- Mezcla 2: Se diluyeron Citriodiol® (6,0 g), metil- α -glucopiranosido (2,2 g) y ácido cítrico monohidrato (2,2 g) con etanol (14 ml) y una solución de cloruro de calcio anhidro/agua 0,7:1 (p/v) (2,0 ml). calentando suavemente con una pistola térmica. Se añadieron Kollicoat® SR 30 D (8 ml) y miristato de isopropilo (1,2 ml) para dar una solución viscosa, ligeramente opaca. La mezcla era una

emulsión inestable que se separaba lentamente en dos fases después de unas horas y por lo tanto requería agitación minuciosa antes de la aplicación.

Se aplicó la Mezcla 1 (1 ml) en la pierna izquierda y la Mezcla 2 (2 ml) en la pierna derecha como se ha descrito anteriormente y los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XIII a continuación:

TABLA XIII

Mezcla / Tiempo	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla		
	9 h	12 h	15 h
1 (comparativa)	7	10	1
2	0	0	4

No se observó irritación de la piel en ninguna de las piernas durante la duración del experimento. Se observaron posados significativos de mosquitos en el área tratada con la Mezcla 1 después de 9 h y los posados de mosquitos en el área tratada con la Mezcla 2 solo se observaron después de 15 h.

La Mezcla 2 proporciona claramente un efecto repelente de mosquitos de al menos 3 horas más que la Mezcla 1 en las dosis aplicadas.

Experimento B: Efecto repelente *in vivo* de Mosiguard® a la dosis doble prescrita

Se probó la siguiente mezcla:

- Mezcla 1: se aplicaron 2 ml de Mosiguard® (Citrefine) en la pierna derecha como se ha descrito anteriormente y la pierna izquierda no se trató.

Posados a lo largo del tiempo presentados en la Tabla XIV a continuación:

TABLA XIV

Mezcla / Tiempo	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla				
	2 h	4 h	7,5 h	8,75 h	9,5 h

1 (comparativa)	0	0	0	0	3
Sin tratar	14	8	5	4	9

No se observó irritación de la piel en ninguna de las piernas durante la duración del experimento. Duplicar la dosis de Mosiguard® utilizada en comparación con el Experimento A solo dio una duración de 9,5 h.

Experimento C: Efecto repelente *in vivo* de una mezcla de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio

Se probó la siguiente mezcla:

- Mezcla 1: Se diluyeron *cis*-PMD (0,6 g), metil- α -glucopiranosido (0,22 g) y ácido cítrico monohidrato (0,22 g) con etanol (1,4 ml) y una solución de cloruro de calcio anhidro/agua 0,7:1 (p/v) (0,2 ml) con calentamiento suave utilizando una pistola térmica. Se añadieron Kollicoat® SR 30 D (0,8 ml) y miristato de isopropilo (0,12 ml) para dar una solución viscosa, ligeramente opaca. La mezcla era una emulsión inestable que se separaba lentamente en dos fases después de unas horas y por lo tanto requería agitación minuciosa antes de la aplicación. Se aplicaron 2 ml de la Mezcla 1 a la pierna izquierda como se ha descrito anteriormente y la pierna derecha no se trató.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XV a continuación:

TABLA XV

Mezcla / Tiempo	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla				
	2 h	5 h	8 h	10 h	14 h
1	0	1	0	0	0
Sin tratar	6	7	12	7	2

Al final del experimento, cuando no se observó más actividad de mosquitos, se quitó con cinta adhesiva un área circular de piel sin pelo de aproximadamente 5 cm de diámetro en la pierna izquierda tratada, se trató y analizó por RMN de ^1H como en el Ejemplo 10. La excepción fue que se añadieron 2 gotas de óxido de deuterio a la muestra de RMN antes del análisis. Aproximadamente el 25 %

de *cis*-PMD permaneció en la piel al comparar las integrales del multiplete de *cis*-PMD a 4,14 ppm con el doblete de metil- α -glucósido a 4,52 ppm.

No se observó irritación de la piel en ninguna de las piernas durante la duración del experimento. Esta mezcla produjo un olor mucho menor en la piel que la mezcla de Citriodiol® utilizada en el Experimento A.

La mezcla 1 produjo un efecto repelente de mosquitos durante al menos 14 h. El resto del 25 % de sustancia activa sugiere que podría haber sido posible una duración aún mayor si no se hubiera perdido la actividad del mosquito.

Experimento D: Efecto repelente *in vivo* del 20 % (v/v) de DEET en etanol

Se probó la siguiente mezcla:

- Mezcla 1: Se diluyeron 20 ml de *N,N*-dietil-meta-toluidina (DEET) hasta 100 ml con etanol. Se aplicó 1 ml de la mezcla 1 en la pierna izquierda como se ha descrito anteriormente y la pierna derecha no se trató.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XVI a continuación:

TABLA XVI

Mezcla / Tiempo	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla		
	3 h	5,5 h	7,5 h
1 (comparativa)	0	0	7
Sin tratar	7	14	19

Se puede observar que el 20 % (v/v) de DEET proporcionó una duración de protección significativamente menor que las mezclas utilizadas en los Experimentos A y C.

Ejemplo 12: Medición de la pérdida de *cis*-PMD de una mezcla de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio en la piel

Se preparó una mezcla como se describe en el Ejemplo 11, Experimento C.

La mezcla (50 µl) se extendió sobre áreas circulares de la piel del antebrazo de 7 x 5 cm de diámetro.

Después de varios períodos de tiempo, cada área se quitó con cinta adhesiva como se describe en el Ejemplo 10, se enjuagó con DMSO-d₆ (1 ml), se añadieron 2 gotas de óxido de deuterio y las soluciones resultantes se analizaron por RMN de ¹H.

La proporción de *cis*-PMD/metilglucopiranosido se determinó mediante comparación de las integrales del multiplete de *cis*-PMD a 4,14 ppm con el doblete de metil-α-glucósido a 4,52 ppm respectivamente y se calculó el *cis*-PMD restante.

La Tabla XVII muestra la linealidad de la pérdida de *cis*-PMD:

TABLA XVII

Tiempo	0 h	6 h	9h	12h	20h	25h	46.5h
% <i>cis</i> -PMD restante en la piel	100	88	85	77	(126)	54	23

Excluyendo el resultado atípico obtenido después de 20 horas, se ha demostrado claramente que la pérdida de *cis*-PMD de la piel ocurre de forma lineal.

Ejemplo 13: Medición de la pérdida de *cis*-PMD y *trans*-PMD de mezclas de *cis*- o *trans*-PMD, metil-α-glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio en la piel

Se prepararon mezclas paralelas como se describe en el Ejemplo 11, Experimento C, pero la Mezcla 1 contenía *cis*-PMD y la Mezcla 2 contenía *trans*-PMD.

Cada mezcla (50 µl) se distribuyó sobre áreas circulares de la piel del antebrazo de 2 x 5 cm de diámetro.

En el tiempo cero y después de 6 horas, cada área se quitó con cinta adhesiva como se describe en el Ejemplo 10, se enjuagó con DMSO-d₆ (1 ml), se añadieron 2 gotas de óxido de deuterio y las soluciones resultantes se analizaron por RMN de ¹H.

La proporción de *cis*-PMD/Metilglucósido se determinó mediante comparación de las integrales del multiplete de *cis*-PMD a 4,14 ppm con el doblete de metil-α-glucósido a 4,52 ppm respectivamente y se calculó el *cis*-PMD restante.

La proporción de *trans*-PMD/Metilglucósido se determinó mediante comparación de las integrales de la señal de metilo del *trans*-PMD en *cis* 1,05 ppm (dividido por 3) con el doblete de metil- α -glucopiranosido en 4,52 ppm.

La tabla XVIII muestra los resultados:

TABLA XVIII

Número de mezcla	Proporción PMD/Metilglucósido	
	0 h	6 h
1	3,22	3,62
2	3,33	2,66

La integración en este ejemplo no fue particularmente confiable debido al corto período de tiempo, pero fue digno de mención que la Mezcla 1 tenía un olor a PMD en la piel mientras que la Mezcla 2 era inodoro, lo que abrió la posibilidad de desarrollar un repelente inodoro.

Ejemplo 14: Medición de la pérdida de *cis*-PMD de mezclas de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido carboxílico y cloruro de calcio en la piel

Se prepararon mezclas paralelas como se describe en el Ejemplo 11, Experimento C, pero la Mezcla 1 contenía monohidrato de ácido cítrico y la Mezcla 2 contenía ácido succínico (ambas con los mismos equivalentes en peso).

Cada mezcla (50 μ l) se distribuyó sobre áreas circulares de la piel del antebrazo de 3 x 5 cm de diámetro.

En diversos puntos temporales, cada área se quitó con cinta adhesiva como se describe en el Ejemplo 10, se enjuagó con DMSO- d_6 (1 ml), se añadieron 2 gotas de óxido de deuterio y las soluciones resultantes se analizaron por RMN de 1H .

La proporción de *cis*-PMD/metil- α -glucopiranosido se determinó mediante comparación de las integrales del multiplete de *cis*-PMD a 4,14 ppm con el doblete de metil- α -glucopiranosido a 4,52 ppm respectivamente y se calculó el *cis*-PMD restante.

La tabla XIX muestra los resultados:

TABLA XIX

Mezcla N.º / Tiempo	Proporción PMD/Glucopiranosido
---------------------	--------------------------------

	8 h	17,5 h	32 h
1	2,0	ND	1,47
2	2,0	1,89	1,66

Se puede observar que la tasa de pérdida de PMD de mezclas que contienen ácido cítrico y ácido succínico es comparable a pesar de su considerable diferencia de pKa.

Ejemplo 15: Medición de la pérdida de PMD por RMN de ^1H de discos de papel paralelos que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD racémico y *trans*-PMD glucovainillina acetal (*trans*-acetal) con ácido cítrico y diversos haluros metálicos

Se prepararon mezclas paralelas como se muestra en la Tabla XX:

TABLA XX

Experimento N.º	Solución madre 1 (μl)	Sal (5 mg)
15,1	60	Cloruro de calcio (anhidro)
15,2	60	Ninguno
15,3	60	Cloruro de magnesio
15,4	60	Bromuro de magnesio
15,5	60	Yoduro de cinc
15,6	60	Cloruro de cobalto
15,7	60	Cloruro de cinc
15,8	60	Bromuro de cinc

Se preparó la siguiente solución madre:

- Solución madre 1: 0,11 g de *cis/trans*-PMD, Se disolvieron 75 mg de *trans*-PMD glucovainillina acetal y 90 mg de ácido cítrico monohidrato en 0,6 ml de EtOH y 110 μl de agua.

Se añadió la solución madre 1 (60 µl) a viales de vidrio que contenían diferentes sales (5 mg) como se indica en la Tabla XX anterior.

Después de mezclar bien y calentar suavemente para disolver todos los sólidos, el contenido de cada vial se añadió gota a gota sobre toda la superficie de discos de papel toalla paralelos de 5 cm de diámetro que posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente una cuarta parte de cada disco de papel después de 2 h y 20,5 h, se enjuagó con DMSO-d₆ (0,9 ml) y se analizó por RMN de ¹H.

La proporción de *cis*-PMD/Acetal total se determinó mediante comparación de las integrales de las señales de los espectros de RMN de ¹H del *cis*-PMD a 4,15 ppm y las señales de acetal combinadas a 5,70 y 5,68 ppm. Hay que señalar que en algunos casos se observó cierta isomerización del acetal, como en el Ejemplo 7, pero esto no se correlacionó con la retención de PMD.

La diferencia en la proporción entre los dos puntos temporales se muestra en la Tabla XXI a continuación:

TABLA XXI

Experimento N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> -PMD/Acetal total		pérdida de <i>cis</i> - PMD durante el período de 18,5 h (%)
	2 h	20,5 h	
15,1	1,85	1,45	22
15,2 (comparativa)	1,92	0,60	69
15,3	2,38	1,79	25
15,4	2,00	1,14	43
15,5	1,64	1,25	24
15,6	2,13	2,00	6
15,7	2,33	2,17	7
15,8	2,00	1,66	17

Todos los haluros de metales divalentes probados dieron una baja tasa de pérdida de PMD en comparación con la mezcla sin sal. Las sales de cinc y cobalto fueron más eficaces que las sales de calcio o magnesio. Los cloruros fueron más eficaces que los bromuros o el yoduro.

Ejemplo 16: Medición de la pérdida de PMD por RMN de ^1H de discos de papel paralelos que contienen una mezcla isomérica de *cis/trans*-PMD racémico, ácido cítrico, cloruro de calcio y glucósidos alternativos

Se prepararon mezclas paralelas como se muestra en la Tabla XXII:

Tabla XXII

Experimento N.º	Glucósido (5 mg)	Solución madre 1 (μl)	Solución madre 2 (μl)
16,1	Metil- β -D-glucopiranosido	60	0
16,2	<i>trans</i> -acetal	60	0
16,3	Metil- α -D-manopiranosido	60	0
16,4	<i>trans</i> -acetal	0	60
16,5	Metil- α -D-galactopiranosido	60	0
16,6	α -D-glucopiranosido de metilo	60	0

Se prepararon las siguientes soluciones madre:

- Solución madre 1: Una mezcla de 0,12 g de *cis/trans*-PMD, 90 mg de ácido cítrico monohidrato y 77 mg de cloruro de calcio anhidro se disolvió en etanol (0,6 ml) y agua desionizada (110 μl) con calentamiento suave usando una pistola térmica.
- Solución madre 2: Una mezcla de 0,12 g de *cis/trans*-PMD y 90 mg de ácido cítrico monohidrato se disolvió en etanol (0,6 ml) y agua destilada (110 μl).

Se pesaron los glucósidos (5 mg) mostrados en la Tabla XXII en viales de vidrio paralelos, se añadieron 60 μl de la Solución madre 1 o 2.

Las mezclas resultantes se calentaron suavemente usando una pistola térmica para formar soluciones incoloras y la totalidad de cada mezcla se añadió gota a gota sobre toda la superficie de discos de toalla de papel paralelos de 5 cm de diámetro que posteriormente se incubaron a 32 °C.

Se cortó aproximadamente una cuarta parte de cada disco de papel después de 2,25 h y 19 h, se enjuagó con DMSO-d6 (1 ml), se añadieron 2 gotas de óxido de deuterio y las muestras se analizaron por RMN de ¹H.

La proporción de *cis*-PMD/glucósido se determinó a partir de:

- Experimento 16.1: Picos a 4,65/4,02 ppm
- Experimento 16.2: Debido a cierta isomerización inicial del acetal en solución antes de la adición al papel como se menciona en el ejemplo 7, la proporción de *cis*-PMD/Acetal total se determinó mediante comparación de las integrales de las señales de los espectros de RMN de ¹H del *cis*-PMD a 4,15 ppm y las señales de acetal combinadas a 5,70 y 5,68 ppm.
- Experimento 16.3: Picos a 4,14/4,48 ppm
- Experimento 16.4: En cuanto al Experimento 16.2
- Experimento 16.5: Picos a 4,14/4,51 ppm
- Experimento 16.6: Picos a 4,14/4,50 ppm

La diferencia en la proporción se utilizó a continuación para determinar el alcance de la pérdida de PMD, como se muestra en la Tabla XXIII:

TABLA XXIII

Experimento N.º / Tiempo	proporción <i>cis</i> - PMD/Glucósido		<i>cis</i> -Pérdida de PMD durante un período de 16,75 h (%)
	2,25 h	19 h	
16,1	0,62	0,44	29
16,2	2,17	1,43	34
16,3	0,71	0,62	12,7
16,4 (comparativa)	2,22	0,71	68
16,5	0,45	0,37	18
16,6	0,48	0,37	23

Puede verse claramente que la presencia de todos los glucósidos dio como resultado una retención de PMD en comparación con el Experimento 16.4 de control (donde no se había añadido cloruro de calcio).

Por consiguiente, el efecto de liberación lenta de PMD se puede mantener usando una amplia gama de glucósidos que muestran una variación en el tipo de aglicona (véase Ejemplo 7), la estereoquímica del azúcar (tipo de azúcar) y la estereoquímica del enlace glucosídico.

Ejemplo 17: Efecto repelente *in vitro* de la mezcla de Citriodiol[®], metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio en comparación con Mosiguard[®] comercial

Se criaron y mantuvieron mosquitos *Aedes albopictus* a una temperatura de 26 ± 2 °C, humedad relativa $\geq 80\% \pm 10$, con un fotoperiodo de 12 h:12 h (luz:oscuridad). A las poblaciones de mosquitos adultos se les permitió alimentarse de solución azucarada (10 %), pero no fueron alimentados con sangre antes de las pruebas.

Se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Mosiguard[®] se adquirió por Internet a través de Amazon y producido por Citrefine y con un contenido de Citriodiol[®] 30 v/v de acuerdo con la etiqueta.
- Mezcla 2: Se diluyeron Citriodiol[®] (6,0 g), metil- α -glucopiranosido (2,2 g) y ácido cítrico monohidrato (2,2 g) con etanol (14 ml) y una solución de cloruro de calcio anhidro/agua 0,7:1 p/v (2,0 ml) con calentamiento suave usando una pistola térmica. Se añadieron Kollicoat[®] SR 30 D (8 ml) y miristato de isopropilo (1,2 ml) para dar una solución viscosa, ligeramente opaca. La mezcla era una emulsión inestable que se separaba lentamente en dos fases después de unas horas y por lo tanto requería agitación minuciosa antes de la aplicación.

Se esparcieron 60 μ l de la Mezcla 1 sobre cada una de las cuatro membranas Hemotek paralelas extendidas a lo largo de recipientes metálicos Hemotek de 3,7 cm de diámetro que contenían sangre de oveja. Se trataron cuatro membranas más de la misma manera con 60 μ l de la Mezcla 2. Otra membrana quedó sin tratar.

Después de permitir que el disolvente residual se secase durante aproximadamente 5 minutos, las muestras se conectaron a unidades calefactoras Hemotek a 37 °C, los recipientes de cubierta de membrana se dejaron calentar durante 5 minutos y las membranas posteriormente se expusieron a mosquitos hembra buscadores de hospedadores activos de 5 a 7 días de edad, se seleccionaron y

recogieron usando un aspirador y se organizaron en lotes (15 hembras) en recipientes de prueba de plástico de 12 x 20 cm y se registró el número de posados durante un período de 20 minutos.

Los recipientes recubiertos con membrana se separaron de las unidades de calentamiento Hemotek y se almacenaron en una incubadora a 32 °C, se volvieron a fijar periódicamente a las unidades calefactoras Hemotek calentadas en varios intervalos de tiempo para determinar los posados de mosquitos frente a lotes frescos de mosquitos como se ha descrito anteriormente.

Las membranas tratadas con la Mezcla 1 demostraron un efecto repelente significativo en comparación con la membrana no tratada durante las primeras cuatro horas, pero una pérdida notable de actividad repelente después de 6 h. Por el contrario, las membranas tratadas con la Mezcla 2 mantuvieron una actividad repelente constante durante el período de prueba de 6 h.

Se puede concluir que la mezcla que contiene Citriodiol®, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio mantuvo un efecto de mayor duración que el mismo volumen de Mosiguard® a pesar del menor contenido de Citriodiol® de la primera.

Ejemplo 18: Prueba del efecto repelente *in vivo*

En este ejemplo se realizó una comparación del efecto repelente de la mezcla de Citriodiol®, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio con Mosiguard® comercial mediante la prueba del brazo en jaula *in vivo* utilizando mosquitos *Aedes albopictus*.

Se utilizaron los procedimientos de la ECHA (Agencia Europea de Productos Químicos) (última actualización en marzo de 2022) para diseñar ensayos para probar repelentes contra mosquitos. La evaluación de la actividad repelente se llevó a cabo en condiciones climáticas controladas en un volumen de cámara de aproximadamente 78 m³. Todas las pruebas se realizaron con hembras de mosquito tigre asiático no alimentadas con sangre, de 5-10 días de edad. Los insectos se criaron en condiciones de laboratorio: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 60 ± 5 %, y fotoperiodo de 12:12h (L:O). Se les dio agua azucarada (5 %) antes y durante el período de prueba para promover su buena forma. El trabajo se realizó con 4 participantes (2 hombres y 2 mujeres, con edades entre 19 y 54 años). Todos firmaron un formulario de consentimiento informado por escrito explicando el propósito y los

procedimientos del estudio, así como su papel en el estudio. Se pidió a los participantes que evitaran el uso de fragancias, nicotina, alcohol y repelentes 12 h antes de la prueba. Antes de la aplicación del repelente, la piel a exponer se lavó con jabón sin perfume, se aclaró con agua, se aclaró con etanol al 70 % y luego se secó con una toalla. Se llevó a cabo una prueba convencional AIC (brazo en jaula) (OMS, 2009 y EPA, 2010). Se prepararon ocho jaulas (2 por participante) de 30 x 30 x 30 cm 24 h antes de la prueba con una densidad de aproximadamente 38 mosquitos.

Se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Mosiguard® se adquirió por Internet a través de Amazon y producido por Citrefine y con un contenido de Citrionol® 30 v/v de acuerdo con la etiqueta.
- Mezcla 2: Se diluyeron Citrionol® (3,0 g), metil- α -glucopiranosido (0,19 g) y ácido succínico (2,2 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,07 g) con etanol absoluto (3,00 g), Kollicoat® SR 30 D (2,30 g) y solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M (0,25 ml). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido viscoso transparente.

El antebrazo izquierdo se trató con la Mezcla 1 a una dosis de aplicación de 1 ml por 600 cm² y lo mismo se hizo con la Mezcla 2 en el antebrazo derecho. La cantidad de repelente a aplicar se calculó en función de las medidas del brazo (circunferencia y longitud) de cada participante, teniendo en cuenta la zona a exponer. La actividad repelente se midió exponiendo el antebrazo de cada participante a los mosquitos en la jaula, 3 minutos cada hora durante un período de hasta 8 h o hasta que se detectaba la pérdida de actividad repelente contando el número de posados en cada periodo de exposición. La primera exposición (T1) fue una hora después de la aplicación de la mezcla sobre la piel.

Un posado se producía cuando un mosquito volador se posaba sobre la piel sin sondear ni picar. El sondeo se producirá cuando un mosquito penetraba la piel con su aparato bucal sin ingerir sangre. Cuando se producía un posado, para evitar que los mosquitos picasen y se alimentasen, se le permitía a los participantes sacudir lentamente el brazo o soplar ligeramente.

Se estimó el Tiempo de protección completa (CPT) de cada mezcla. CPT es la primera ocasión de sondeo que debe ser confirmada por una segunda ocasión de sondeo durante el mismo período de exposición de 3 minutos o el siguiente.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XXIV a continuación:

TABLA XXIV

Mezcla	Voluntario (Sexo)	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla									
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h
1	1 (H)	0	0	1	5	4	5	7	12	4	10
1	2 (H)	0	0	0	1	4	6	5	2	0	6
1	3 (M)	0	0	0	1	2	4	9	11	2	6
1	4 (M)	0	0	0	0	0	1	2	12	16	10
2	1 (H)	1	1	0	2	1	2	4	2	3	9
2	2 (H)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4
2	3 (M)	0	0	1	0	2	2	2	3	4	4
2	4 (M)	0	0	0	0	0	0	2	2	3	4

La mezcla 2 mostró claramente un CPT medio más prolongado (4,75 h) en comparación con la mezcla 1 (3,25 h). El análisis estadístico demostró que la mezcla 2 proporcionó una duración aproximadamente un 50 % mayor que la de Mosiguard® comercial (mezcla 1) a la misma dosis de Citriodiol aplicada.

No se observó irritación de la piel con ninguna de las mezclas.

Se preparó un lote diferente de una Mezcla 2 idéntica en una escala de 200 g y se ensayó con una aplicación a 1,4 ml/600 cm². Se utilizó una superficie de 100 cm² de piel expuesta y 80 mosquitos por caja en pruebas realizadas con 10 voluntarios durante 12 h. Los tiempos de protección completos fueron 9, 11, 12, 12, 12, 12, 12, 12 y 9 h, siendo el tiempo medio de protección 11 horas, pero esto podría ser mayor si la prueba se hubiera realizado durante más tiempo.

Ejemplo 19: Prueba del efecto repelente *in vivo*

En este ejemplo se realizó una comparación del efecto repelente de una mezcla de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio con una

mezcla de *trans*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio mediante la prueba de brazo en jaula *in vivo* utilizando mosquitos *Aedes albopictus*.

Se realizaron pruebas de mosquitos con brazo en jaula usando esencialmente el mismo procedimiento mostrado en el Ejemplo 18 excepto que se aplicaron 1,5 ml de cada mezcla a una superficie de 600 cm² de cada antebrazo de cuatro voluntarios.

Se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Se diluyó una mezcla de *cis*-PMD (3,0 g), metil- α -glucopiranosido (0,64 g), ácido succínico (0,64 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,24 g) con etanol absoluto (2,92 g), una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M (0,42 g), agua desionizada (1,30 g) y Kollicoat® SR 30 D (0,3 g). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido opaco incoloro.
- Mezcla 2: Se diluyó una mezcla de *trans*-PMD (3,0 g), metil- α -glucopiranosido (0,64 g), ácido succínico (0,64 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,24 g) con etanol absoluto (2,92 g), una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M (0,42 g), agua desionizada (1,30 g) y Kollicoat® SR 30 D (0,3 g). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido opaco incoloro.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XXV a continuación:

TABLA XXV

Mezcla	Voluntario (Sexo)	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla							
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
1	1 (H)	1	0	0	1	0	0	0	1
1	2 (H)	1	0	0	0	0	0	1	1
1	3 (M)	1	0	1	1	1	1	2	1
1	4 (M)	0	1	0	0	0	2	1	2
2	1 (H)	0	1	0	2	1	2	4	2

2	2 (H)	0	0	2	0	1	0	0	1
2	3 (M)	1	1	2	0	1	3	2	9
2	4 (M)	1	1	2	4	2	4	6	4

La mezcla 1 mostró una CPT media más larga (4 h) en comparación con la mezcla 2 (1,75 h). Ambas mezclas se comportaron de manera similar con los voluntarios varones, la Mezcla 1 dio un resultado ligeramente mejor que la Mezcla 2 frente a las voluntarias.

No se observó irritación de la piel con ninguna de las mezclas.

Ejemplo 20: Prueba del efecto repelente *in vivo*

En este ejemplo, se realizó una prueba simulada de larga duración de una mezcla que contenía una concentración reducida de *cis*-PMD, *cis/trans*-PMD y Citriodiol®, en comparación con una solución diluida de Mosiguard® y soluciones comparativas de *cis*-PMD y *trans*-PMD en etanol absoluto, usando la prueba de brazo en jaula *in vivo* utilizando mosquitos *Aedes albopictus*.

El objetivo de este experimento fue simular el efecto repelente durante un período más prolongado en comparación con una mezcla que contiene una concentración reducida de *cis*-PMD, Citriodiol® y *cis/trans*-PMD, pero no una concentración reducida de metil- α -glucopiranosido, ácido succínico, cloruro de magnesio o Kollicoat® SR 30 D, con Mosiguard®, *cis*-PMD y *trans*-PMD, donde la concentración del principio activo se había diluido en una medida similar con etanol.

Se realizaron pruebas de mosquitos con brazo en jaula usando esencialmente el mismo procedimiento mostrado en el Ejemplo 18 excepto que se aplicaron 1,5 ml de cada mezcla a una superficie de 600 cm² de cada antebrazo de cuatro voluntarios.

Se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1 (comparativa): 4 ml de Mosiguard®, adquirido por Internet a través de Amazon y producido por Citrefine y que tiene un contenido de Citriodiol® 30 v/v de acuerdo con la etiqueta, se diluyó con etanol absoluto (6 ml).
- Mezcla 2: Una mezcla de *cis*-PMD (1,44 g), metil- α -glucopiranosido (1,32 g), ácido succínico (1,30 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,50 g) se diluyó con

etanol absoluto (9,5 ml), agua desionizada (5,5 ml) y Kollicoat® SR 30 D (1,2 ml). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido opaco incoloro.

- Mezcla 3: Una mezcla de *cis/trans*-PMD (1,44 g), metil- α -glucopiranosido (1,32 g), ácido succínico (1,30 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,48 g) se diluyó con etanol absoluto (8,3 ml), agua desionizada (1,8 ml), Kollicoat® SR 30 D (4,8 ml) y glicerina (1,2 ml). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para dar un líquido viscoso.
- Mezcla 4: Una mezcla de Citriodiol® (1,44 g), metil- α -glucopiranosido (1,32 g), ácido succínico (1,30 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,48 g) se diluyó con etanol absoluto (8,3 ml), agua desionizada (1,8 ml), Kollicoat® SR 30 D (4,8 ml) y glicerina (1,2 ml). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para dar un líquido viscoso.
- Mezcla 5 (comparativa): Se disolvió *cis*-PMD (0,72 g) en etanol absoluto (9,6 ml) para dar un líquido transparente.
- Mezcla 6 (comparativa): Se disolvió *cis/trans*-PMD comercial (0,72 g) en etanol absoluto (9,6 ml) para dar un líquido transparente.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XXVI a continuación:

TABLA XXVI

Mezcla	Voluntario (Sexo)	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla							
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
1	1 (H)	2	8	3	5	12	15	17	28
1	2 (H)	6	3	8	5	6	20	18	19
1	3 (M)	0	0	7	10	15	16	19	38
1	4 (M)	0	0	0	0	15	23	30	26
2	1 (H)	3	0	0	0	6	7	3	4

2	2 (H)	0	1	0	0	0	0	4	2
2	3 (M)	0	3	3	4	6	7	3	4
2	4 (M)	1	0	2	0	0	0	0	0
3	1 (H)	0	1	2	1	4	2	1	5
3	2 (H)	0	0	0	0	0	0	5	6
3	3 (M)	1	3	3	4	7	2	2	6
3	4 (M)	7	1	2	0	1	2	3	2
4	1 (H)	2	3	1	3	8	21	25	12
4	2 (H)	1	1	2	1	0	4	10	0
4	3 (M)	0	0	0	2	5	2	9	8
4	4 (M)	6	1	0	0	0	0	0	0
<i>5</i>	<i>1 (H)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>0</i>	<i>2</i>
<i>5</i>	<i>2 (H)</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>7</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>16</i>	<i>22</i>	<i>21</i>
<i>5</i>	<i>3 (M)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	<i>10</i>	<i>13</i>	<i>10</i>
<i>5</i>	<i>4 (M)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>4</i>	<i>14</i>	<i>12</i>	<i>27</i>	<i>57</i>	<i>58</i>
<i>6</i>	<i>1 (H)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>15</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>6</i>	<i>2 (H)</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>10</i>
<i>6</i>	<i>3 (M)</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>9</i>	<i>1</i>	<i>11</i>	<i>10</i>	<i>21</i>
<i>6</i>	<i>4 (M)</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>29</i>	<i>47</i>

(Las mezclas comparativas se muestran en *cursiva*, y mezclas de la invención en **negrita**)

La Mezcla 2 mostró claramente una degradación más lenta en la actividad repelente en comparación con la Mezcla 5, lo que demuestra que el *cis*-PMD, cuando se formula con metil- α -glucopiranosido, ácido succínico y cloruro de magnesio de acuerdo con la invención, tenía un impacto positivo significativo sobre el rendimiento repelente del *cis*-PMD *in vivo* en comparación con la misma concentración de *cis*-PMD

formulado de forma tradicional (en alcohol). La Mezcla 3 mostró claramente una degradación más lenta en la actividad repelente en comparación con la Mezcla 6, demostrando que el *cis/trans*-PMD, cuando se formula con metil- α -glucopiranosido, ácido succínico y cloruro de magnesio de acuerdo con la invención, tenía un impacto positivo significativo sobre el rendimiento repelente del *cis/trans*-PMD *in vivo* en comparación con la misma concentración de *cis/trans*-PMD formulado de forma tradicional (en alcohol). Como término medio, La Mezcla 4 mostró claramente una degradación más lenta en la actividad repelente en comparación con la Mezcla 1, lo que demuestra que el Citriodiol[®], cuando se formula con metil- α -glucopiranosido, ácido succínico y cloruro de magnesio de acuerdo con la invención, tenía un impacto positivo significativo sobre el rendimiento repelente de Citriodiol[®] *in vivo* comparado con la misma concentración de Citriodiol[®] formulado de forma tradicional (Mosiguard[®] diluido).

Ejemplo 21: Prueba del efecto repelente *in vivo*

En este ejemplo se realizó una comparación del efecto repelente de una mezcla de *cis*-PMD, metil- α -glucopiranosido, ácido cítrico y cloruro de calcio con y sin ajuste de pH mediante la prueba de brazo en jaula *in vivo* utilizando mosquitos *Aedes albopictus*.

Las pruebas de mosquitos con brazo en jaula se realizaron usando esencialmente el mismo procedimiento mostrado en el Ejemplo 18, excepto que se aplicó 1 ml de cada mezcla a una superficie de 600 cm² de cada antebrazo de cuatro voluntarios.

Se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla 1: Una mezcla de *cis*-PMD (1,2 g), metil- α -glucopiranosido (0,64 g), ácido succínico (0,64 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,24 g) se diluyó con etanol absoluto (3,24 g), una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M (0,42 g), agua desionizada (2,50 g) y Kollicoat[®] SR 30 D (0,30 g). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido opaco incoloro.
- Mezcla 2: Una mezcla de *cis*-PMD (1,2 g), metil- α -glucopiranosido (0,64 g), ácido succínico (0,64 g) y cloruro de magnesio anhidro (0,24 g) se diluyó con etanol absoluto (3,56 g), agua desionizada (2,50 g) y Kollicoat[®] SR 30 D (0,30 g). La mezcla se calentó suavemente con una pistola térmica para proporcionar un líquido opaco incoloro.

Los posados a lo largo del tiempo se presentan en la Tabla XXVII a continuación:

TABLA XXVII

Mezcla	Voluntario (Sexo)	Posados de mosquitos observados en el momento posterior a la aplicación de la mezcla					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
1	1 (H)	1	1	1	2	3	6
1	2 (H)	8	4	6	2	5	5
1	3 (M)	0	0	1	3	6	3
1	4 (M)	0	3	0	2	3	2
2	1 (H)	3	1	5	9	6	12
2	2 (H)	4	1	6	12	10	6
2	3 (M)	2	2	2	3	3	7
2	4 (M)	2	7	6	13	16	12

La Mezcla 1 mostró una tasa ligeramente reducida de pérdida de actividad repelente con el tiempo que la Mezcla 2.

No se observó irritación de la piel con ninguna de las mezclas.

Ejemplo 22: Extracción de *cis/trans*-PMD racémico puro de Citriodiol® y posterior cristalización selectiva de *cis*-PMD racémico

Citriodiol® (30,0 g) se disolvió en hexanos (200 ml). Se añadió etanol (0,10 ml) seguido de cloruro de calcio anhidro (19,3 g, aproximadamente 1,4 equivalentes con respecto al PMD total en el Citriodiol®) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y el residuo sólido blanco se lavó con hexanos (20 ml). A continuación, el residuo se disolvió en una mezcla de agua (100 ml) y hexanos (100 ml), la fase acuosa se eliminó mediante separación y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida para proporcionar *cis/trans*-PMD racémico (20,8 g, aproximadamente 99 % de recuperación basada en el PMD total en el Citriodiol®). El producto era idéntico al *cis/trans*-PMD auténtico por RMN de ¹H y

contenía esencialmente la misma proporción Cis/Trans que en el Citriodiol® inicial (aproximadamente 6:4 *cis/trans*-PMD). También podría usarse cloruro de magnesio anhidro en lugar de cloruro de calcio anhidro para dar esencialmente los mismos resultados.

Se disolvió *cis/trans*-PMD racémico (100,0 g) en acetato de etilo (15 ml) calentando a 70 °C. Se añadió gota a gota hexano (30 ml) y la solución se enfrió hasta temperatura ambiente y después se enfrió adicionalmente hasta 15 °C. Se continuó la agitación durante 3 horas y la mezcla se filtró para proporcionar *cis*-PMD racémico (33,0 g, aproximadamente 53 % basado en el *cis*-PMD presente en el material de partida) como un sólido blanco. El material era idéntico al auténtico *cis*-PMD por RMN de ¹H.

Se obtuvieron resultados similares mediante recristalización utilizando 10 volúmenes de heptano con respecto al material de partida.