



**Aplicación de la técnica de fluidos supercríticos
en la impregnación de soportes poliméricos con
bioactividad insecticida y/o repelente**

**Tesis doctoral
Claudia Cecilia Maya Posada**

**Laboratorio de Procesos y Productos Agroalimentarios
Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias**

Cádiz, junio de 2022



**Aplicación de la técnica de fluidos supercríticos en la impregnación de
soportes poliméricos con bioactividad insecticida y/o repelente**

Laboratorio de Procesos y Productos Agroalimentarios

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencias

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cádiz, presentada por:

CLAUDIA CECILIA MAYA POSADA

Cádiz, junio de 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis doctoral Lourdes y Casimiro, por su tiempo, dedicación y esfuerzo. Os agradezco la ayuda que me habéis dado durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Sin vuestro apoyo no podría estar escribiendo estas líneas.

Quiero darles las gracias a mis padres, Javier y Nohemi sin ellos todo esto no hubiera sido posible. Me enseñaron el valor del estudio y del conocimiento. Gracias por vuestro esfuerzo para darme una formación, gracias por creer en mí siempre y sobre todo por enseñarme los valores más importantes de la vida. No habrá palabras suficientes ni que expresen todo lo que debo agradeceros. Gracias a mis hermanos, Nando, Rubén y Octavio, gracias por vuestro cariño, vuestra compañía en la distancia, por esas horas de charla distendida, por hacerme el camino más fácil y preocuparos siempre por mí. Gracias a José Luis, por su apoyo incondicional, por la complicidad que hay entre nosotros, por todos los momentos que compartimos juntos. A mis hijos, Helena y Luis, que

con vuestra llegada llenasteis mi vida de felicidad; gracias por vuestro amor puro y sincero, por vuestra paciencia y comprensión en aquellos momentos en que no he podido estar con vosotros tanto como debería y como os merecéis.

Gracias a mis amigos de siempre Nidia, Gloria Tejada, Mabel, Natalia López, Gabriela, Gloria Giraldo, Beatriz, Luz Orlandy, Germán, Jaime, Nora, Caliche y Carlos; gracias a mis amigos incondicionales Carmenza Uribe, Cecilia Ramírez, Luz Helena Velásquez, Mauricio Rojas, Inma Álvarez, Azahara, María José y Eridia. Gracias a todos mis amigos, con quienes comparto tanto en medio de la distancia. A todos y cada uno de vosotros os agradezco vuestro cariño y amistad que me llena de alegría y me da fuerzas en los momentos más duros.

Gracias a todas aquellas personas que siempre han estado ahí, acompañándome y ayudándome en esto que se llama vida.

*A mis padres, Javier y Nohemi,
a mis hermanos y a mi familia,
a mis hijos Helena y Luis,
a José Luis*

Cuando el objetivo te parezca difícil, no
cambies de objetivo; busca un nuevo camino
para llegar a él.

Confucio

CONTENIDO

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes bibliográficos	6
2.1	Los plaguicidas	7
2.1.1	Las piretrinas	11
2.1.2	Uso de plaguicidas para el control de plagas en la agricultura.....	13
2.2	Los plásticos en el sector agroalimentario.....	17
2.3	Fluidos supercríticos.....	24
2.3.1	El CO ₂ como fluido supercrítico.....	26
2.3.2	Extracción mediante fluidos supercríticos.....	28
2.3.3	Aplicación de la ESC a la obtención de piretrinas	34
2.3.4	Impregnación mediante fluidos supercríticos.....	37
2.3.5	Funcionalización de materiales plásticos con productos naturales	42
2.3.6	Impregnación supercrítica de plásticos con plaguicidas.....	47
3	Materiales y métodos.....	50
3.1	Materia prima, reactivos y disolventes utilizados	51
3.2	Equipos de extracción e impregnación.....	53
3.3	Procedimiento y condiciones de operación en extracción supercrítica	57
3.4	Procedimiento y condiciones de operación en impregnación supercrítica.....	59
3.5	Cuantificación de la impregnación del plástico.....	63
3.6	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	64
4	Resultados experimentales	66

4.1	Obtención de extracto de piretrina a partir de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> con dióxido de carbono supercrítico	67
4.2	Rendimiento de impregnación con un extracto de piretrina.....	68
4.2.1	Rendimiento de impregnación con extracto de piretrina comercial por el método discontinuo.	69
4.2.1.1	Influencia del tiempo de impregnación y cantidad de piretrina a impregnar por el método discontinuo	69
4.2.1.2	Influencia de la presión y la temperatura, por el método discontinuo	70
4.2.2	Rendimiento de impregnación con extracto de piretrina comercial por el método semicontinuo.....	71
4.2.2.1	Influencia del tiempo y la cantidad en el rendimiento de impregnación por método semicontinuo.....	71
4.2.2.2	Influencia de la presión y la temperatura, por el método semicontinuo.	72
4.3	Rendimiento de impregnación con un extracto natural de piretrina.....	73
5	Discusión de los resultados	75
5.1	Extracción Supercrítica de Piretrinas	76
5.2	Impregnación Supercrítica de piretrinas.....	80
5.2.1	Impregnación de un extracto comercial de piretrinas.....	81
5.2.1.1	Impregnación del extracto comercial por el método discontinuo (BM)	82
5.2.1.2	Efecto del tiempo de impregnación utilizando y cantidad de piretrina a impregnar por el método discontinuo	82
5.2.1.3	Efecto de la presión y la temperatura	85
5.2.1.4	Impregnación del extracto comercial por el método semicontinuo (SM).....	92
5.2.1.5	Efecto del tiempo de impregnación y la cantidad inicial de extracto añadida utilizando el método semicontinuo.....	93
5.2.1.6	Efecto de la presión y la temperatura por el método semicontinuo	95
5.2.2	Impregnación con un extracto natural de piretrina.....	102
5.3	Perspectivas futuras	105
6	Conclusiones.....	107

6.1	Con respecto a los resultados de extracción	108
6.2	Con respecto a los resultados de impregnación con un extracto comercial de piretrinas	109
6.3	Con respecto a los resultados de impregnación con un extracto obtenido mediante extracción supercrítica.....	111
7	Bibliografía.....	112

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los plaguicidas	8
Tabla 2 Propiedades críticas de diferentes compuestos.....	26
Tabla 3 Comparación de los diferentes métodos de extracción aplicados para el análisis del contenido de piretrina en las flores secas	35
Tabla 4 Condiciones de extracción para la extracción de piretrina a partir de flores secas utilizando CO ₂ supercrítico.	36
Tabla 5 Solubilidad en CO ₂ de algunos polímeros	43
Tabla 6 Procesos de impregnación con CO ₂ supercrítico para la obtención de matrices poliméricas con propiedades bioactivas	44
Tabla 7 Condiciones para la impregnación supercrítica de los polímeros seleccionados con timol.....	47
Tabla 8 Disolventes y reactivos utilizados en el presente trabajo	53
Tabla 9 Variables analizadas y condiciones en los procesos discontinuo y semicontinuo	61
Tabla 10 Impregnación con extracto natural, por el proceso discontinuo.....	62
Tabla 11 Rendimiento de extracción con CO ₂ en condiciones supercríticas.....	68
Tabla 12 Recta de calibrado de piretrina	69
Tabla 13 Influencia del tiempo en el proceso de impregnación, por el método discontinuo ..	70
Tabla 14 Influencia de la presión, la temperatura y la cantidad de piretrina utilizada, por el método discontinuo, en función del extracto comercial (BM)	71
Tabla 15 Influencia del tiempo en el proceso de impregnación, por el método semicontinuo	72
Tabla 16 Influencia de la presión, la temperatura y la cantidad de piretrina utilizada, por el método semicontinuo.....	73

Tabla 17 Rendimiento de impregnación con un extracto natural de piretrina.....	74
Tabla 18 Análisis de varianza del proceso de extracción de piretrinas.	79
Tabla 19 Tabla ANOVA para dos cantidades diferentes de piretrina, por el proceso de impregnación BM.....	85
Tabla 20 Tabla ANOVA del proceso de impregnación BM de piretrina en películas de PP..	90
Tabla 21 Intervalos de confianza (95%) para los coeficientes del modelo	95
Tabla 22 Tabla ANOVA del proceso de impregnación SM de piretrina en películas de PP ..	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química de las piretrinas I y II, cinerina I y II, y jasmolina I y II.....	12
Figura 2 Población total en el mundo.....	15
Figura 3 Estructura molecular del polipropileno isotáctico	19
Figura 4 Diagrama de fases de una sustancia pura.....	26
Figura 5 Codisolventes más utilizados en ESC.....	30
Figura 6 Curvas de extracción de hojas de Artemisia annua en diversas condiciones experimentales.....	33
Figura 7 Esquema de las fases del proceso de impregnación supercrítica.....	39
Figura 8 Flores de Chrysanthemum	52
Figura 9 Equipos de impregnación y de extracción	54
Figura 10 Sistema de control automatizado de las plantas de impregnación y extracción	57
Figura 11 Diagrama de flujo para el proceso de impregnación en ambos modos de operación discontinuo y continua.....	59
Figura 12 Plástico en soporte de acero	61
Figura 13 Microscopio Quanta 200.....	65
Figura 14 Imágenes SEM utilizando el software de análisis Scion.....	65
Figura 15 Rendimientos de extracción a dos condiciones de presión a igual temperatura	76
Figura 16 Diagrama de Pareto para el rendimiento de extracción teniendo en cuenta el efecto de la presión (10 y 40 MPa) y el de las variedades (valor cualitativo).....	78
Figura 17 Diagrama de superficie respuesta para el proceso de extracción de piretrinas.....	78
Figura 18 Estudio de la carga de impregnación de piretrina por BM a diferentes tiempos de proceso.....	83
Figura 19 Estudio de la carga de impregnación de piretrina por BM a dos temperaturas y diferentes presiones de proceso	86

Figura 20	Diagrama de Pareto del proceso de impregnación por el método discontinuo.....	89
Figura 21	Gráfico de superficie de respuesta estimada del proceso de impregnación de BM	91
Figura 22	Imagen SEM de película de PP antes y después del proceso de impregnación.....	92
Figura 23	Estudio de la carga de impregnación de piretrina por SM a diferentes tiempos de proceso.....	93
Figura 24	Estudio de la carga de impregnación de piretrina por SM a dos temperaturas y diferentes presiones	96
Figura 25	Diagrama de Pareto del proceso de impregnación BM.	99
Figura 26	Gráfico de superficie de respuesta estimada.....	100
Figura 27	Estudio de la carga de impregnación del extracto natural y del comercial de piretrina por BM.....	103

1 Introducción



Los agricultores necesitan acceso a una amplia gama de soluciones para proteger sus cultivos, ya sea para el control de plagas, malezas o enfermedades. Los plaguicidas son, en muchos casos, la única opción para reducir eficazmente una plaga o enfermedad determinada. El control de plagas con productos de baja persistencia, a menudo requiere aplicaciones periódicas de pesticidas, necesarias para prolongar la efectividad. Una estrategia adecuada para el manejo de cultivos incluye la optimización de las tasas de aplicación de estos plaguicidas, las herramientas disponibles para su uso, y el destino ambiental de estos.

Casi el 90% de los productos químicos aplicados por métodos convencionales, se pierden en el aire y como escorrentía del suelo donde se aplica, afectando tanto al medio ambiente como a los costes de aplicación [1]. Desde el punto de vista de la eficiencia, numerosos estudios han confirmado que gran parte de los productos químicos utilizados se desperdician en su mayoría debido a la lixiviación, mineralización, bioconversión, evaporación y degradación (fotolítica, hidrolítica y microbiana), impidiendo que el compuesto activo pueda realizar su función [2], lo que tiene como resultado consecuencias financieras y severos daños ambientales, que en muchos casos han sido irreversibles o difícilmente reversibles [3,4]. Adicionalmente, un uso mal planificado de plaguicidas a menudo conduce a la resistencia a plagas o enfermedades, alteración de la química del suelo con fijación deficiente de nitrógeno, daños a la biodiversidad del mismo e incrementos en la tasa de bioacumulación [5]. Por todo esto, se hace necesario desarrollar enfoques alternativos para minimizar los efectos adversos asociados al control de plagas en los cultivos.

Los métodos de liberación controlada aparecen como uno de los conceptos más exitosos que han surgido recientemente como un remedio dirigido a plagas. Dichos métodos consisten en

plaguicidas encapsulados / atrapados / impregnados en un portador para permitir un manejo más seguro de los agroquímicos [6]. Se han propuesto o desarrollado varias metodologías para encapsular plaguicidas, y los vehículos considerados incluyen polímeros, ya sean sintéticos o naturales [7], sílice [8], polifosfatos [9], ceras [10], arcilla / organoarcilla [11], emulsiones [12], nanometales artificiales [13], hidrogeles [14], cápsulas y residuos agrícolas, etc. Todos estos vehículos permiten la entrega de niveles óptimos de concentración de los agroquímicos durante períodos de tiempo más largos, lo que a su vez reduce la cantidad del compuesto activo requerido por unidad de terreno.

El polipropileno (PP) es el segundo polímero sintético más producido en el mundo y se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones como pueden ser: las instalaciones hospitalarias y los textiles, el envasado de alimentos o la agricultura, siendo en este último caso de especial interés su uso en instalaciones de invernadero [15,16]. Muchas de estas aplicaciones requieren que el polímero exhiba propiedades biocidas, por ello numerosos estudios actuales se centran en la funcionalización del PP para incorporar compuestos activos que mejoren sus propiedades [17]. Sin embargo, las propiedades químicamente inertes del polipropileno presentan algunas dificultades con respecto a su unión química con ciertos grupos de compuestos biocidas. Por esta razón, el PP a menudo recibe un pretratamiento para aumentar su tensión superficial o para generar grupos reactivos en la superficie para una modificación física o química posterior. Tales pretratamientos aumentan la complejidad del procedimiento de modificación general y requiere del uso de productos químicos agresivos [18].

Con el objetivo de adicionar propiedades activas a las películas de PP, aparecen descritos en la bibliografía diferentes procedimientos para incorporar productos bioactivos en pequeñas

cantidades mediante diferentes reacciones químicas. En los últimos años es posible encontrar diversas publicaciones sobre la impregnación con solvente supercrítico (SSI) [19–23]. La impregnación con solvente supercrítico se está aplicando como una alternativa interesante a otros procesos que se han utilizado tradicionalmente para depositar compuestos bioactivos específicos en un polímero con el fin de transformarlo en un dispositivo liberador de agentes bioactivos [22,23]. El impulso de la investigación sobre SSI viene, fundamentalmente, encaminado al desarrollo de procesos basados en la utilización del dióxido de carbono supercrítico, lo que se debe a sus excelentes propiedades: es un gas en condiciones ambientales, es abundante y barato, no es tóxico ni inflamable, no es corrosivo y no presenta riesgos de tipo medioambiental.

Teniendo en cuenta que el extracto de piretrinas se utiliza ampliamente como insecticida natural contra insectos y que una de sus ventajas más notables es su baja toxicidad en mamíferos, parece razonable la obtención de polímeros de PP cargados con dicho extracto para el control de plagas en invernaderos. Estas razones conforman la hipótesis de partida del presente trabajo de tesis doctoral que consiste en considerar que la impregnación con fluidos supercríticos es una técnica viable para obtener polímeros de PP con propiedades bioacidas.

El presente trabajo, realizado dentro del grupo de investigación “Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos”, del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Cádiz, tiene como objetivo general, estudiar la viabilidad de un proceso de impregnación de PP con dióxido de carbono supercrítico, utilizando piretrinas como extracto natural. Este objetivo global se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el proceso de obtención de extractos naturales a partir de *Chrysanthemum* utilizando CO₂ supercrítico.
2. Impregnar extracto comercial de piretrina en PP y analizar el efecto del tiempo de operación, la presión, la temperatura y la cantidad de extracto en el rendimiento del proceso de impregnación.
3. Analizar la influencia del modo de operación (discontinuo y semicontinuo) en el proceso de impregnación de un extracto comercial de piretrina en PP con CO₂ supercrítico.
4. Comparar el proceso de impregnación de PP con el extracto de piretrina comercial y el obtenido mediante extracción con CO₂ supercrítico.

2 Antecedentes bibliográficos

2.1 Los plaguicidas

La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO por sus siglas en inglés) define a los plaguicidas como “cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El concepto «plaguicidas» abarca sustancias que tienden a la reducción, erradicación y prevención de organismos considerados nocivos, e incluye biocidas y productos fitosanitarios [24]. El término excluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos veterinarios [25].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación de los plaguicidas basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del mismo de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (Tabla 1). La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, entre otros. Al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores

no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto [26]. Además del grado de peligrosidad, los plaguicidas se pueden clasificar atendiendo a una gran cantidad de criterios que se resumen también en la Tabla 1.

Tabla 1*Clasificación de los plaguicidas*

Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad [26]				
Clase	Toxicidad	LD ₅₀ en rata (mg/kg peso corporal)		Ejemplos
		Oral	Dérmico	
Clase IA	Extremadamente peligrosos	< 5	< 50	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	5–50	50–200	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	50–2000	200–2000	Diclorodifeniltricloroetano (DDT), clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	> 2000	> 2000	Malatión
U	Poco probable que presente un peligro agudo	> 5000		

Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad [27]		
Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	(DDT), aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

 Clasificación de los plaguicidas según la plaga que controlan [27]

Tipo de pesticida	Plaga que controla
Insecticidas	Insectos
Algacidas	Algas
Acaricidas	Ácaros
Avicidas	Pájaros
Fungicidas	Hongos
Nematocidas, desinfectantes y fumigantes en general	Nemátodos
Herbicidas	Malas hierbas
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Raticida	Ratas

 Clasificación de los plaguicidas según el modo de acción [28]

de contacto
 residuales
 esterilizantes
 sistémicos
 residuales
 de inhalación
 digestivos
 de acción protectora
 de acción repelente
 de acción erradicante

 Clasificación de los plaguicidas según el fin perseguido [28]

selectivos
 no selectivos

 Clasificación de los plaguicidas según la familia química [29]

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromofos, diclorvos*, malatión
Carbamatos	Carbarilo, metomilo, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato, permetrín
Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	4,6-dinitro-o-cresol (DNOC), dinoterbo, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametrina, desmetrina, simazina
Compuestos orgánicos del estaño	Cihexatina, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, OBPA, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

* 2,2-diclorovinil-dimetil fosfato

De acuerdo a la clasificación por familia química, en la literatura se encuentra una amplia información de los plaguicidas en relación a las plagas que controlan, su modo de acción y efectividad. En su caso, los plaguicidas clorados son moléculas orgánicas que incluyen cloro en su estructura química, suelen actuar por contacto e ingestión. Su uso está restringido y en algunos casos prohibido, ya que presentan problemas sobre el hombre y el medio ambiente por su elevada persistencia y capacidad de bioacumulación [27].

Los plaguicidas fosforados son, en general, insecticidas de contacto, aunque pueden actuar por inhalación o ingestión. Incluyen al menos un átomo de fósforo en su molécula. Son más inestables que los organoclorados y de persistencia limitada.

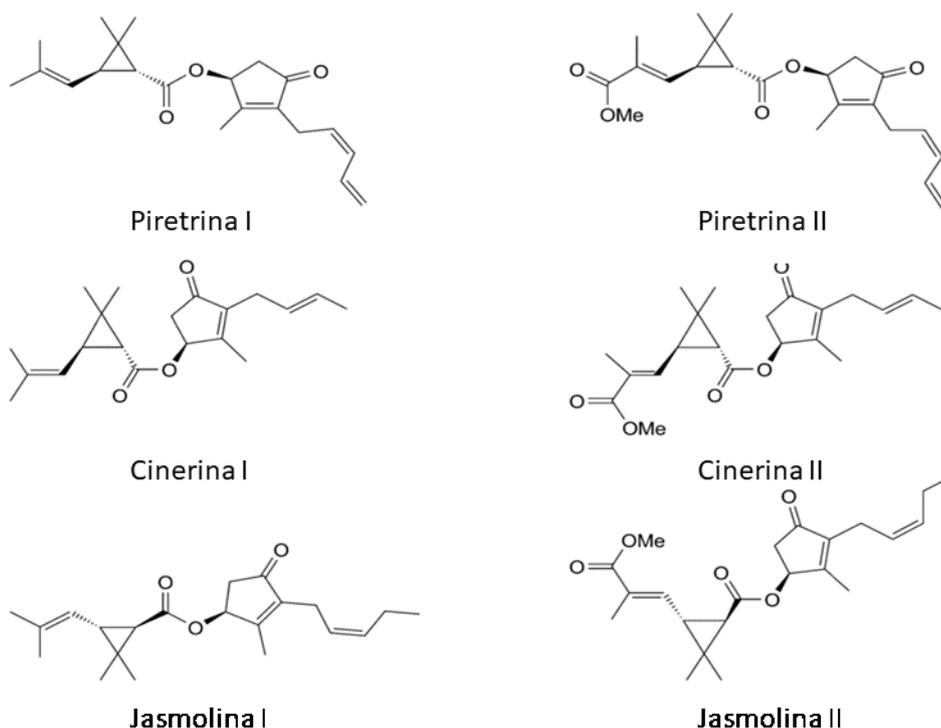
Los carbamatos presentan átomos de nitrógeno en su estructura química, que llevan a cabo la acción tóxica sobre el sistema nervioso de los insectos. Se emplean frente a gran cantidad de plagas.

Los plaguicidas naturales y piretroides actúan rápidamente sobre el sistema nervioso de los insectos, al tiempo que resultan poco tóxicos para el hombre y los animales de sangre caliente. Sin embargo, son muy tóxicos para los peces. Presentan una persistencia baja y se degradan con facilidad por la acción de agentes medioambientales [30].

El trabajo de investigación desarrollado en la presente Tesis Doctoral se centrará en la familia de las piretrinas por su relativa baja toxicidad.

2.1.1 Las piretrinas

El piretro, es un insecticida natural derivado de las flores de *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae) también conocido como *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Los seis compuestos activos del piretro se llaman piretrinas, a saber: piretrina I, piretrina II, jasmolina I, jasmolina II, cinerina I y cinerina II (Fig. 1). Estos compuestos son ésteres de dos ácidos carboxílicos (ácido crisantémico, para la serie I, y ácido pirétrico, para la serie II). Las proporciones de los constituyentes del piretro es variable, aunque el contenido medio es de un 73% de piretrina I y II, 19% de cinerina I y II y 8% de jasmolina I y II [31]. La piretrina I tiene una mayor actividad letal y la piretrina II tiene un efecto de eliminación más rápido [31], siendo insecticidas seguros para el medio ambiente.

**Figura 1**

Estructura química de las piretrinas I y II, cinerina I y II, y jasmolina I y II.

Las moléculas de piretrinas son neuroactivas, de baja absorción dérmica, con un metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera [32]. La acción insecticida de las piretrinas se caracteriza por un rápido efecto, particularmente en insectos voladores, y por causar hiperactividad y convulsiones en la mayoría de los insectos. El extracto de piretrinas muestra una baja toxicidad para las aves y los mamíferos, sin embargo, es tóxico para los peces y las abejas melíferas [33]. Muchos de los productos que contienen extracto de piretrinas están aprobados para su uso en la agricultura orgánica y actúan sobre más de 40 insectos en más de 200 frutas y verduras diferentes [34]. La principal desventaja del extracto de piretrinas es que es muy inestable a la luz y al aire, lo que limita su efectividad en la protección de cultivos y en otros contextos del control de insectos en los que la actividad residual del pesticida es esencial [35].

En muchas zonas de cultivos, las piretrinas se utilizan como tratamiento agrícola previo a la cosecha en cultivos forrajeros, frutas, verduras, plantas ornamentales y se aplican como polvo, sustancia emulsionada o spray [36].

Según la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo, por el que se establece un marco para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, la pulverización aérea de plaguicidas puede causar efectos negativos significativos en la salud humana y el medio ambiente, sobre todo por la difusión no intencionada a especies que no son su objetivo. Por esta razón, el uso de la fumigación aérea está prohibido de manera general, con posibles excepciones [37]. Por lo tanto, el objetivo es realizar tratamientos alternativos a la pulverización aérea, empleando plaguicidas de baja toxicidad para los mamíferos como las piretrinas, que son consideradas una herramienta eficaz para el manejo de plagas dentro del marco de la agricultura sin residuos.

2.1.2 Uso de plaguicidas para el control de plagas en la agricultura

La industria agrícola utiliza diferentes técnicas de protección en las plantas, como la rotación de cultivos, la utilización de variedades resistentes a plagas o enfermedades, y también los productos fitosanitarios, que tienen alguna de las siguientes funciones sobre los vegetales:

- protegerlos de organismos nocivos (antes o después de la cosecha)
- influir en sus procesos vitales
- mejorar su conservación y destruir o prevenir el crecimiento no deseado de vegetales o partes de los mismos

El uso de productos fitosanitarios en la producción agrícola está bastante extendido. De acuerdo con los informes de la FAO [38], en el mundo se utilizan más de 1000 plaguicidas diferentes. Sin embargo, debido a que son intrínsecamente tóxicos, como se ha mencionado anteriormente, su producción, distribución y utilización debe regirse por un control y una reglamentación estricta. Además, es necesario hacer un seguimiento regular de sus residuos en los alimentos. La OMS tiene dos objetivos en relación con estos productos:

- hacer que se prohíban los plaguicidas más tóxicos para el ser humano y los que permanecen durante más tiempo en el medio ambiente;
- proteger la salud pública mediante el establecimiento de límites máximos de residuos de los plaguicidas en los alimentos y el agua.

Según la Comisión Europea, las sustancias activas que contienen los productos fitosanitarios pueden ser extractos de plantas o microorganismos o compuestos sintetizados químicamente, siendo esenciales para la producción de alimentos. Incluso en la agricultura ecológica se permite una gama limitada de ellos.

Estas sustancias activas son los ingredientes de un producto fitosanitario responsables de su función, y los residuos son las sustancias que pueden quedar en los alimentos tras el empleo del producto fitosanitario sobre los cultivos y, por lo tanto, incorporarse a la cadena alimentaria.

Con el fin de garantizar que la utilización de estas sustancias es segura para los consumidores se establecen los límites máximos de residuos [39]. El límite máximo de residuos (LMR) es el nivel máximo de residuos de un plaguicida que se permite legalmente en los alimentos o piensos

(tanto en el interior como en la superficie) cuando los plaguicidas se aplican correctamente conforme a las buenas prácticas agrícolas. Los LMR fijados para todos los cultivos y plaguicidas se hacen públicos en el sitio web del Codex [40].

La producción total de alimentos a nivel mundial, como el arroz, trigo, cebada, patatas y maíz ponen de manifiesto la importancia de la protección de la cosecha con el fin de garantizar la demanda de alimentación por parte de la población [41]. Así, en un estudio sobre el crecimiento de la población, agricultura, producción y suministro de alimentos la Organización de las Naciones Unidas (ONU) estima que los 7.700 millones de seres humanos que habitan el planeta en la actualidad crecerán hasta los 9.700 millones en 2050 para, finalmente, alcanzar un punto máximo a finales del presente siglo, con un total de 11.000 millones de personas (Fig. 2). El mayor crecimiento poblacional se localizará en los países en vías de desarrollo y para el año 2100 sólo el 13% de la población mundial vivirá en los países considerados como prósperos.

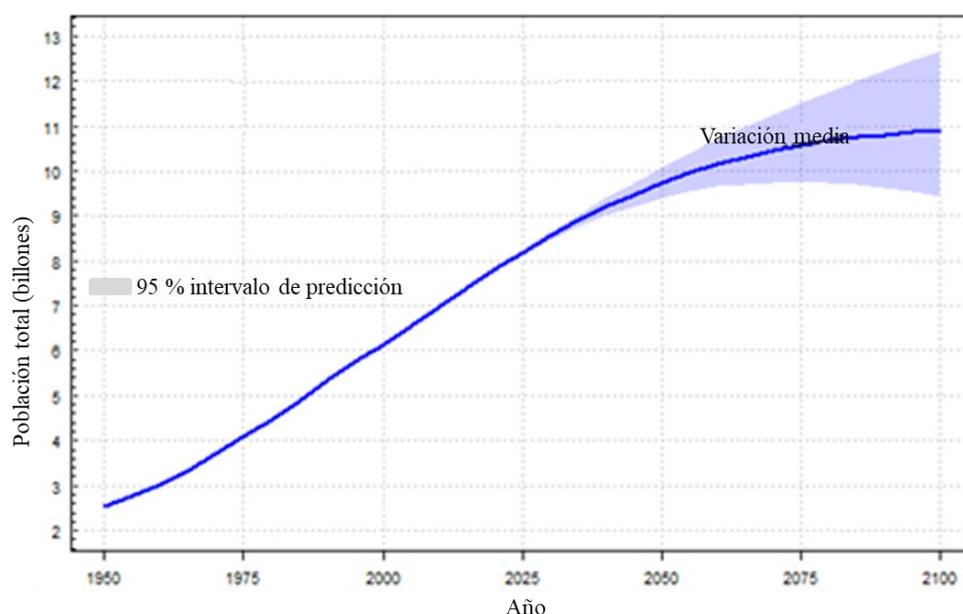


Figura 2

Población total en el mundo

Fuente: [40]

Esto supone que un gran desarrollo de la población va a requerir de enormes esfuerzos para conseguir “alimentos para todos”; y, por otra parte, cuando la referencia es en el nivel de países industrializados, o concretamente, en el nivel europeo, el problema radica en la superproducción de alimentos (con un enorme coste comunitario del mantenimiento de productos reservados en almacenes) que, en consecuencia, conduce a una menor producción [42,43].

El resultado de todo esto, es la necesidad de abordar la producción agraria desde supuestos más respetuosos con el medio ambiente y que permitan garantizar la seguridad alimentaria. En diversas reuniones en pro de la lucha para “Conseguir alimentos para todos”, la FAO se muestra especialmente preocupada por la seguridad alimentaria, el desenfrenado crecimiento de la población y la falta de alimentos.

En la Comunidad Económica Europea ha habido una constante preocupación por garantizar la salud de las personas, los animales y el medio ambiente. Esta preocupación se manifiesta en diferentes campos, entre ellos la regulación de los biocidas a través de la normativa comunitaria que se inició con la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, en 1998 que fue transpuesta al sistema español a través del Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre [44].

En 2009 se adoptó un paquete de medidas sobre los plaguicidas compuesto por la Directiva 2009/128/CE sobre el uso sostenible de los plaguicidas, orientada a reducir los riesgos ambientales y sanitarios y a mantener la productividad de los cultivos y mejorar el control del uso y distribución de plaguicidas; el Reglamento (CE) n.º 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y el Reglamento (CE) n.º 1185/2009 relativo a las

estadísticas de plaguicidas, que dispone normas para la recopilación de información sobre las cantidades anuales de plaguicidas comercializadas y utilizadas en cada Estado miembro. Esta normativa busca establecer los requisitos para el registro, autorización y comercialización de los biocidas.

2.2 Los plásticos en el sector agroalimentario

Los plásticos forman una extensa familia de materiales, con una gran variedad de tipos y formas, incluyendo plásticos termoestables, que una vez calentados y moldeados, no se pueden volver a fundir y cambiar de forma (como la silicona y el poliuretano) y termoplásticos que se pueden recalentar, moldear y enfriar varias veces (como el polietileno y el PP) [45].

Los polímeros termoplásticos están compuestos por cadenas de polímeros individuales y tienen una gran aplicación en la industria agroalimentaria debido a su menor coste y fácil capacidad de procesamiento. Los polímeros termoestables, llamados también termoendurecibles, se reticulan y crean un enlace químico entre dos cadenas poliméricas separadas. Estos polímeros son generalmente más fuertes que los polímeros termoplásticos después del procesamiento, pero una vez que han sufrido el proceso de calentamiento-fusión y formación-solidificación, se convierten en materiales rígidos que no vuelven a fundirse y, por tanto, no se pueden reutilizar en nuevos procesos. Este tipo de plásticos son utilizados cuando es necesario una alta resistencia al calor [46].

Entre las principales propiedades de los plásticos, destaca el amplio rango de temperatura de trabajo y la resistencia tanto a los productos químicos como a la luz. Estas propiedades, junto con su bajo coste, han impulsado la demanda de estos materiales. Según el informe anual de “Plastics Europe” en 2018 la producción de plásticos en el mundo alcanzó casi los 360 millones de toneladas, de los cuales, 62 millones de toneladas corresponden a la producción europea, predominando el uso de los termoplásticos y los poliuretanos. Su uso en la agricultura corresponde a un 3,4 %. Entre los plásticos más demandadas están el polipropileno (19,3%) y el polietileno (17,5%) [47].

El uso de los plásticos en la agricultura va desde su utilización en las redes de riego, tales como filtros, tuberías y goteros, hasta el uso de mallas de sombrío y cortavientos, mosquiteras, hilos de rafia, envases y embalajes, plásticos para ensilado de forrajes. También se utilizan los plásticos para la protección de cultivos (invernaderos, túneles y acolchados). Esta protección mejora los rendimientos agrícolas y las propiedades nutricionales, limita la infestación de insectos, la exposición a la radiación solar y los eventos meteorológicos como granizo y tormentas [48,49].

Una gran parte de los plásticos empleados en los invernaderos están compuestos de polietileno (PE) o de una mezcla de polietileno y polipropileno, que, una vez acabada su vida útil, pueden ser valorizados energéticamente. Por su parte, el PP es uno de los polímeros con mayor aplicación por sus propiedades y su bajo coste. Se forma mediante polimerización por adición del monómero de propileno.

El PP es un polímero de hidrocarburo lineal que tiene muchas similitudes en sus propiedades con el PE, particularmente en su resistencia química a los disolventes y en sus propiedades eléctricas. El PP tiene un menor porcentaje de cristalinidad que el polietileno, pero cuenta con una mejor resistencia y rigidez [46] lo que le confiere unas características especiales para uso en la industria agroalimentaria. La presencia de un grupo metilo unido a átomos de carbono alternos en la cadena principal (Fig. 3), le confiere algunas propiedades especiales, siendo la más relevante la introducción de un centro estérico. Los diferentes estereoisómeros de PP son el polipropileno isotáctico (i-PP), polipropileno sindiotáctico (s-PP) y polipropileno atáctico (a-PP). En el caso de del i-PP, todos los grupos metilo están ubicados en el mismo lado de la cadena principal del polímero, en s-PP en lados alternos, mientras que en el caso de a-PP los grupos metilo están dispuestos al azar a lo largo de la cadena del polímero. Los tres estereoisómeros tienen relevancia técnica, pero el más relevante es el i-PP en el que el endurecimiento de la cadena y la estructura cristalina helicoidal provoca un aumento del punto de fusión en comparación con el PE [50].

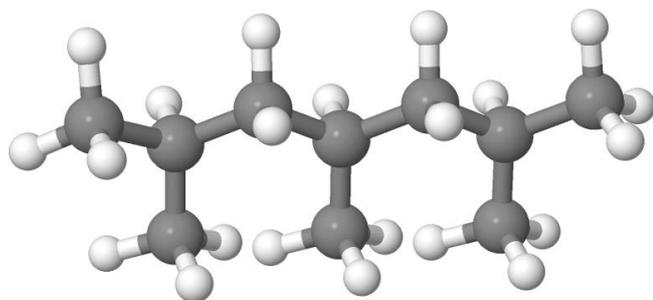


Figura 3

Estructura molecular del polipropileno isotáctico

Se puede hacer una clasificación aproximada de los productos de PP de la siguiente manera [50]:

- Homopolímeros de PP: formados por cadenas poliméricas que poseen igual composición química (formadas únicamente por moléculas de propileno).
- Copolímeros y terpolímeros (con etileno y α -olefinas): La cadena polimérica tiene diferente composición química. La misma está compuesta por tramos de polipropileno unidos por moléculas de etileno que se ubican aleatoriamente a lo largo de la cadena. Debido a esto, se tiene una reducción del dominio cristalino del material lo que causa una elevada transparencia y un menor punto de fusión.
- Copolímeros de impacto con multicapa: la producción de estos materiales se realiza a través de una cascada de dos reactores verticales en serie. Obteniéndose un material con una elevada tenacidad a muy bajas temperaturas.

Las propiedades de los plásticos pueden modificarse para liberar pesticidas lentamente, siendo una forma eficaz de manejo integrado de plagas porque el flujo constante de plaguicidas limita su uso y reduce los desechos y la toxicidad del suelo al medio ambiente, favoreciendo una agricultura orgánica menos contaminante [51]. Existen un gran número de publicaciones sobre liberación controlada de plaguicidas basadas en polímeros:

Cao y col. [52], analizaron la liberación controlada (CRF) del insecticida acetamiprid sobre un polímero preparado de tapioca, urea y borato de sodio. Este insecticida se aplica ampliamente en China, utilizándose como concentrados emulsionables (CE) y polvos humectables. Esta investigación comprende un plaguicida que es sensible a los álcalis o sensible a altas temperaturas encapsulado en una matriz polimérica de almidón-borato-urea, y proporciona un método para ajustar la tasa de liberación de plaguicidas y el período de liberación. Para determinar el efecto de las variaciones de temperatura y la estabilidad frente a la radiación UV,

almacenaron acetamiprid sobre el plástico y acetamiprid en emulsiones a 40, 50, 60 ° C durante un período de 60 días, y los resultados de los cambios de ingrediente activo se determinaron mediante HPLC. La tasa de descomposición de acetamiprid en emulsiones fue diez veces mayor que la de acetamiprid sobre plásticos, esta última no tuvo más del 3% de tasa de descomposición bajo la prueba de radiación UV [52].

Singh y col. [53], desarrollaron un sistema de suministro de agroquímicos a base de almidón y poli (ácido metacrílico) para la liberación controlada del tiram, un fungicida con una amplia gama de usos pero que debido a sus efectos tóxicos, existe preocupación no solo en la población en general por la exposición dietética a los residuos que quedan en los cultivos alimentarios, sino también por los posibles riesgos para la salud ocupacional de los trabajadores que manipulan y a menudo entran en contacto con este químico. Para el estudio de la liberación in vitro del fungicida, colocaron la muestra seca en un volumen definido de medio de liberación (10 ml de agua) a temperatura ambiente (23 ± 1 ° C). La liberación de productos químicos atrapados en hidrogeles se produce solo después de que el agua penetra en la red para hinchar el polímero y disolver los productos químicos. La cantidad de tiram liberado se midió espectrofotométricamente como una solución de cloroformo amarillo después de 6 h a 421 nm. En su investigación concluyen que la liberación de tiram de los hidrogeles aumenta con el tiempo de manera muy controlada y sostenida [53].

Singh y col. [54] en otra de sus investigaciones, emplearon el polvo de hoja de neem "(NLP)", un bioplaguicida, y perlas de alginato utilizando CaCl_2 como reticulante. Para estudiar el efecto de la composición de las perlas sobre la dinámica de liberación del fungicida (tiram), prepararon perlas de plástico variando la cantidad de NLP y reticulante. La cantidad de tiram liberado se

midió espectrofotométricamente después de cada 12 hasta 204 h y la liberación se midió después de 300 h. Evaluaron las características de formulación tales como la eficacia de atrapamiento, el tamaño de las perlas, el porcentaje de hinchamiento en equilibrio de las perlas y el mecanismo de difusión para la liberación de tiram [54].

Grillo y col. [55] tuvieron como objetivo desarrollar un sistema de liberación modificada para el herbicida ametrina encapsulando en micropartículas de polímero biodegradable utilizando los polímeros poli (hidroxibutirato) (PHB) o poli (hidroxibutirato-valerato) (PHBV), con el fin de mejorar la acción herbicida y reducir la toxicidad ambiental. El perfil de liberación de ametrina se modificó cuando se encapsuló en las micropartículas, consiguiéndose una liberación más lenta y sostenida en comparación con el perfil de liberación de la ametrina pura. Para analizar las características de liberación emplearon el modelo matemático descrito por Peppas, que se basa en una ecuación semi-empírica en la que se emplea con frecuencia en ausencia de información sobre el mecanismo de liberación de un sistema [55].

Lewicka y col. [56] tuvieron como objetivo desarrollar y preparar nuevas formulaciones de polímeros / herbicidas para su posible aplicación en sistemas de liberación controlada, para ello utilizaron polímeros biodegradables seleccionados, incluidos L-lactida / glicólido / PEG / terpolímero (PLAGA-PEG-PLAGA), así como polímeros a base de oligosacáridos y su mezcla con terpolímero, para preparar microesferas cargadas con dos herbicidas aplicados al suelo. El proceso de degradación de las microesferas poliméricas obtenidas se evaluó con base a su pérdida de peso y erosión superficial, así como la tasa de liberación de metazaclor y pendimetalina cargados. Encontraron que la tasa de degradación gradual de las micropartículas

se prolongó durante toda la temporada de cultivo, lo cual es crucial en términos de protección agroquímica y ambiental [56].

Dubey y col. [57], en su revisión bibliográfica describen las ventajas que tienen los CRFS, como ahorro de mano de obra, seguridad para los trabajadores, menor dosis, menor aplicación y menor impacto ambiental y resume cómo los CRF basados en agroquímicos son altamente eficientes para mantener la liberación de pesticidas de manera gradual para el control de plagas [57].

Tal como lo han indicado investigadores del Instituto de Formulación de Pesticidas (India) [57], la liberación controlada tiene varias ventajas, resumiéndolas de la siguiente manera:

1. Prolongación de la actividad al proporcionar una cantidad continuamente baja de pesticida.
2. Número reducido de aplicaciones, pero logrando un largo período de duración de la actividad a través de una sola aplicación.
3. Reducción de costos mediante el tiempo de eliminación y el costo de la aplicación repetida y excesiva.
4. Reducción de la contaminación ambiental al eliminar la necesidad de una distribución generalizada de una gran cantidad de plaguicidas que se ven afectados por acciones climatológicas, evitando que se evapore, se degrade, o se produzca lixiviación a través del suelo o por las vías de agua, debido a las lluvias.
5. Prolongación de la duración de la actividad de un plaguicida menos persistente, que es inestable en un medio acuático.

6. La liberación controlada convierte al plaguicida líquido en una formulación sólida, lo que da como resultado un material de fácil transporte con reducción de la inflamabilidad.
7. Reducción fitotoxicidad en mamíferos al disminuir la movilidad de los plaguicidas en el suelo y, por tanto, reducir sus residuos en la cadena alimentaria. El alto costo involucrado en la fabricación de estas formulaciones, la cantidad excesiva de polímero utilizado y el herbicida polimérico es el destino de la matriz polimérica.

En los invernaderos, los plásticos proporcionan una protección a prueba de insectos, que ayuda a reducir la frecuencia de aplicaciones de plaguicidas [56]. Por otro lado, las películas de plásticos también se pueden usar como material de acolchado en los cultivos. Se sabe que las películas de plástico son adecuadas porque suprimen las malezas, facilitan la fertirrigación y el riego por goteo, la regulación de la temperatura del suelo y la humedad inversa [51]. Así, al conferirle propiedades especiales a los plásticos tanto para su uso en los invernaderos como para acolchado, con la incorporación de compuestos activos que son liberados lentamente, se reduciría el uso de plaguicidas hasta la cosecha de los cultivos teniendo un impacto directo sobre la contaminación ambiental y la salud de las personas.

2.3 Fluidos supercríticos

A finales del siglo XX el uso comercial de la tecnología de los fluidos supercríticos (FSC) se incrementó, principalmente, por aspectos ambientales, dada la capacidad de algunos de estos fluidos para reemplazar disolventes tóxicos que se emplean en la industria. Desde entonces, se han utilizado en varias aplicaciones (a escala de laboratorio o industriales) asociadas con el

desarrollo de la química y la ingeniería sostenibles [58]. Las ventajas de utilizar la tecnología FSCs comprenden su alta adaptabilidad para proporcionar métodos de procesamiento y la posibilidad de realizar procesos a diferentes condiciones de operación, consiguiendo una selectividad, que de otra manera serían difíciles de conseguir con métodos tradicionales [59].

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico, en el que dejan de existir las fases líquida y gaseosa para dar lugar a una región distinta (Fig. 4). El punto crítico se caracteriza por una temperatura, denominada temperatura crítica (T_c) y por una presión, denominada presión crítica (P_c). Esta definición no se refiere a un determinado fluido; todos los fluidos tienen un punto crítico. Para el CO_2 , el punto crítico se caracteriza por $T_c = 304 \text{ }^\circ\text{K}$ y $P_c = 73,8 \text{ bar}$ [60].

Los fluidos supercríticos tienen densidades similares a la de un líquido, pero la difusividad y la viscosidad permanecen entre valores similares a la de los gases. Además, los FSC presentan una tensión superficial casi nula. Dichas propiedades les otorga un elevado poder de penetración dentro de la matriz del soluto [61]. Así mismo, debido a esas excelentes propiedades de transporte, los FSC se han introducido en diferentes campos para aplicaciones tan diversas, como extracciones [62], cromatografía [63], generación de partículas e impregnaciones [64].

Pequeñas variaciones de presión y temperatura, próximas al punto crítico, permiten modificar las propiedades de los FSC y, por tanto, su selectividad y capacidad para disolver sustancias [65]. Hay dos efectos de la temperatura sobre la solubilidad: cuando la temperatura aumenta a presión constante, la densidad del solvente disminuye. De lo contrario, al aumentar la temperatura a densidad constante, aumenta la presión de vapor del soluto. Según las propiedades del sistema, cualquier cambio que sea el dominante controla el cambio en la

solubilidad. Por otro lado, el efecto de presión es más explícito. El aumento de la presión de SCF contribuye a mayores densidades de fluido. En consecuencia, esto significa una mayor solubilidad del soluto [66].

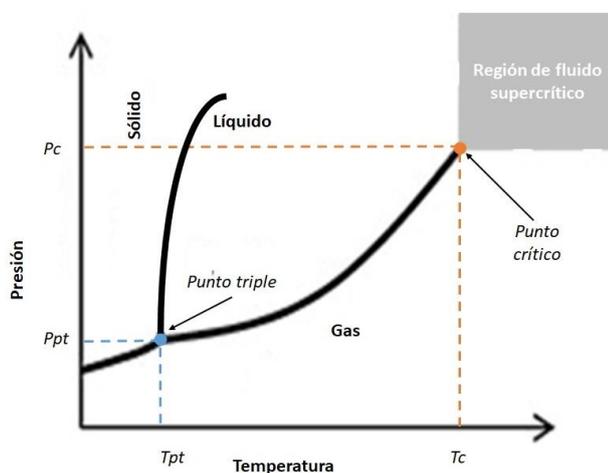


Figura 4

Diagrama de fases de una sustancia pura

Fuente: [64]

2.3.1 El CO₂ como fluido supercrítico

El campo de disolventes que pueden ser utilizados en operaciones de transferencia de masas con FSC cubre un intervalo muy amplio de temperaturas y presiones de operación y varía considerablemente en cuanto al tamaño y polaridad de los disolventes (Tabla 2).

Tabla 2

Propiedades críticas de diferentes compuestos

Compuesto	T _c (K)	P _c (MPa)
Amonio	405,7	11,3
Benceno	562,2	4,9
Dióxido de carbono	304,3	7,4
Clorotrifluorometano	384,9	3,9

Compuesto	T _c (K)	P _c (MPa)
Etano	305,6	4,9
Etileno	282,5	5,1
Metanol	513,7	7,9
n-Propano	367,0	4,3
Agua	647,6	22,1
Xenón	562,9	5,84

T_c: temperatura crítica, P_c: Presión crítica

Fuente: [60]

Uno de los principales requisitos cuando se quiere trabajar con compuestos termolábiles, como es el caso de la mayoría de los extractos naturales, es el empleo de temperaturas moderadas. Por ello el agua supercrítica no es un disolvente apropiado para la extracción e impregnación de compuestos naturales. El xenón, aunque tiene valores bajos de temperatura crítica, su coste es demasiado alto para uso comercial. Por otra parte, gases como N₂O o etano tienen valores críticos bajos, pero pueden generar mezclas explosivas y, por lo tanto, no son seguros de manipular. El trifluorometano, aunque es químicamente inerte y no inflamable, puede solubilizar diferentes tipos de productos, por lo que su uso es limitado. El dióxido de carbono, en cambio, cumple los requisitos de ser un “disolvente verde” y a ello se suman otras propiedades como que es: químicamente inerte, no inflamable, y poco tóxico, ya que su límite de valor umbral es de cerca de 5000 ppm, en comparación con la acetona (750 ppm) o el pentano (600 ppm) [60]. Su baja viscosidad y la alta difusividad permiten que sea muy utilizado tanto en procesos de extracción como de impregnación [67].

El CO₂ se considera un buen disolvente para sustancias no polares como alcanos, terpenos y grasas, razonablemente adecuado para sustancias con baja polaridad como hidrocarburos policíclicos, aromáticos, aldehídos, epóxidos, ésteres y alcoholes, pero poco recomendable para compuestos polares [68]. Al mismo tiempo, el CO₂ también es conocido por su alta capacidad

de difusión en polímeros lo que aumenta la movilidad de las cadenas del mismo, actuando como lubricante e induciendo el hinchamiento del polímero [69]. Estas propiedades hacen que sea un disolvente adecuado para procesos de impregnación siempre que la sustancia activa (el soluto) a depositar en el polímero sea soluble en el fluido supercrítico, el polímero se hinche por la solución supercrítica y el coeficiente de reparto sea lo suficientemente favorable para permitir que la matriz se cargue con suficiente soluto [70].

2.3.2 Extracción mediante fluidos supercríticos

La extracción con Fluidos Supercríticos (FSC) o extracción supercrítica (ESC) es una operación de transferencia de materia efectuada en condiciones de presión y temperatura superiores a las críticas del disolvente. Por tanto, la ESC se define como un método de extracción que emplea alta presión. Esta variable es de suma importancia tanto para aspectos técnicos como económicos.

Los FSC, como se ha mencionado anteriormente, tienen una viscosidad relativamente baja y una difusividad alta (ambas propiedades próximas a las de los gases), por lo que pueden penetrar en los materiales sólidos porosos de forma más eficaz que los disolventes líquidos y, por tanto, los FSC proporcionan un proceso de transferencia total mucho más rápido, dando por resultados extracciones más eficientes.

La propiedad más directa que puede verse afectada por las variaciones de presión es la densidad del fluido con el que se realiza la extracción. Al estudiar la influencia de la densidad del disolvente en el comportamiento de la ESC (íntimamente relacionado con el poder disolvente), es precisamente la presión la variable que ofrece márgenes de manipulación considerablemente

más amplios que la temperatura. De hecho, si bien la presión generalmente oscila entre 8 y 40 MPa aproximadamente, la temperatura se restringe muchas veces a un rango más estrecho, es decir, desde 35 hasta 60 °C. Dentro de este intervalo de presiones, y teniendo en cuenta ese rango de temperaturas, las densidades del CO₂ supercrítico pueden variar desde 200 hasta 900 kg m⁻³ [71].

El análisis bibliográfico realizado demuestra que, aunque la mayoría de los trabajos que utilizan la ESC para la extracción de compuestos activos a partir de productos naturales, se concentran en rangos de temperatura entre los 35–60 °C [64,65], la mayor cantidad de referencias publicadas centran sus investigaciones en los alrededores del valor más bajo, es decir 40 °C. Esta tendencia revela que se ha analizado el proceso a temperaturas más bajas, probablemente debido al mayor grado de variación de densidad en esta región, pero también debido a las preocupaciones con respecto a la degradación térmica de los compuestos lábiles que se extraen, las limitaciones de los equipos y la política de costes.

El efecto de la presión y la temperatura sobre la solubilidad puede describirse brevemente de esta manera [73]:

- el aumento de la presión aumenta la densidad del fluido supercrítico, aumentando así su poder disolvente
- la temperatura influye en las propiedades del disolvente (densidad), pero también en las propiedades de los solutos, principalmente en la presión de vapor. Con el aumento de la temperatura, la densidad disminuye (menor solubilidad) pero la presión de vapor aumenta (mayor solubilidad).

Por tanto, para cada matriz, la selección adecuada de las condiciones de extracción sólo se puede obtener en base a resultados experimentales, pues compiten efectos opuestos.

Una alternativa para mejorar la solubilidad de otras sustancias es la de adicionar un modificador. La razón principal para agregar un segundo solvente al CO₂ supercrítico radica en la necesidad de extraer compuestos polares [72]. Incluso a altas densidades, el CO₂ tiene una capacidad limitada para disolver compuestos de alta polaridad. La adición de modificadores o codisolventes al CO₂ puede mejorar la eficiencia de extracción al aumentar la solubilidad del soluto. El efecto predominante en la extracción dependerá del tipo de codisolvente, matriz sólida y soluto objetivo [74]. La Figura 5 muestra una estadística de los codisolventes más empleados en ESC [75].

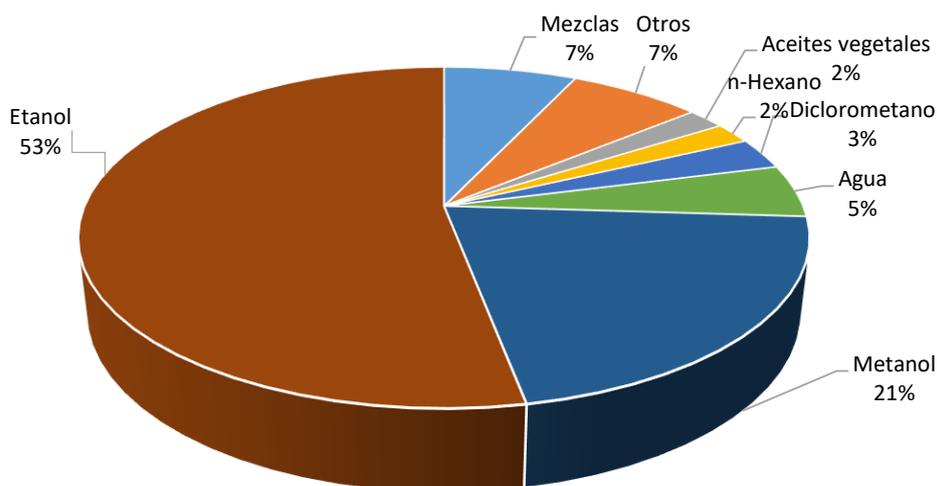


Figura 5

Codisolventes más utilizados en ESC

Fuente: adaptado de [75]

Como se muestra en la Figura 5 el uso del etanol como codisolvente es el más ampliamente reportado en las diferentes investigaciones. El etanol es un solvente inocuo tanto a nivel de

salud humana como ambiental y esta es una gran ventaja en comparación con n-hexano o incluso metanol. El metanol ocupa el segundo lugar con un 21%, y es seguido por agua y diclorometano, con el 5% y el 3%, respectivamente. A pesar de que el metanol es más polar que el etanol, este provoca riesgos en la salud humana, de hecho, se aboga por el abandonando progresivamente de su uso a día de hoy. También es posible emplear agentes de complejación al CO₂ supercrítico para mejorar la extracción de compuestos e iones fuertemente polares [76].

Mientras que la presión y temperatura afectan la termodinámica (densidad y solubilidad de los solutos) y las propiedades de transporte (viscosidad y difusividad), el caudal del solvente es una variable que influye directamente en el rendimiento de extracción. Puede incrementarse racionalmente para mejorar la velocidad de extracción provocando un efecto positivo en el rendimiento de extracción [77]. Sin embargo, en algunos casos, los caudales de solvente muy altos disminuyen el rendimiento debido a que el tiempo de contacto entre el soluto y el solvente llega a ser insuficiente.

Según Pereira y col. [71], el rendimiento global de extracción se define como la cantidad máxima de soluto que se puede extraer de un sustrato sólido específico en determinadas condiciones de temperatura y presión [71]. Las isotermas de rendimiento global proporcionan un marco para analizar los efectos de la temperatura y la presión sobre la extracción. Este análisis se puede hacer en términos del rendimiento global de la extracción en su conjunto o del rendimiento global de un compuesto específico. El rendimiento global está estrechamente relacionado con la solubilidad del soluto (o mezcla de solutos) en el fluido supercrítico (o en una mezcla de disolventes). La cinética de ESC se puede representar mediante la curva de

extracción global. Esto se determina teniendo en cuenta la masa de soluto extraído en función del tiempo de proceso o del solvente consumido, según la siguiente ecuación:

$$m \text{ total} = Q \int_0^t Y(H, t) dt \quad (1)$$

donde $m \text{ total}$ es la masa del extracto, Q es el flujo del solvente supercrítico, e $Y(h,t)$ es la relación entre la masa del soluto y la masa de disolvente en un momento dado (t) en el extractor o salida del lecho (H).

Generalmente, las curvas de extracción se caracterizan por tres períodos de tiempo: (1) un período de extracción constante (EC); (2) período de extracción descendente (ED), y (3) un período de velocidad controlada por difusión (VCD) [71]. En general, del 50 al 90% del material extraíble total se obtiene en la región de tasa de extracción constante y la optimización del proceso debe enfocarse en esta región.

En su publicación, Quispe-Condori y col. [78], representó la curva de extracción global de artemisinina, una lactona sintetizada de *Artemisia annua L.* utilizando ESC (Fig. 6). Esta curva es propia de la extracción de materias primas que contienen bajas cantidades de solutos.

En la gráfica se observan las tres regiones de extracción para la isoterma de 30 °C [78].

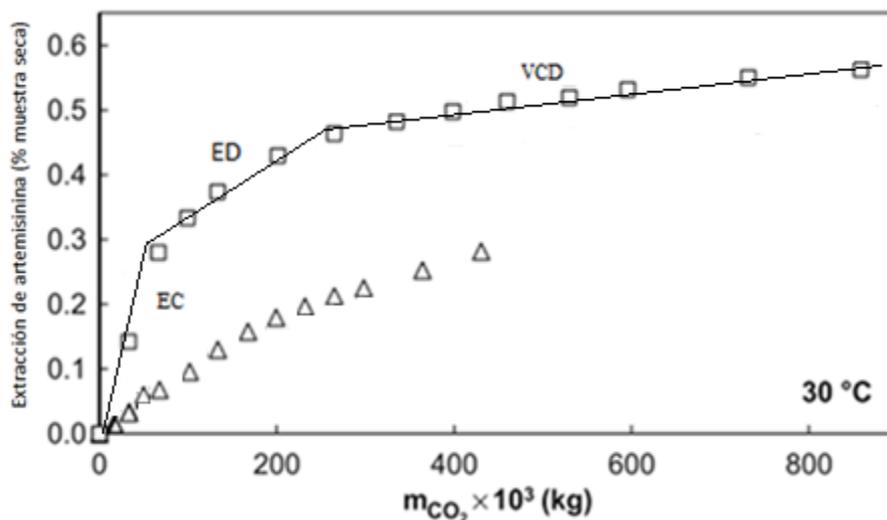


Figura 6

Curvas de extracción de hojas de Artemisia annua en diversas condiciones experimentales. (Δ 5,5 × 10⁻⁵ kg CO₂/s; □ 11,1 × 10⁻⁵ kg CO₂/s)

Fuente: [78]

Los rendimientos de extracción o la bioactividad del extracto obtenido dependen en gran medida de las condiciones de extracción utilizadas. Sin embargo, también es necesario tener en cuenta otros factores entre los cuales se pueden citar [71,79]:

- Edad del cultivo, parte de la planta y aspectos edafoclimáticos: según las prácticas de cultivo, las condiciones climáticas y la genética pueden variar considerablemente el rendimiento y la calidad del extracto. Además de las condiciones edafoclimáticas, los nutrientes en el suelo afectan el desarrollo de las plantas y por tanto la composición del extracto.
- Morfología y ubicación del soluto en la matriz: las especies vegetales se caracterizan por una gran complejidad en sus estructuras. Los solutos se pueden ubicar en la superficie de la célula; sin embargo, la mayoría de ellos se encuentran en espacios intracelulares. Para facilitar su extracción; muchas veces es indispensable un

tratamiento previo (trituration o molienda). En tales casos, la eficiencia del proceso de extracción mejora al disminuir la resistencia a la transferencia de masa debido a las estructuras celulares.

- **Tamaño de partícula, forma y porosidad del material sólido:** estos factores tienen efectos directos sobre la velocidad de transferencia de masa del proceso. Para aumentar la velocidad de extracción, la matriz sólida debe triturarse para aumentar el área de transferencia de masa. Por otro lado, deben evitarse las partículas muy pequeñas. Su uso puede compactar el lecho, aumentando la resistencia de transferencia de masa interna y causando la canalización dentro del lecho de extracción.
- **Humedad del material sólido:** en la mayoría de los casos, el agua presente en la matriz vegetal compite con el soluto para interactuar con el solvente, disminuyendo el rendimiento del proceso; por esta razón, se recomienda secar la materia prima.

2.3.3 Aplicación de la ESC a la obtención de piretrinas

La extracción de piretrinas a partir de sus flores ha sido estudiada utilizando diferentes métodos de extracción (Tabla 3). La selección del método más adecuado para una extracción rutinaria de piretrina considera muchos factores importantes, como el tiempo de extracción, la demanda energética, el equipo, la rentabilidad, la toxicidad del disolvente, la cantidad de desechos y la simplicidad, y también varía según el propósito (estudio de laboratorio, producción industrial, etc.) [80].

Tabla 3

Comparación de los diferentes métodos de extracción aplicados para el análisis del contenido de piretrina en las flores secas

Método de extracción	Condiciones de extracción	Costo / equipo	Complejidad	Referencia
Soxhlet	Isopropanol/60 min	Técnica asistida por energía; costo adicional para la gestión de residuos	Bajo	[81]
	Hexano/ n/a			[82]
	Éter de petróleo/135°C/ 80 min			[83]
	Acetonitrilo/ 8 h			[84]
Extracción asistida por ultrasonido	Hexano/30 °C/15 MPa/ 60 min	Técnica asistida por energía, requiere equipo especial moderadamente caro	Moderar	[85]
	Isopropanol/60 min			[81]
	Etanol/30 °C/150 rpm/60 min			[83]
	Acetona/50 °C/60 min			[85]
Extracción de fluidos supercríticos (*)	Acetonitrilo/30 °C/120 min	Requiere un costoso sistema de extracción, la necesidad de alta presión aumenta los costos de energía	Alto, más adecuado para escala industrial.	[81,82,86-89]
	CO ₂ / 40 a 210 min Temperaturas de 20 a 100 °C Presiones de 8 a 40 MPa			
Extracción sólido-líquido	Hexano/20 °C/0,6 - 0,9 MPa/2-3,5 h	Técnica económica, requiere un mínimo consumo de energía.	Bajo	[88]
Maceración	Hexano/20 °C/5 h/agitación	Bajo (el método más barato), costo adicional para el tratamiento de residuos	Bajo	[86]
	Éter de petróleo/40-60 °C			[90]
Percolado	Etanol/20 °C/4 días	Bajo (el método más barato), costo adicional para el tratamiento de residuos	Bajo	[88]
	Éter de petróleo/20 °C/1 día			[89]
Agitación con calor	Acetonitrilo/20 °C/5 h	Técnica asistida por energía	Bajo	[84]
	Acetonitrilo/40 °C/4 h			[84]

(*) Se hace una discusión más amplia en la Tabla 4.

Fuente: Adaptado de [80]

En relación a la aplicación de la extracción con fluidos supercríticos, los resultados obtenidos por varios autores han demostrado que es una técnica eficaz para la obtención de extracto de piretrinas (Tabla 4). Los primeros estudios de Pan y col. [86] describieron un sistema de extracción de fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono para extraer los componentes insecticidas activos de piretrina I y piretrina II. En su trabajo determinaron que para piretrinas I y II, las extracciones con dióxido de carbono supercrítico a 40 °C y 8 MPa, fueron mejores que las extracciones con n-hexano; encontrando que el tiempo de extracción más eficiente fue en las primeras 3 h del experimento [86]. Posteriormente, Kiriamiti y col. [82,91], realizaron

extracciones de piretrinas, utilizando dióxido de carbono supercrítico como disolvente, en una planta piloto semi-continua, obteniendo extractos muy similares a los obtenidos en la extracción en Soxhlet con hexano. En su trabajo establecieron que a 40 °C la cantidad de extracto de piretrina crudo era independiente de la presión cuando se operaba por encima de 10 MPa. Así mismo, establecieron que la parte de la semilla contenía más extracto crudo y piretrinas que la parte de la flor.

Tabla 4

Condiciones para la extracción de piretrina a partir de flores secas utilizando CO₂ supercrítico.

Condiciones de trabajo	Contenido de piretrina	Método de determinación	Fase móvil	Referencia
40 °C/8 MPa	1,95%	HPLC – UV	Diclorometano	[86]
40 °C/8 MPa	140 % piretrina I y 55 % piretrina II	HPLC – UV	Mezcla agua /diclorometano	[86]
100 °C/3 MPa/40 min	0,78–0,94%	SFC-FID	CO ₂	[81]
20 °C/40 °C/10 MPa	0,9%	HPLC – UV	Acetil-acetato + hexano	[82,91]
40 °C/30 MPa	1,1%	RP-HPLC – UV	Acetonitrilo / agua	[87]
40 ° C/40 MPa/210 min	n / A	n / A	n / a	[88]
40 ° C/9 MPa/80 min	1,34%	GC – MS	n / a	[89]

Fuente: Adaptado de [80]

Baldino y col. [89] realizaron la extracción de piretrinas utilizando CO₂ supercrítico acoplado a un proceso de separación fraccionada, con el objetivo de producir una extracción completa y selectiva de los principios insecticidas. Para ello, trabajaron a 9 MPa y 40 °C como condiciones operativas en el primer paso de extracción y para la separación fraccionada utilizaron dos separadores en serie operando a -10 °C y a una presión igual a la de extracción, y 25 °C, 1,5 MPa, respectivamente. En un segundo paso de extracción supercrítica, realizado a 20 MPa y 40 °C, demostraron que muchos compuestos no deseados se co-extraían en estas condiciones de proceso. En su trabajo determinó que, realizando una separación fraccionada durante un tiempo

aproximado de 80 min., los extractos del producto contenían aproximadamente 99% p / p de piretrinas [89].

Gallo y col. [88] realizaron una comparación entre tres procesos de extracción de piretrinas, incluida la maceración tradicional en n-hexano y alcohol etílico, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción en fase sólida, empleando un extractor tipo Naviglio. Los resultados obtenidos de este estudio permitieron afirmar que la maceración es el método más sencillo, aunque el rendimiento del proceso de extracción del material extraído en relación al peso de flores secas es menor (en n-hexano, 3,3 % y en alcohol etílico, 5,8 %), y el tiempo de extracción requerido es mayor (4 días), en comparación con los otros dos métodos analizados. En la extracción por medio del extractor Naviglio obtuvieron rendimientos ligeramente superiores en n-hexano (3,26 %) y alcohol etílico (6,31 %) con tiempos de extracción mucho más cortos (3,5 h en n-hexano y 2 h en alcohol etílico). En la extracción con fluidos supercríticos, las condiciones experimentales para la extracción con CO₂ fueron T = 313 K y P = 40 MPa. El tiempo total de extracción se fijó en 210 min, encontrándose que el rendimiento de extracción fue menos eficiente que el obtenido con el extractor Naviglio, pero presentando la ventaja de no requerir el uso de disolventes [88].

2.3.4 Impregnación mediante fluidos supercríticos

La impregnación es un proceso de deposición de compuestos en una superficie sólida mediante interacciones físicas o químicas. Una de las aplicaciones más reciente de los procesos de impregnación, es la de adicionar una sustancia con propiedades activas a un polímero con el fin de mejorar alguna de sus propiedades. De forma convencional, la impregnación de especies bioactivas en diferentes matrices poliméricas se ha realizado durante la síntesis o el

procesamiento del polímero; o por inmersión y remojo de los materiales poliméricos, preparados previamente, en una solución que contiene las sustancias bioactivas a impregnar [92]. A pesar de que la impregnación con estos métodos es relativamente sencilla, presentan inconvenientes como el uso de disolventes orgánicos tóxicos que tienen que ser retirados posteriormente de las matrices por motivos de salud, seguridad y mantenimiento de la integridad del producto; reacciones indeseadas entre sustancias o degradación térmica de alguna de ellas, incluso bajos porcentajes de impregnación y problemas de dispersión heterogénea [93–95].

Las propiedades únicas del CO₂ supercrítico, han dirigido la atención hacia la tecnología de impregnación que explota sus beneficios para transferir e incorporar moléculas de soluto en una red polimérica [96–98]. La alta difusividad del CO₂, provoca que se produzca una transferencia de materia mucho más rápida en comparación con disolventes convencionales, así como una distribución homogénea del aditivo en toda la matriz polimérica, siendo ésta una de las principales ventajas del proceso. Además, los fluidos supercríticos pueden difundir fácilmente fuera del polímero, una vez que la presión se reduce a valores ambientales, por lo que no dejan residuos de disolventes en la muestra de polímero impregnado [99–101].

La Figura 7 muestra un esquema simplificado de cómo se lleva a cabo el proceso de impregnación de compuestos activos en polímeros, en presencia de CO₂ en condiciones supercríticas. Se distinguen tres fases [23]:

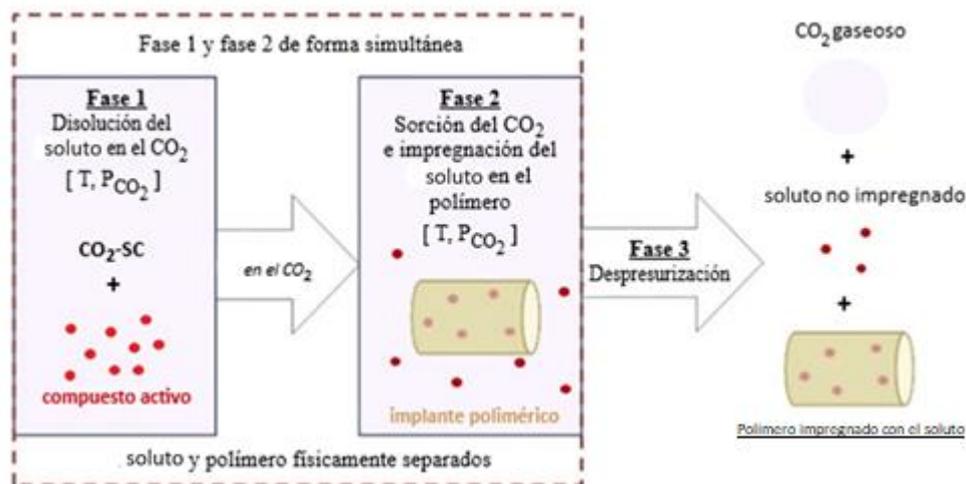


Figura 7

Esquema de las fases del proceso de impregnación supercrítica

Fuente: Adaptado de [23]

- Fase 1: Disolución de la sustancia activa en el fluido supercrítico: el CO₂ supercrítico es un buen disolvente para compuestos no polares y de bajo peso molecular; sin embargo, moléculas polares o compuestos con una gran masa molecular no serán disueltos por este solvente. En el caso de sustancias activas de naturaleza polar se pueden adicionar al CO₂ solventes orgánicos polares, de manera semejante a como se hacía en el proceso de extracción. En estos casos ocurre, además, un equilibrio entre el CO₂ y el nuevo disolvente añadido, permitiendo que los compuestos activos del extracto pasen a solubilizarse en la mezcla CO₂-solvente [102]. La solubilidad de los solutos en el CO₂ supercrítico dependerá, de la naturaleza del soluto, pero también de las condiciones de presión y temperatura utilizadas en el proceso.
- Fase 2: Hinchamiento de la matriz polimérica y difusión del compuesto activo: los fluidos supercríticos son capaces de penetrar en los polímeros, plastificarlos e hincharlos. El fluido

supercrítico cargado con el soluto penetra en el interior de la matriz polimérica favoreciendo la difusión interna de la sustancia activa. De esta forma, la carga de soluto no está limitada a la superficie externa del polímero, sino que también es retenida en el interior de la matriz polimérica.

- Fase 3: Despresurización: después de un tiempo de contacto determinado se lleva a cabo una despresurización de una celda de impregnación. Esta bajada de presión provoca un descenso de la densidad del fluido supercrítico volviendo a su estado gaseoso y precipitando el soluto en el interior y la superficie del polímero, produciéndose la impregnación. De manera general, una despresurización rápida puede conllevar un aumento de la carga de extracto impregnado sobre la matriz, pero a su vez, puede originar un daño mecánico sobre el material, mientras que, por el contrario, una despresurización lenta puede causar una pérdida excesiva de soluto, aunque preservando la integridad de la matriz [64,65].

El proceso de impregnación con CO₂ supercrítico es complejo pues intervienen, al menos tres componentes: CO₂ como portador, compuesto activo y matriz polimérica. El reparto del compuesto activo entre las fases poliméricas y la del CO₂ supercrítico se rige por la afinidad relativa de los sistemas binarios implicados: CO₂-compuesto activo, CO₂-polímero y compuesto activo-polímero. La eficiencia del proceso de impregnación generalmente se mide con el coeficiente de reparto K que establece la relación relativa del compuesto activo por la fase polimérica y la fase de CO₂ en condiciones supercríticas y específicas de presión y temperatura y se calcula de la siguiente manera:

$$K = \frac{c_{polimero}}{c_{CO_2}} \quad (2)$$

donde $C_{\text{polímero}}$ y C_{CO_2} son las concentraciones de compuesto activo en la fase de polímero y en la fase de CO_2 respectivamente (en g / g). Según lo reportado por Champeau (2015) el coeficiente de partición K varía entre 10^{-2} y 10^4 y depende de las condiciones experimentales [23].

Es por ello que una de las principales ventajas del proceso de impregnación con CO_2 supercrítico es la capacidad de ajustar la carga del compuesto activo variando las condiciones operativas como la presión, la temperatura y el tiempo de contacto. De hecho, es una consecuencia de la variación de la solubilidad del compuesto activo, de la difusión de CO_2 en la matriz y del hinchamiento del polímero a la presión y temperatura de operación.

El análisis bibliográfico realizado permite establecer las principales ventajas de utilizar fluidos supercríticos tanto para procesos de extracción como de impregnación; que se pueden resumir considerando los siguientes puntos [103]:

- El fluido supercrítico tiene un coeficiente de difusión más alto y menor viscosidad y tensión superficial que el disolvente líquido, lo que conduce a una mayor penetración en la muestra y a una transferencia de masa más favorable.
- La selectividad del fluido supercrítico es mayor que la del disolvente líquido, ya que su poder de solvatación puede ajustarse cambiando las condiciones de temperatura y / o presión.
- La separación entre soluto y disolvente, cuando se opera con CO_2 supercrítico se consigue fácilmente mediante la despresurización del fluido supercrítico ya que el CO_2 a condiciones atmosféricas es un gas.

- Se puede operar a temperatura ambiente, por lo que es un método ideal para la extracción de compuestos termolábiles, así como para la impregnación de los mismos.
- Se utiliza poca cantidad de disolvente orgánico o ninguno por lo que se considera un proceso respetuoso con el medio ambiente.
- Es posible reciclar y reutilizar el fluido supercrítico y, por lo tanto, hacer el proceso más rentable y minimizar la generación de desechos.
- La ESC se puede llevar a cabo a diferentes escalas, desde la extracción de pocos miligramos en laboratorio hasta la de toneladas de muestra en escalas industriales.
- Permite la optimización de procesos de extracción y/o impregnación al manipular variables como la presión y temperatura de operación.

2.3.5 Funcionalización de materiales plásticos con productos naturales

Las características de los fluidos supercríticos unidas al procesamiento de distintos materiales de soporte, han permitido la impregnación de fungicidas en madera [104], el tratamiento del cuero y tejidos textiles [105], su aplicación en la industria farmacéutica para la obtención de biomateriales con actividades anestésicas e inflamatorias [95], así como en la industria alimentaria para el desarrollado de envases con el fin de prolongar la vida útil de los alimentos [106].

En el caso específico de materiales plásticos, la impregnación a través de la técnica de fluidos supercrítica es un método eficaz que puede utilizarse para la solución de una amplia gama de aplicaciones tecnológicas y científicas [107]. La baja solubilidad entre el CO₂ en estado supercrítico y los polímeros es una condición necesaria para el empleo de esta técnica.

Generalmente, la solubilidad en CO₂ aumenta con el número de grupos polares del polímero (Tabla 5) [108].

Tabla 5

Solubilidad en CO₂ de algunos polímeros

Polímero	Método	Rango presión (MPa)	Rango temperatura (°C)	Solubilidad
PP (polipropileno)	GM-D (*)	20,4	25	0,1 %
PU (poliuretano)	GM-D	13,6	40	2,2 %
	GM-M (**)	0-5	35	0-12 SCC/cm ³
LDPE (polietileno de baja densidad)	GM-D	6,8	25/40	0,0/0,2 %
	GM-D	13,6	40	0,4 %
	GM-D	20,4	25	0,5 %

(*) GM-D, método gravimétrico (desorción); (**) GM-M, método gravimétrico (microbalanza)

Fuente: [108]

En relación a la aplicación de la impregnación con fluidos supercríticos, los resultados obtenidos por varios autores han demostrado que es una técnica eficaz para la obtención de matrices poliméricas con propiedades bioactivas (Tabla 6).

Goñi y col. [109], han investigado la impregnación asistida por CO₂ supercrítico de películas de nanocompuestos de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés, Low Density Polyethylene o como PEBD, en español) / sepiolita con dos cetonas terpénicas insecticidas (timoquinona y R - (+) - pulegona), como una estrategia para mejorar la capacidad de carga en comparación con LDPE puro. En su trabajo, aplicaron un diseño experimental factorial para

evaluar el efecto de cinco variables de proceso (contenido de sepiolita: 1-10% p / p; fracción molar de cetona inicial: 0,0017-0,0025; presión: 9-13 MPa; tasa de despresurización: 0,5–20 bar / min; tiempo: 2–4 h, temperatura a 45 °C) sobre el rendimiento de impregnación. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) indicaron que la presión, el tiempo y la fracción molar de cetonas afectan significativamente el rendimiento de impregnación (que varía entre $2,36 \pm 0,18$ y $8,60 \pm 1,66\%$ p / p) [109].

Tabla 6

Procesos de impregnación con CO₂ supercrítico para la obtención de matrices poliméricas con propiedades bioactivas

Plástico	Sustancia activa	Condiciones	Referencia
Películas nanocompuestas de LDPE/sepiolita	Timoquinona y R-(+)-pulegona	9–13 MPa / 45 °C/2–4h	[109]
Polietileno (LLDPE)	Eugenol	15 y 25 MPa / 25, 35 y 45 °C	[110]
Polipropilene (PP) en fibras	N-halamina polisiloxana	28 MPa/50 °C	[19]
PET (monocapa)	Tocopherol (TOC)	17 MPa / 40 °C	[111]
PET/PP (multicapa)			
Polímeros biodegradables y biocompatibles (PCL, CA, PLGA)	Timol	7,5 MPa y 30 MPa y a una temperatura media de 35 °C	[112]

Medeiros y col. [110], realizaron un experimento con el aceite esencial de clavo (CEO), un agente activo multicomponente naturalmente rico en eugenol, que incorporaron en películas de polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) mediante el uso de impregnación con CO₂ a alta presión. Estudiaron los parámetros de temperatura (25, 35 y 45 °C), presión (15 y 25 MPa) y

relación de masa CEO:CO₂ (2 y 10%), utilizando una celda de visualización de volumen variable durante 4 h para determinar las mejores condiciones de impregnación. También realizaron ensayos cinéticos de impregnación de CEO. En su investigación encontraron que la mayor cantidad de CEO impregnado (40,2 mg g⁻¹ de LLDPE) lo obtuvieron al 10% de relación de masa CEO:CO₂, 45 °C y 150 bar, a las 2 h del tiempo de procesamiento, observando que las propiedades térmicas y mecánicas de las películas de LLDPE se mantuvieron estables después del procesamiento a alta presión [110].

En la investigación de Chen y col. [19], sintetizaron un precursor cíclico de N-halamina, 4-etil-4-(hidroximetil) oxazolidin-2-ona (EHMO), que posteriormente unieron a un polímero, el poli(metilhidrosiloxano) (PMHS). El producto de la alcoholisis se cloró con hipoclorito de terbutilo con el fin de obtener un N-halamina polisiloxano a base de EHMO. El polisiloxano de N-halamina se impregnó en fibras de polipropileno inerte (PP) y formó una capa de recubrimiento de 72 nm utilizando CO₂ supercrítico como disolvente a 28 MPa y 50 °C para la aplicación biocida. El procedimiento sintético general y el proceso de impregnación se caracterizaron por espectroscopía de transformada de Fourier infrarroja (FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) y microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM, Scanning Electron Microscope), respectivamente. La capa de polisiloxano de N-halamina en PP le proporcionó potentes capacidades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Con esta investigación se demuestra que la estrategia de usar PMHS como polímero portador y CO₂ en estado supercrítico como solvente de trabajo para la impregnación, permite funcionalizar sustratos inertes sin la necesidad de enlaces químicos y solventes orgánicos [19].

Franco y col. [111], utilizaron la técnica de impregnación con CO₂ supercrítico para adsorber α -tocoferol (TOC), un antioxidante natural. Realizaron los experimentos de impregnación supercrítica a 17 MPa y 40 °C utilizando diferentes soportes monocapas y multicapas: películas de PP, películas de PET y películas de PET/PP, impregnando cantidades hasta 3,2 mg de TOC / cm² de película, sobre una película monocapa de PP, y hasta 2,66 mg de TOC / cm² de película, considerando una película de múltiples capas. Este resultado se puede atribuir a la baja temperatura empleada y a la alta difusividad del CO₂ en estado supercrítico, que evita la volatilización / degradación de la sustancia activa y, al mismo tiempo, tiene una rápida penetración del principio activo en la matriz polimérica [111].

Finalmente, Milovanovic y col. [112], estudiaron la impregnación de timol en polímeros biodegradables y biocompatibles. Las condiciones del proceso de impregnación supercrítico del timol se realizaron en un rango de presiones entre 7,5 y 30 MPa y a una temperatura media de 35 °C (Tabla 7). El método de impregnación supercrítico de los polímeros analizados condujo al desarrollo de materiales porosos, libres de solventes y de valor agregado que liberan timol de manera controlada desde 5 h hasta varios días [112].

Tabla 7

Condiciones para la impregnación supercrítica de los polímeros seleccionados con timol.

Polímero	m polímero (g)	m timol (g)	P (MPa)	T (° C)	t (h)	DR (MPa min ⁻¹)
PCL	0,15±0,01	0,17±0,03	30	40	0,5-3	0,5±0,05
CA	0,064±0,005	1,2±0,1	15,5	35	1-6	1,5±0,1
PLGA	0,40±0,05	0,40±0,05	75	35	2-24	30,0±0,5

m polímero: masa del polímero; m timol: masa del timol; DR: velocidad de descompresión; PCL: poli(ϵ -caprolactona), CA: acetato de celulosa; PLGA: ácido poli-láctico-co-glicólico.

Fuente: [112].

2.3.6 Impregnación supercrítica de plásticos con plaguicidas

Existen en la bibliografía solo unos pocos estudios centrados en la funcionalización de polímeros plásticos con plaguicidas. Únicamente los trabajos de Goñi y col. [109,113] y Pajnik y col. [109] se centran en el análisis de la ISC con plaguicidas. En concreto, Goñi y col. [109], trabajaron con películas de polietileno de baja densidad (LDPE). En estudios previos, estos investigadores trabajaron sobre la aplicación de la impregnación asistida por $scCO_2$ para la incorporación de una mezcla de cetonas terpénicas en películas de nanocompuestos de LDPE / sepiolita con el fin mejorar la capacidad de carga así como las propiedades finales con respecto a las películas de LDPE puro [109]. Basados en ese trabajo, estos investigadores desarrollaron un material de empaque, apto para la industria alimentaria, impregnado con la mezcla de dos cetonas terpénicas (timoquinona y R - (+) - pulegona) que presenta actividad biopesticida. Estos experimentos de impregnación se realizaron según un diseño factorial fraccional para evaluar

el efecto de cuatro variables del proceso en dos niveles (presión: 10-15 MPa; tasa de despresurización: 0,5-2,0 MPa / min; tiempo: 2-4 h; fracción molar inicial de cetonas: 0,0017-0,0025) sobre el rendimiento de impregnación y la selectividad entre cetonas. La impregnación se llevó a cabo en sistema discontinuo, manteniendo la temperatura constante (45 °C) y las condiciones de presión no se variaron durante el período de tiempo establecido, después del cual se liberó el CO₂ a una velocidad de despresurización constante. Los resultados indicaron que el tiempo de contacto y la concentración de cetonas son los únicos factores con efectos significativos en el rendimiento de impregnación (que oscilan entre el 2,25 y el 5,59 %). La actividad insecticida de las muestras de película impregnada se evaluó mediante ensayos contra el gorgojo del maíz, una plaga importante en granos almacenados. Las películas mostraron un alto nivel de actividad durante los primeros 2 días (~ 100% de mortalidad), que disminuyó gradualmente hasta no mostrar toxicidad después de 7 días [113].

Por otro lado, Pajnik y col. [114], estudiaron la impregnación con fluidos supercríticos de un extracto comercial de piretro en tela de algodón, para su utilización como repelente de garrapatas. Los experimentos de impregnación se llevaron a cabo a 40 °C y dos presiones diferentes de 8 y 10 MPa, a diferentes tiempos desde 1 h, hasta 24 h de impregnación. Las condiciones a 40 °C y 8 MPa proporcionaron cantidades específicas del extracto impregnado de 0,5% y 1% después de 1 h y 2 h de la impregnación, respectivamente. La presencia de piretrinas en la superficie de la tela de algodón fue confirmada por análisis FTIR y su actividad repelente fue probada contra garrapatas. En los bioensayos realizados, las garrapatas no accedían a la "zona repelente" generada por las telas de algodón impregnadas, o permanecieron allí un menor tiempo [114].

En un estudio posterior, estos mismos autores [115], realizaron la impregnación con CO₂ supercrítico del mismo extracto de piretro pero tejidos de polipropileno y poliamida, así como acetato de celulosa en forma de perlas y películas con extracto de piretro para fabricar materiales funcionalizados con propiedades repelentes. Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 40 °C, presiones de 10 y 20 MPa durante un tiempo de entre 0,5 y 18 h. La etapa de despresurización se hizo a una velocidad de 5 bar / min. En su trabajo, lograron cargas de extracto de piretro en tejidos de polipropileno y películas de acetato de celulosa superiores al 30% a 10 MPa. En el caso de tejidos de poliamida y perlas de acetato de celulosa, fue necesario una presión de 20 MPa para obtener cargas superiores al 11%. El estudio de liberación de extracto de piretro mostró diferentes potenciales de los materiales probados para la liberación de repelente cuando se exponen al aire. Ambos tejidos de PP ensayados (27,67 y 45,34%) mostraron una liberación casi lineal con el tiempo de grandes cantidades de repelente. Por otro lado, el contenido de repelentes en los tejidos PA se mantuvo estable durante los 30 días de exposición al aire [115].

3 Materiales y métodos

3.1 Materia prima, reactivos y disolventes utilizados

El plástico seleccionado para los ensayos de impregnación fue el polipropileno (PP, CAS 25085-53-4, nombre sistemático 1-propeno, homopolímero, isotáctico), suministrado por la empresa S21-Obinsur (Cádiz, España). Las características principales de este polímero son:

- Espesor: 800 galgas (200 micras), donde 1 μm equivale a 4 galgas. Así, el espesor recomendado para proteger el cultivo en las bajas temperaturas es de 200 - 800 galgas.
- Resistencia a la rotura, a la deformación por altas temperaturas (punto de fusión 189 °C) y a la rotura por bajas temperaturas.
- Estructura cristalina dándole origen a alta resistencia y rigidez.

Como extracto activo en el proceso de impregnación se utilizó, inicialmente un extracto comercial de piretrina (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Este extracto contiene una mezcla de piretrinas principalmente piretrina I y II; es un aceite viscoso con un color que va desde amarillo hasta el pardo, dependiendo de su grado de pureza; es insoluble en agua y soluble en una serie de disolventes orgánicos. Una vez estudiado el proceso y obtenidas las mejores condiciones de impregnación, el proceso de impregnación se llevó a cabo con un extracto obtenido por extracción con CO₂ supercrítico a partir de flores del género *Chrysanthemum*.

La materia prima utilizada en el proceso de extracción son las flores *Chrysanthemum spp* (Fig. 8) comercializada por la empresa Florabel, ubicada en Sanlúcar de Barrameda (Cádiz, España). En total, se estudiaron cuatro especies (*Chrysanthemum maximun*, también conocida como *Leucanthemum miximum*, *Chrysanthemum coronarium*, *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium*,). Las mismas se recolectaron en el año 2019 en ramos de cinco

tallos. Una vez en el laboratorio, se separó la flor del resto de la planta y se secaron en estufa a 40 °C hasta peso constante. Previo a la extracción, las muestras se trituraron (Bosch Mmb2000 de 200 w), con el fin de reducir el tamaño de partícula.



Figura 8

Flores de Chrysanthemum

Proveedor: Florabel ubicada en Sanlúcar de Barrameda (Cádiz, España)

Los diferentes disolventes y reactivos utilizados en el trabajo de laboratorio se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8*Disolventes y reactivos utilizados en el presente trabajo*

Reactivo	Pureza (%)	CAS	Empresa	Utilización
Dióxido de carbono	99,99	124-38-9	Abello-Linde S.A.	Proceso de extracción e impregnación de alta presión.
Acetato de etilo	99,7	141-78-6	Sigma-Aldrich	Disolución de extractos. Limpieza de equipos en la extracción. Preparación de muestras para cuantificación.
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Reactivo analítico (QL100)	1898-66-4	Sigma-Aldrich	Cuantificación indirecta de la impregnación.

3.2 Equipos de extracción e impregnación

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo fundamentalmente en dos equipos, ambos de la firma Thar Tech (Pittsburg, PA, USA). El equipo de modelo SF104 se empleó en las pruebas de impregnación y el equipo modelo SF500 se utilizó para las pruebas de extracción, ambos trabajan en condiciones supercríticas.

Los dos equipos están dotados de recipientes con diferentes tamaños. El recipiente de 104 ml se utilizó en las pruebas de impregnación y el de 500 ml se empleó en las pruebas de extracción. Además, todas las plantas disponen de un separador ciclónico de 500 ml y un sistema de bombas, de acuerdo a la descripción de siguientes apartados (Fig. 9).



Figura 9

Equipos de impregnación y de extracción

(1) Equipo para impregnación en método discontinuo (104 ml), (2) Bomba utilizada en el equipo para la impregnación, (3) Montaje del equipo para la para impregnación en sistema semicontinuo (500 ml), (4) Separador ciclónico en el sistema de extracción

Las características de cada una de las unidades se detallan a continuación:

▪ **Extractor/Impregnador/ Recipiente**

Cumple la función de extractor o impregnador en función del tipo de proceso que se lleve a cabo en él. Esta formado por un recipiente cilíndrico de acero inoxidable de 104 ml para la impregnación o 500 ml para la extracción. Así mismo, cuenta con un sistema de cierre hermético, gracias a una junta de sellado, que le permite mantener la presión de trabajo. Para verificar la presión del interior, dispone de un manómetro, y para controlar la temperatura del proceso, dispone de una camisa calefactora y dos termopares. Uno de ellos, mide la temperatura del interior del reactor y el otro, controla la temperatura de la camisa calefactora.

En las zonas de entrada y salida de muestra, el equipo presenta un filtro de 2 μm con el fin de impedir un arrastre de la muestra de manera involuntaria.

- **Bombas de alta presión**

Tanto en el proceso de extracción como en el proceso de impregnación se empleó una bomba para el CO_2 de la firma Thar Tech modelo P50 de doble pistón. Esta bomba se acciona automáticamente por el sistema de control de la planta. La bomba consigue que se bombee CO_2 desde la botella al recipiente, pero para que este proceso tenga lugar, es preciso que el CO_2 se encuentre en estado líquido, por lo que se requiere de la presencia de un cambiador de calor a presión de botella conectado a un baño criotermostato (PolyScience, Niles, IL, EE.UU.) que enfría el dióxido de carbono por debajo de 5 °C. Una vez enfriado, pasa por un caudalímetro másico antes de pasar por la bomba a alta presión. A la salida de la bomba, el CO_2 se precalienta en un intercambiador de alta presión antes de llegar al extractor o impregnador.

- **Separador ciclónico**

El separador ciclónico es un recipiente de acero inoxidable de 500 ml que se ha utilizado en el proceso de extracción. Este dispositivo al igual que el extractor, dispone de un sistema de apertura superior manual de forma sencilla. Al finalizar la extracción, se abre el separador y se añade el disolvente adecuado con el fin de recoger el extracto obtenido. La mezcla sale a través de una válvula que está a la salida del separador y se abre manualmente. La temperatura y la presión del separador son monitorizadas por un manómetro y un sensor de temperatura conectado al sistema de control de la planta. Las condiciones de presión están controladas por una válvula reguladora de presión manual colocada a la salida del

separador, y las de temperatura, desde el programa de control de la planta mediante resistencias eléctricas.

- **Válvula automatizada de regulación de presión (BPR)**

Esta válvula funciona de forma automática, y posee un sensor de temperatura y otro de presión. La presión máxima de trabajo es de 500 bar y esta termostatizada para evitar problemas de congelación del dióxido de carbono al despresurizarse. Su ubicación es a la salida del extractor/impregnador y su principal función es controlar la presión de operación del proceso. La salida de dicha válvula está conectada al separador ciclónico donde se recoge el producto extraído en el proceso de extracción.

- **Válvulas y tuberías.**

Todo el sistema se encuentra conectado por una serie de tuberías de acero inoxidable (de 1/8 de pulgada) y dispone diferentes tipos de válvulas.

- **Controlador**

Ambas plantas están automatizadas por un sistema de control conectado a un ordenador que tiene instalado el software ICM (Thar Tech. Pittsburg, PA, USA). Una imagen de la pantalla de dicho programa aparece en la Figura 10. Las variables que se pueden controlar son la temperatura del intercambiador de calor a alta presión, temperatura en el interior del recipiente de extracción/impregnación, en el interior del separador y en el interior de la válvula BPR1; así como presión y caudal másico de dióxido de carbono en la bomba P50.

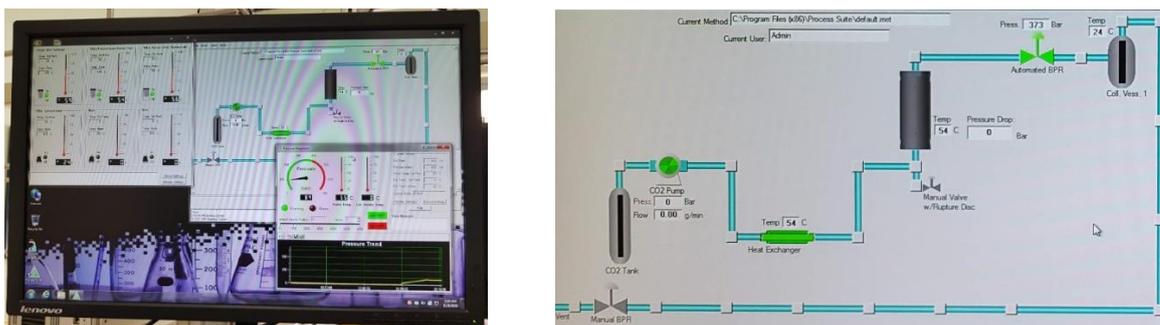


Figura 10

Sistema de control automatizado de las plantas de impregnación y extracción

3.3 Procedimiento y condiciones de operación en extracción supercrítica

El proceso de extracción se llevó a cabo de manera semicontinua. Se trabajó en el equipo Thar Tech, modelo SF 500 ml el cual se ha descrito en el apartado anterior (3.2). En el extractor se añadió, dentro de un cartucho de papel de filtro, una cantidad aproximada de entre 20-30 g de flores de *Chrysanthemum* previamente secadas y molidas, que son el material vegetal utilizado para la obtención del extracto. El caudal de CO₂ se mantuvo constante a 10 g min⁻¹ durante todo el tiempo que duró la extracción (5 horas).

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada sobre el empleo de la extracción de piretrina con CO₂ supercrítico [85–88] se decidió realizar extracciones a dos condiciones diferentes de presión: 10 y 40 MPa y manteniendo constante la temperatura en 35 °C ya que los estudios previos indican que es más favorable trabajar a bajas temperaturas.]

De manera general, con el fin de crear las condiciones de trabajo, inicialmente se enciende el baño refrigerante encargado de refrigerar el CO₂ que proviene de la botella. El baño deberá

alcanzar los 5 °C, para poder empezar el proceso de extracción o impregnación. Cuando el intercambiador de calor a baja presión indique que la temperatura es próxima a la temperatura de trabajo, se abre la llave de la botella de dióxido de carbono. En ese momento, los manómetros situados encima del extractor y en la bomba de dióxido de carbono, deben marcar 6 MPa aproximadamente.

A continuación, se establecen todas las condiciones de trabajo: presión, temperatura y flujo del CO₂. Cuando se estabilizan las condiciones del sistema, se contabiliza el tiempo seleccionado para el proceso. Transcurrido el tiempo de operación, se detiene la bomba, se cierra la botella de CO₂ y se activa el método de despresurización programado, para que se realice la descompresión de manera suave y controlada. Con el fin de recolectar el producto obtenido de la extracción, se adiciona acetato de etilo para disolver el extracto, posteriormente, se abre la válvula a la salida del separador ciclónico y se recoge el extracto en matraces de vidrio.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se colectó sobre acetato de etilo el cual posteriormente se eliminó en un rotoevaporador a 40 °C. El rendimiento de extracción se calculó por el método gravimétrico y las muestras de extractos se almacenaron a 4 °C en ausencia de luz hasta su posterior utilización en la impregnación del plástico polipropileno.

Finalizado el proceso de extracción, se limpia todo el sistema de conducciones y extractores, con acetato de etilo, que es el disolvente que mejor disuelve el producto.

3.4 Procedimiento y condiciones de operación en impregnación supercrítica

Se estudiaron dos modos de operación en el proceso de impregnación: discontinuo (BM) y semicontinuo (SM). Para llevar a cabo el primero de ellos, se trabajó en el equipo Thar Tech, modelo SF 104 ml que, como se ha explicado en el apartado anterior (3.2), dispone de un recipiente de 104 ml con sistema de agitación incluida. En él se colocó tanto la cantidad a impregnar de extracto de piretrina como el polímero de PP (Fig. 11). Durante la etapa de presurización se bombeó el CO₂ a una velocidad de 10 g min⁻¹ hasta que se alcanzó la presión deseada. Durante todo el tiempo de impregnación se aplicó agitación (40 rpm) para mejorar la disolución entre extracto de piretrina y fase supercrítica.

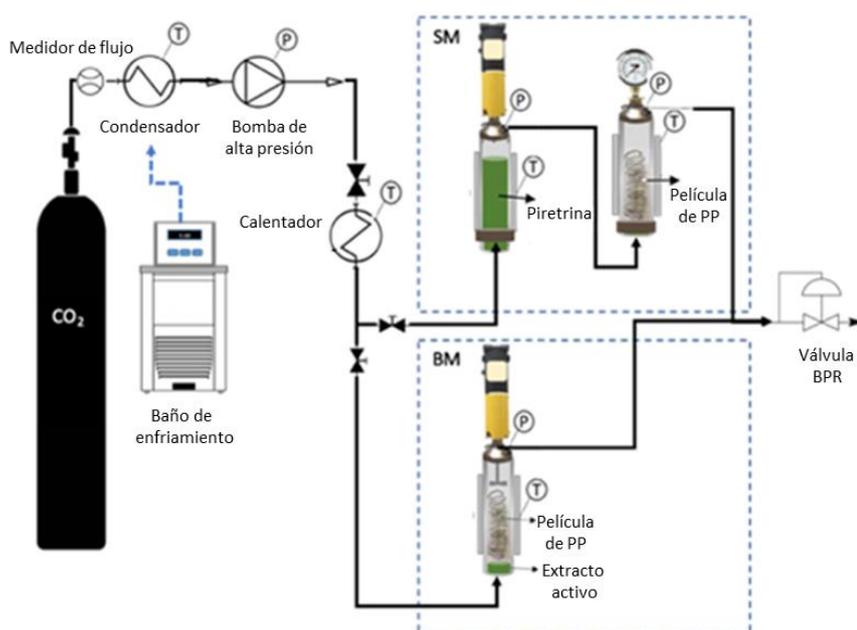


Figura 11

Diagrama de flujo para el proceso de impregnación en ambos modos de operación discontinuo y continua

Para trabajar de modo semicontinuo fue necesario adaptar los equipos conectando ambos recipientes en serie; en el primero de ellos (104 ml) se introdujo la cantidad adecuada del extracto de piretrina y en el segundo (500 ml), el plástico de PP que iba a ser impregnado (Fig. 11). A continuación, se bombea continuamente CO₂. El flujo de CO₂ entra desde el fondo al primer recipiente, disuelve el extracto y sale del recipiente por su parte superior. La mezcla de piretrina-CO₂ resultante entra en el segundo recipiente donde se pone en contacto con el PP y es ahí donde ocurre el proceso de impregnación. El flujo continuo de CO₂ contribuye a facilitar el contacto del soluto con el polímero.

En ambos modos de operación, el plástico de PP de dimensiones 17x2 cm se colocó helicoidalmente sobre un soporte de acero para permitir que el CO₂ supercrítico fluyera a lo largo de las capas (Fig. 12). Cuando se completó el tiempo de impregnación, se llevó a cabo una etapa de despresurización controlada a una velocidad de 5 MPa min⁻¹. Estudios previos [116] han demostrado que los resultados a una tasa de descompresión alta cuando se impregna sustancias naturales en películas de PP favorecen el proceso de impregnación en comparación con tasas de descompresión más lentas.



Figura 12

Plástico en soporte de acero

La influencia de la presión y la temperatura tanto en modo discontinuo como en semicontinuo se determinó mediante un diseño multifactorial que incluyó cuatro niveles de presión y dos de temperatura (Tabla 9). Los datos resultantes se procesaron mediante el software estadístico STATGRAPHICS 18.

Tabla 9

Variables analizadas y condiciones en los procesos discontinuo y semicontinuo

Variable	Valor
Tiempo de impregnación (h)	1*, 3, 4, 5, 8, 12-20
Cantidad de extracto de piretrina en el recipiente (ml)	1, 2
Presión (MPa)	10, 20, 30, 40
Temperatura (°C)	35, 55

* Solo en el método discontinuo

Tanto en el modo discontinuo como semicontinuo se analizó el efecto del tiempo de impregnación, considerando dos volúmenes de extracto de piretrina (1 y 2 ml). Para este

estudio, los niveles de presión y temperatura se mantuvieron constantes en base a los resultados obtenidos del proceso en discontinuo (10 MPa, 55 °C). Los experimentos realizados en el periodo 12-20 h se diseñaron con el objetivo de analizar los efectos de un tiempo de impregnación prolongado.

Las muestras impregnadas se limpiaron para eliminar el exceso de sustancia activa que pueda precipitar sobre su superficie y se almacenaron en la oscuridad hasta el análisis de la carga impregnada, para evitar una posible pérdida de la misma.

Todo el estudio de influencia de las condiciones de impregnación por ambos modos de operación (BM y SM) se realizó con el extracto comercial de piretrina. Una vez seleccionadas las mejores condiciones de operación con dicho extracto comercial, se realizaron impregnaciones de PP utilizando un extracto natural, obtenido previamente en el proceso de extracción con CO₂ supercrítico. En este sentido, se realizaron impregnaciones por el método discontinuo a 10 y 40 MPa, mientras que la temperatura (55 °C) y el tiempo (5 h) fueron iguales para las dos condiciones de presión (Tabla 10):

Tabla 10

Impregnación con extracto natural, por el proceso discontinuo.

Variable	Valor
Tiempo de impregnación (h)	5
Extracto natural en el reactor (g/ml) *	0,09 ± 0,01
Presión (MPa)	10, 40
Temperatura (°C)	55

* La cantidad a impregnar de extracto de piretrinas fue disuelta en 1,0 ml de acetato de etilo

3.5 Cuantificación de la impregnación del plástico

Diferentes autores han sugerido medir el incremento de peso del polímero después del proceso de impregnación como método para determinar su carga de impregnación. Sin embargo, debido a las que las cargas de impregnación obtenidas mediante los procedimientos utilizados en este estudio son relativamente pequeñas, dicho método gravimétrico carecería de la precisión necesaria. Por este motivo, al igual que en trabajos anteriores [116], la cantidad de extracto impregnado en las películas de PP se ha determinado mediante un método espectrofotométrico indirecto. Este método se basa en la capacidad de algunos extractos, como el de las piretrinas, de reducir un reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con el consiguiente cambio de color de violeta a amarillo.

Para determinar la cantidad de extracto de piretrinas que reacciona con el radical libre DPPH, fue necesario realizar una curva de calibración que relacione la inhibición de DPPH (I) frente a diferentes cantidades de extracto de piretrina (mg). Para ello, se prepararon diferentes concentraciones de extracto de piretrinas comercial (0,07 - 2,3 mg/ml) utilizando acetato de etilo como disolvente. En la cubeta del espectrofotómetro se añadieron alícuotas de 90 μ l de las diferentes soluciones de concentrado de piretrinas a 3,51 ml de una solución de DPPH de $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l. La absorbancia de DPPH se midió espectrofotométricamente a 515 nm cada 2 min, hasta que la reacción alcanzó el estado estacionario. En ese momento los datos obtenidos se representaron como porcentaje de DPPH residual en el estado estacionario en función de la cantidad de extracto de piretrina, como se muestra en la ecuación 2:

$$I = 0,2536 \cdot \ln(\text{mg of pyrethrin}) + 0,4238 \quad (3)$$

Para determinar la cantidad de extracto de piretrinas impregnado, 3,6 ml de solución de DPPH 6.10^{-5} mol/L se pusieron en contacto con una cantidad fija de película impregnada (1 x 6 cm). La disminución de la absorbancia a 515 nm se midió después de 174 min de incubación a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Con los valores de absorbancia inicial (A_0) y una vez alcanzado el estado estacionario de la reacción entre la piretrina que contiene el plástico impregnado y el DPPH (A_i) se estima el porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \quad (4)$$

Con ese porcentaje de inhibición y la ecuación de calibrado (3) se puede obtener la cantidad de piretrina (mg) impregnada en el pedazo de plástico utilizado para el análisis (1x6 cm). Si esos resultados se refieren a la cantidad de plástico inicial impregnada (2x17 cm) se obtendrán la carga total de extracto de piretrina impregnado a las diferentes condiciones de operación estudiadas.

3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica de barrido en un microscopio Quanta 200 (FEI, Hillsboro, Oregon, EE. UU.) con el fin de detectar cualquier cambio estructural en el polímero que pudiera haber tenido lugar durante el proceso de impregnación

(Fig. 13). Para ello se tomaron varias imágenes SEM de las películas de PP antes y después de ser impregnadas con extracto de piretrinas.

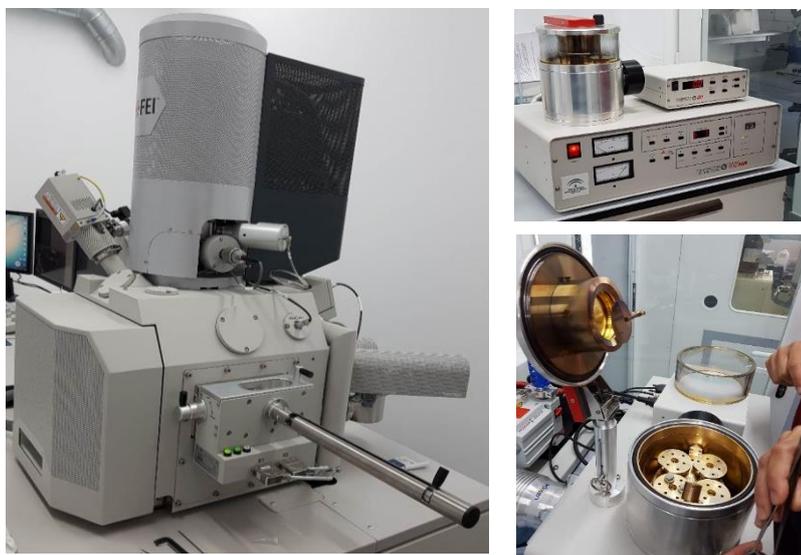


Figura 13

Microscopio Quanta 200

Previo a su análisis, las muestras se lavaron con agua bidestilada para eliminar las partículas que pudieran precipitar en la superficie del polímero. Luego, se colocaron sobre una cinta de carbón y se cubrieron con una capa de oro por medio de una capa de pulverización catódica. Las imágenes SEM se procesaron utilizando el software de análisis de imágenes Scion (Scion Corp., EE. UU. Frederick, Maryland, U.S) (Fig. 14).

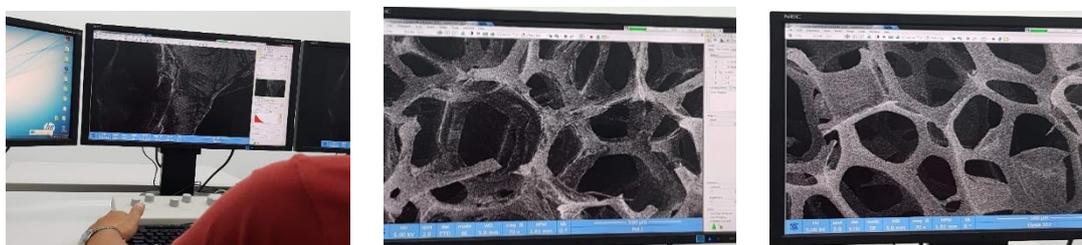


Figura 14

Imágenes SEM utilizando el software de análisis Scion

4 Resultados experimentales

En este apartado se recogen, en forma de tablas, los rendimientos experimentales de las extracciones realizadas a las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, en unas condiciones determinadas de presión, temperatura y tiempo. Así mismo, se presentan los resultados de la influencia del tiempo, la presión, la temperatura de operación en el proceso de impregnación supercrítica en el PP, de un extracto de piretrina comercial y del extracto obtenido en la extracción en el laboratorio, utilizando como disolvente dióxido de carbono.

4.1 Obtención de extracto de piretrina a partir de *Chrysanthemum cinerariifolium* con dióxido de carbono supercrítico

En la Tabla 11 se recogen los resultados experimentales de los rendimientos de extracción de piretrinas naturales, obtenidos a diferentes presiones, manteniendo la temperatura constante (35 °C), con dióxido de carbono en condiciones supercrítico a partir de biomasa seca de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. El tiempo de extracción (5 h) y el caudal del CO₂ (10 g.min⁻¹) también se mantuvieron constante en todos los experimentos. Los resultados se expresan en gramos de extracto por cada 100 g de muestra analizada (g extracto/100 g muestra).

Tabla 11*Rendimiento de extracción con CO₂ en condiciones supercríticas*

Muestra Crisantemo	Presión (MPa)	Rendimiento de extracción (g extracto/100 g muestra)
<i>Atlantis</i> ¹ (Variedad blanca)	10	3,39
<i>Atlantis</i> (Variedad blanca)	40	2,41
<i>Atlantis Yellow</i> ² (variedad amarilla)	10	1,84
<i>Atlantis Yellow</i> (variedad amarilla)	40	1,25
<i>Feeling green dark</i> ³ (variedad verde)	10	2,43
<i>Feeling green dark</i> (variedad verde)	40	1,97
Wizard ⁴ (Variedad roja)	10	2,29
Wizard (Variedad roja)	40	1,91

Nota: La temperatura es la misma para todos los experimentos (35°C)

Para este trabajo las muestras de crisantemo se han identificado con el nombre que le da el distribuidor.

4.2 Rendimiento de impregnación con un extracto de piretrina

Se ha seguido el mismo procedimiento para determinar los rendimientos tanto en los procesos de impregnación con la piretrina comercial, como con el extracto natural, utilizando la recta de calibrado representada en la Tabla 12.

¹ Danziger “Dan” Flower Farm,

² Danziger - “Dan” Flower Farm

³ Fides

⁴ Fides

Tabla 12*Recta de calibrado de piretrina*

Cantidad de piretrina (mg)	%I
0,29	0,16
0,58	0,252
1,16	0,411
2,33	0,647
4,65	0,815
9,3	1,01

4.2.1 Rendimiento de impregnación con extracto de piretrina comercial por el método discontinuo.

4.2.1.1 Influencia del tiempo de impregnación y cantidad de piretrina a impregnar por el método discontinuo

Con el fin de determinar la influencia del tiempo en el rendimiento del proceso de impregnación, se realizan varios ensayos por el método discontinuo, variando el tiempo de impregnación (3-16 h) y la cantidad de extracto a impregnar (1,0 y 2,0 ml de piretrina comercial). La presión y temperatura (10 MPa, 55 °C) se mantuvieron constantes.

Tabla 13*Influencia del tiempo en el proceso de impregnación, por el método discontinuo*

Tiempo (h)	Cantidad de piretrina impregnada/ cm ² (mg)	
	1,0 ml	2,0 ml
3	0,097	0,07
4	0,200	0,182
5	0,300	0,215
8	0,410	0,314
16	0,420	0,385

4.2.1.2 Influencia de la presión y la temperatura, por el método discontinuo

Con el fin de determinar la influencia de los parámetros en el rendimiento del proceso de impregnación, se realizaron varios ensayos por el método discontinuo variando la presión (10, 20 30, 40 MPa), la temperatura (35 y 55 °C) y la cantidad de piretrina utilizada (1 y 2 ml), por el método discontinuo, permaneciendo constante el tiempo de impregnación (1 h).

Tabla 14

Influencia de la presión, la temperatura y la cantidad de piretrina utilizada, por el método discontinuo, en función del extracto comercial (BM)

Presión (MPa)	Cantidad de piretrina impregnada/cm ² (mg)			
	35 °C		55 °C	
	1,0 ml	2,0 ml	1,0 ml	2,0 ml
10	0,19	0,20	1,32	1,33
20	0,11	0,10	0,40	0,41
30	0,12	0,13	0,88	0,90
40	0,15	0,16	1,16	1,20

4.2.2 Rendimiento de impregnación con extracto de piretrina comercial por el método semicontinuo

4.2.2.1 Influencia del tiempo y la cantidad en el rendimiento de impregnación por método semicontinuo.

Con el fin de determinar la influencia del tiempo en la eficiencia del proceso de impregnación, se realizan varios ensayos por el método semicontinuo, variando el tiempo de impregnación (3-16 h) y la cantidad de extracto a impregnar de piretrina comercial (1,0 y 2,0 ml). La presión y temperatura (10 MPa, 55 °C) se mantuvieron constantes.

Tabla 15*Influencia del tiempo en el proceso de impregnación, por el método semicontinuo*

Tiempo (h)	Cantidad de piretrina impregnada/ cm ²	
	(mg)	
	1,0 ml	2,0 ml
3	0,097	0,08
4	0,218	0,182
5	0,319	0,285
8	0,430	0,384
16	0,399	0,395

4.2.2.2 Influencia de la presión y la temperatura, por el método semicontinuo.

Con el fin de determinar la influencia de los parámetros en la eficiencia del proceso de impregnación, se realizaron varios ensayos por el método semicontinuo variando la presión (10, 20, 30, 40 MPa), la temperatura (35 y 55 °C) y la cantidad de piretrina utilizada (1 y 2 ml), manteniendo el tiempo constante (5 h).

Tabla 16

Influencia de la presión, la temperatura y la cantidad de piretrina utilizada, por el método semicontinuo

Presión (MPa)	Cantidad de piretrina impregnada/cm ²			
	35 °C		55 °C	
	1,0 ml	2,0 ml	1,0 ml	2,0 ml
10	0,20	0,23	0,24	0,25
20	0,17	0,15	0,07	0,10
30	0,17	0,16	0,11	0,13
40	0,19	0,18	0,06	0,10

4.3 Rendimiento de impregnación con un extracto natural de piretrina

El extracto utilizado para la impregnación corresponde al obtenido previamente en el proceso de extracción de las flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*. En el desarrollo experimental se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas con el extracto comercial de piretrina.

En las pruebas de laboratorio se realizaron impregnaciones por el método discontinuo, a dos presiones diferentes (10 MPa y 40 MPa), manteniendo constante la temperatura de impregnación (55 °C) y el tiempo de impregnación (5 h). El peso del extracto natural empleado en la impregnación de los plásticos ($93,4 \pm 5$ mg), fue disuelto en acetato de etilo (1 ml).

Tabla 17*Rendimiento de impregnación con un extracto natural de piretrina*

Presión (MPa)	Cantidad de piretrina impregnada/cm ² (mg)
10	1,059 ± 0,01
40	0,096 ± 0,01

5 Discusión de los resultados

5.1 Extracción Supercrítica de Piretrinas

En el presente apartado se discuten los resultados obtenidos en el estudio del proceso de extracción de piretrinas utilizando fluidos supercríticos. El procedimiento seguido ha consistido en analizar la influencia de la presión del CO₂ sobre el rendimiento de extracción. Para ello, la temperatura se ha fijado a valores bajos (35 °C), teniendo en cuenta investigaciones previas, que coincidían en que eran favorable para el proceso [82,91].

La Figura 15 muestra los rendimientos de extracción expresados en g de extracto/100 g de muestra seca, a las dos condiciones de presión estudiadas (10 y 40 MPa). La tendencia es similar en todas las variedades, una disminución en el rendimiento de extracción en la medida que aumenta la presión del CO₂ desde 10 hasta 40 MPa.

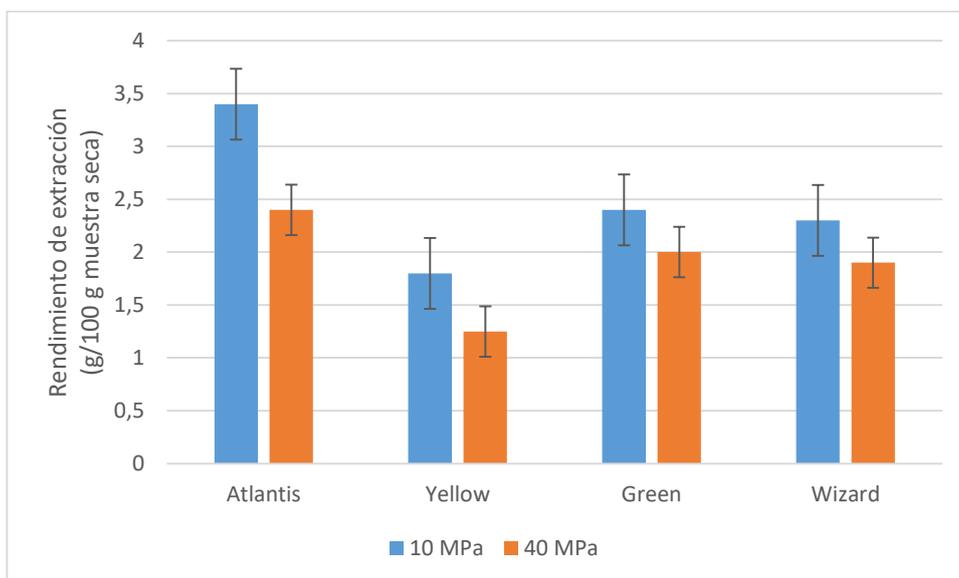


Figura 15

Rendimientos de extracción a dos condiciones de presión a igual temperatura

El poder disolvente de un fluido supercrítico depende de la densidad del disolvente, que, a diferencia de los solventes líquidos, se controla por cambios de presión y/o temperatura lo que permite realizar extracciones con un alto grado de selectividad. De manera general un incremento de la presión provoca un aumento de la densidad del CO₂ supercrítico y, por tanto, un incremento del poder disolvente del mismo. Sin embargo, el aumento de la presión también puede provocar una reducción de la interacción entre el fluido y la matriz como consecuencia de una disminución del coeficiente de difusión a mayor densidad. En el caso estudiado, es el segundo factor el que prevalece y por ello se observa una disminución en el rendimiento al operar a 40 MPa.

Los resultados del análisis del diseño experimental se recogen en las Figuras 16 (diagrama de Pareto) y 17 (diagrama de superficie de respuesta estimada), y en la Tabla 18 (análisis de varianza). El resultado de este análisis confirma lo discutido anteriormente. El diagrama de Pareto y el análisis de varianza indica que la presión influye significativamente en el proceso de forma negativa, disminuyendo el rendimiento de forma significativa al aumentar la presión (valor p menor de 0,05). Por otro lado, la variedad de crisantemo utilizada como materia prima también desempeña un rol importante, en este caso, de forma cuadrática. En definitiva, los rendimientos de extracción depende en gran medida de las condiciones de operación utilizadas, pero también es necesario tener en cuenta otros factores la variedad que se utilice en el proceso de extracción. El análisis de la superficie respuesta (Fig. 17) nos permite concluir que los mejores resultados se obtienen a la presión de 100 bar cuando se trabaja con la variedad *Atlantis blanca* como materia prima.

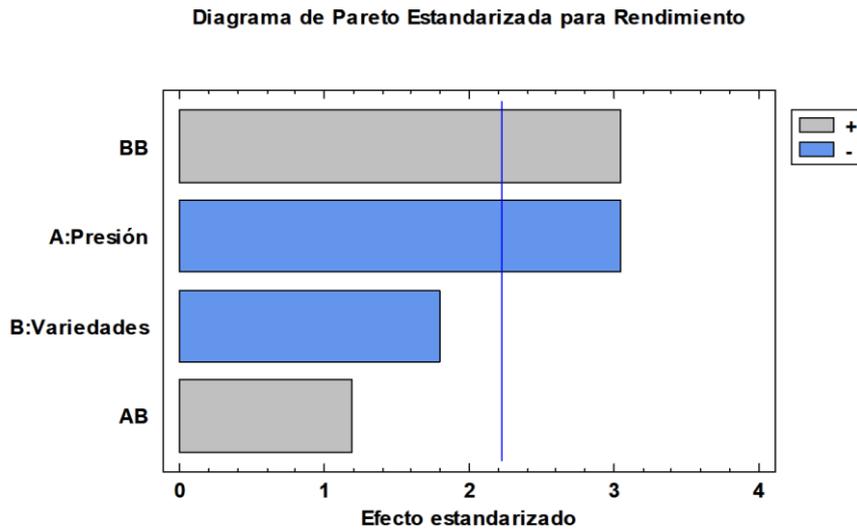


Figura 16

Diagrama de Pareto para el rendimiento de extracción teniendo en cuenta el efecto de la presión (10 y 40 MPa) y el de las variedades (valor cualitativo).

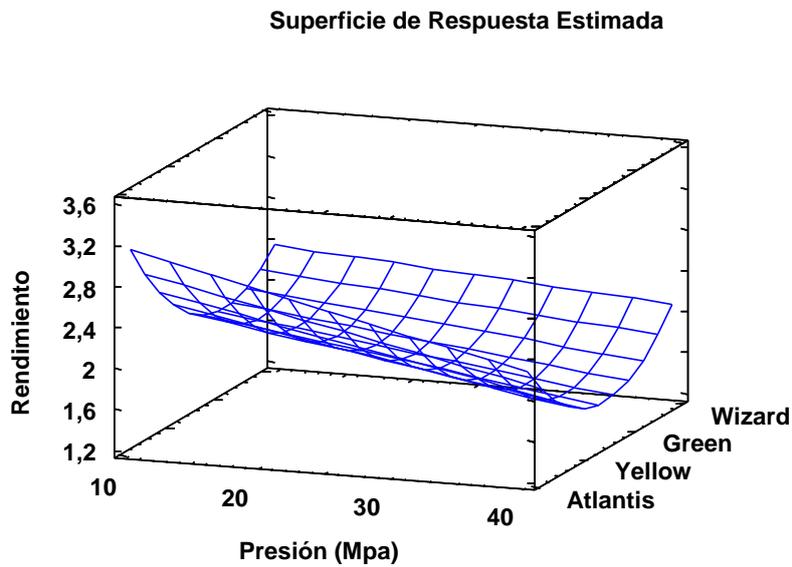


Figura 17

Diagrama de superficie respuesta para el proceso de extracción de piretrinas.

Tabla 18*Análisis de varianza del proceso de extracción de piretrinas.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Presión	1,35141	1	1,35141	9,27	0,0124
B: Variedades	0,472781	1	0,472781	3,24	0,1019
AB	0,205031	1	0,205031	1,41	0,2631
BB	1,35141	1	1,35141	9,27	0,0124
bloques	0,00140625	1	0,00140625	0,01	0,9237
Error total	1,45781	10	0,145781		
Total (corr.)	4,83984	15			

La extracción de piretrinas con CO₂ supercrítico ha sido previamente estudiada por otros autores. Kiriamiti y col. [82], evaluaron los efectos de la presión a 7, 10 y 25 MPa y temperatura a 20 o 40 °C sobre el rendimiento de extracción. Encontraron que, a 40 °C, la cantidad de piretrina era independiente de la presión, cuando estaba por encima de 10 MPa. Concluyeron que esto se debía a los efectos de la densidad sobre la solubilidad de la piretrina [82]. Por otro lado, Baldino y col. [89], reportaron que, a 40 °C, los mejores rendimientos de extracción para Piretrina I y Piretrina II se observaban a 8 MPa (140 ± 18 mg y 55 ± 9 mg por 100 g de muestra), indicando en su publicación que esto podría atribuirse a una baja densidad y una alta difusividad del dióxido de carbono supercrítico a baja presión. A medida que la presión de extracción aumenta de 8 a 14 MPa, la densidad del dióxido de carbono supercrítico aumenta de 0,337 a 0,768 g ml⁻¹, como resultado, los rendimientos de la ESC de piretrinas disminuían

significativamente. Sin embargo, hay mucho menos cambio en el rendimiento de extracción cuando se aumenta la presión de 14 a 25 MPa, ya que la densidad del dióxido de carbono supercrítico aumenta en menor grado (0,768-0,885 g ml⁻¹) [89].

5.2 Impregnación Supercrítica de piretrinas

La impregnación con solvente supercrítico ha demostrado ser una técnica con muy buenos resultados, comparada con los diversos métodos para la incorporación de una sustancia bioactiva en una matriz de polímero. La distribución homogénea del componente activo en todo el volumen total de polímero, la ausencia de residuos de disolventes orgánicos, la bajas demandas de energía en comparación con los procesos de impregnación convencionales, son las principales características de esta técnica [95]. En este apartado se analiza la obtención de polipropileno (PP) funcionalizado con extracto de piretrina con el fin de producir materiales que contienen la sustancia repelente adecuada para su uso en la industria agroalimentaria.

Inicialmente se analizará el proceso de impregnación en el polipropileno con un extracto comercial de piretrina. Se estudian dos modos de operación, así como la influencia de las variables de operación presión, temperatura, tiempo de impregnación y cantidad de piretrina sobre la carga de extracto impregnado. Finalmente se realizará la impregnación del extracto obtenido por extracción supercrítica en polímeros de polipropileno, comparando los resultados con los obtenidos con el extracto comercial.

5.2.1 Impregnación de un extracto comercial de piretrinas

La mayoría de las investigaciones sobre procesos de impregnación que utilizan CO₂ en estado supercrítico, operan en modo estático [109,111,115]. En estos procesos, tanto el soluto como el polímero se colocan dentro de un mismo recipiente, preferentemente agitado, pero evitando el contacto directo entre soluto y polímero, para garantizar que toda la impregnación se deba al efecto del CO₂ supercrítico. Se introduce el CO₂ en el reactor a temperatura controlada, hasta que se alcanza la presión deseada. Una vez finalizada la fase de impregnación, se podrá realizar una etapa de lavado para evitar la condensación o precipitación del soluto en el recipiente de impregnación durante la despresurización.

Este proceso tiene algunos inconvenientes relacionados con la cantidad de extracto que se puede utilizar ya que estará limitado por la solubilidad del mismo en la fase supercrítico. No obstante, el principal problema del BM es su escalado, ya que la agitación requerida genera algunas dificultades técnicas complejas en los equipos a escala industrial. La alternativa es utilizar configuraciones semicontinuas que utilicen dos reactores conectados, el primero que contenga el extracto bioactivo y el segundo el polímero. En este caso, el CO₂ fluye a través del primer reactor para disolver el extracto bioactivo. Una vez alcanzadas las condiciones de solubilidad requeridas, la solución de CO₂ - extracto bioactivo pasa al segundo recipiente, donde se ha colocado el polímero, y tiene lugar la impregnación. Esta configuración no presenta grandes dificultades de escalado, sin embargo, los análisis sobre SSI operando en modo semicontinuo (SM) son escasos en la literatura. De hecho, aún está por analizar el uso de reactores supercríticos en configuración SM aplicados a la impregnación de PP y su potencial escalado a nivel industrial para producir un producto que puedan ser utilizadas en invernaderos o instalaciones hidropónicas.

En los siguientes apartados se realiza una discusión de los resultados obtenidos en el proceso de impregnación de un extracto comercial de piretrina. Se comenzará analizando el método discontinuo, posteriormente se analizará el método semicontinuo, y se finalizará con una comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos. Teniendo en cuenta esos resultados, se realizará la impregnación del polímero utilizando el extracto obtenido en la extracción supercrítica, con el fin de verificar su viabilidad.

5.2.1.1 Impregnación del extracto comercial por el método discontinuo (BM)

Con el objetivo de analizar la influencia de las variables de operación en el método discontinuo, inicialmente se realizaron experimentos a diferentes tiempos de impregnación, manteniendo constante el resto de variables. Una vez seleccionado el mejor tiempo de impregnación, se evaluó el efecto de la presión y temperatura.

5.2.1.2 Efecto del tiempo de impregnación utilizando y cantidad de piretrina a impregnar por el método discontinuo

La Figura 18 representa la variación de la cantidad de producto impregnado en el proceso de impregnación de un extracto comercial, en PP operando en un proceso discontinuo (BM). Las condiciones del proceso fueron de 10 MPa y 55 °C y se han realizado pruebas a 3, 4, 5, 8 y 16 h. Las pruebas se realizaron para dos cantidades de piretrina comercial (1,0 y 2,0 ml). A partir de los resultados analizados en dicha figura es posible determinar el mejor tiempo de

impregnación y la cantidad de extracto a impregnar para todos los experimentos posteriores de análisis de la presión y la temperatura.

Del análisis de dicha figura, se puede inferir de manera general que:

- El tiempo del proceso tiene efecto sobre la carga de impregnación del proceso en BM, de tal manera que, a mayor tiempo, menor cantidad de impregnación.
- La impregnación en BM se realiza en las primeras etapas del proceso.
- La baja cantidad de extracto de piretrina impregnado y su solubilidad relativamente alta en CO₂ supercrítico, dan como resultado un proceso rápido cuando se trabaja en BM.
- Con 1,0 ml de extracto comercial se obtienen mejores resultados para el proceso de impregnación.

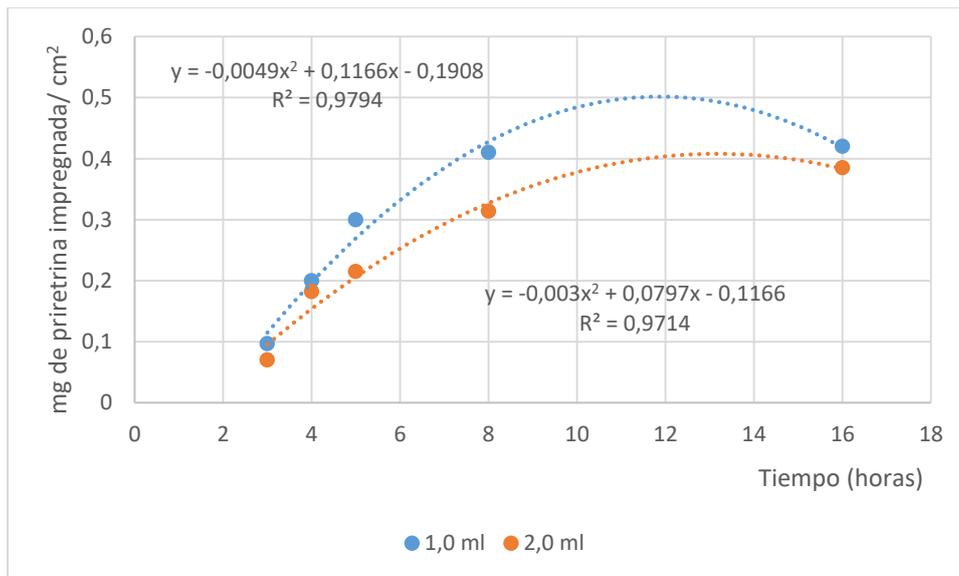


Figura 18

Estudio de la carga de impregnación de piretrina por BM a diferentes tiempos de proceso

Las condiciones del proceso fueron de 10 MPa y 55 °C y se han realizado pruebas a 3, 4, 5, 8 y 16 h.

Para analizar la influencia del tiempo de impregnación y la significativa de la cantidad de piretrina utilizada en el proceso de impregnación BM, se realizó un análisis estadístico de los resultados.

El ANOVA (Tabla 19) muestra la significación estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio con una estimación del error experimental. En el proceso BM, la cantidad de extracto a impregnar tienen un valor p menor a 0,05, lo que indica que hay un efecto significativo sobre la variable de respuesta, carga de impregnación, cuando se impregna con cierta cantidad de extracto. Esto puede deberse a que, al haber más cantidad de extracto disponible, éste presenta más afinidad por el disolvente que por el polímero, favoreciendo su difusividad. De igual manera, el tiempo en el proceso de impregnación tiene un valor p menor a 0,05, lo que indica que hay un efecto significativo sobre la variable de respuesta, carga de impregnación a diferentes tiempos, que coincide con los resultados obtenidos con el extracto comercial, quedando de manifiesto que la mejor impregnación se obtiene en las primeras etapas del proceso.

Tabla 19

Tabla ANOVA para dos cantidades diferentes de piretrina, por el proceso de impregnación BM

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Cantidad extracto	0,0068	1	0,0068	10,6966	0,0308	7,7086
Tiempo	0,1333	4	0,0333	52,3100	0,0010	6,3882
Error	0,0025	4	0,0006			

5.2.1.3 Efecto de la presión y la temperatura

Una de las principales ventajas del CO₂ supercrítico es la capacidad de regular la carga de la sustancia activa impregnada en el polímero, variando algunas de las condiciones de operación, como la presión y la temperatura del CO₂. Estos cambios producen variaciones en la solubilidad de los compuestos bioactivos, en la difusión del CO₂ dentro de la matriz, así como en el hinchamiento del polímero. Todo ello provoca que las interacciones soluto-polímero y/o soluto-disolvente se vean favorecidas o no, a determinadas condiciones de operación, por lo que es necesario la experimentación para evaluar qué interacciones prevalecen a las diferentes condiciones ensayadas.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo para BM a diferentes presiones (10–40 MPa) y temperaturas (35–55 °C), en función de la cantidad de piretrina (1,0 y 2,0 ml) se muestran en la Figura 19. Un análisis de la misma refleja un aumento apreciable en la carga de

impregnación cuando se aumenta la temperatura desde 35 °C hasta 55 °C en las presiones estudiadas. A medida que se aumenta la temperatura, aumenta la difusividad del dióxido de carbono y también la volatilidad de la piretrina, lo que a su vez favorece los fenómenos de transferencia de masa y, por tanto, la penetración del soluto en la matriz con la consiguiente impregnación.

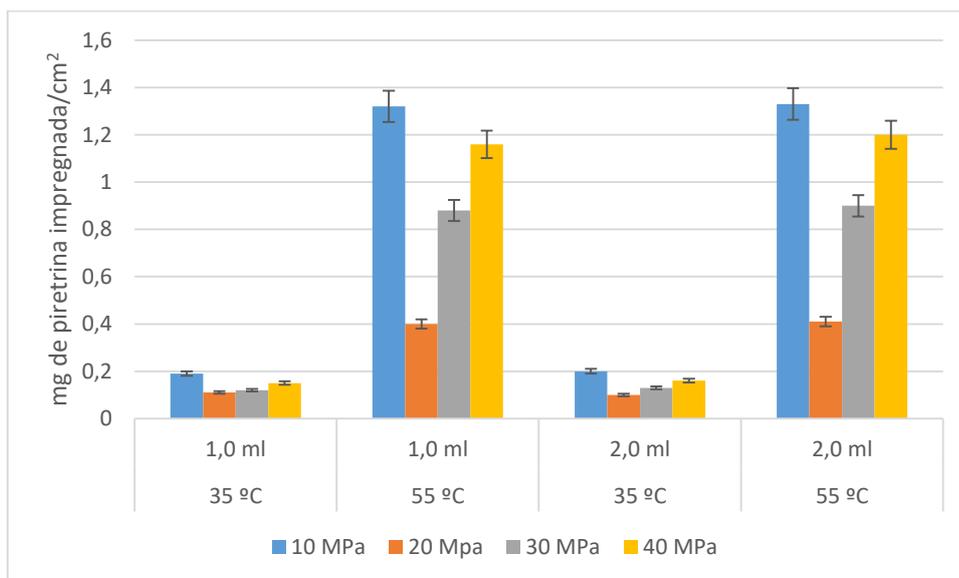


Figura 19

Estudio de la carga de impregnación de piretrina por BM a dos temperaturas y diferentes presiones de proceso

Tiempo de impregnación de 1 h

Pajnik y col. [114] han analizado la solubilidad del extracto de piretrina en CO₂ supercrítico. En el rango analizado por estos autores, de 35–40 °C y 8–20 MPa, los niveles más altos de solubilidad de piretrinas se lograron a baja temperatura y alta presión. La información que se encuentran en la literatura sobre la relación entre la solubilidad y las cargas de impregnación no son definitivas [95,111,115]. En este sentido, si bien algunos autores han indicado que las mayores cargas de impregnación están directamente relacionadas con la solubilidad del soluto

en el solvente, otros indican que, por el contrario, una solubilidad tan alta puede interferir en los rendimientos de impregnación ya que el soluto tiene mayor afinidad por el solvente.

Resultados similares del efecto de la temperatura han sido reportados en la literatura; por ejemplo, Sánchez-Sánchez y col. [117] concluyeron que, en el caso de la impregnación con fluidos supercríticos de mangiferina e iriflofenona en poliéster, la eficiencia de impregnación también se incrementó al aumentar la temperatura desde 35 hasta 55 °C a 50 MPa de presión.

En relación al efecto de la presión, exceptuando las pruebas que se realizaron a 10 MPa y produjeron las mayores cargas de impregnación, la Figura 19 muestra cómo un incremento en la presión desde 20 hasta 40 MPa, da como resultado una mejora del rendimiento de impregnación. Los niveles de presión más altos disminuyen la difusividad de CO₂, pero aumentan la absorción de CO₂ y el hinchamiento de los polímeros. Fernández-Ponce y col. [118], también llegaron a resultados semejantes al analizar el proceso de impregnación de ácido gálico (GA) en tejidos de algodón. Ellos observaron que, en condiciones isotérmicas, un nivel de presión más alto conducía a cargas de ácido gálico más elevados. Este efecto positivo de la presión fue más notable a 45 °C donde la carga de impregnación aumentó de 73,3 a 236,4 µg GA / 100 mg de algodón, con el incremento de presión de 10 a 30 MPa. Según esta investigación, una presión más alta mejora la capacidad disolvente del CO₂, favoreciendo así la disolución del compuesto activo [118], y por tanto, el rendimiento de impregnación.

Un estudio reciente obtuvo como resultado un mayor efecto de plastificación del CO₂ sobre PP a alta presión en comparación con el efecto sobre otros polímeros semicristalinos como el poli (tereftalato de etileno) (PET) o poliestireno (PS) [119]. Este efecto de plastificación es mayor

al aumentar la presión [120] y favorece la difusión y el acceso de moléculas a los sitios activos dentro del polímero, lo que a su vez mejora su capacidad de impregnación [121].

Los resultados mostrados en la Figura 19 indican que a 10 MPa - nivel de baja presión - la afinidad del extracto de piretrina hacia el polímero es mucho mayor que su afinidad hacia el CO₂ en condiciones supercríticas. A estas condiciones de operación (55 °C y 10 MPa) la densidad del CO₂ es la más baja (340, 78 Kg m⁻³) y por tanto su poder disolvente disminuye, la solubilidad del soluto también es baja y todo ello provoca que el extracto de piretrina tenga más afinidad por el polímero que por la fase fluida supercrítica. La presión afecta las propiedades fisicoquímicas del CO₂ en estado supercrítico, pero también las del polímero. Un gas comprimido, como el CO₂, puede ser bastante soluble en polímeros vítreos a estos niveles de presión. Ello provoca un considerable hinchamiento del polímero y la reducción de la temperatura de transición vítrea (T_g) [120,121].

A 40 MPa y 55 ° C, se alcanzaron valores de cargas de impregnación cercanos a los obtenidos a 10 MPa y 55 ° C. Sin embargo, Pajnik y col. [115], quienes completaron un estudio sobre la impregnación de extracto de piretrina en tejidos de PP, concluyeron que las mejores cargas de impregnación se obtuvieron a 20 MPa. Estos autores utilizaron el mismo polímero, pero analizaron la impregnación en una fibra y no en una película. Este comportamiento diferente puede explicarse por un transporte de masa diferente que dependería de la estructura de la matriz. Aunque el tipo de polímero es el mismo, la estructura amorfa y cristalina de la muestra puede variar y la estructura espacial del polipropileno es diferente. Estas diferencias pueden explicar este comportamiento diferente [115].

Para analizar la influencia significativa de estas variables en el proceso de impregnación BM, se realizó un análisis estadístico de los resultados. La Figura 20 y la Tabla 20 muestran el gráfico de Pareto correspondiente y los resultados del análisis de varianza (ANOVA).

La presión se varió en 4 niveles; por tanto, su efecto se puede descomponer en dos factores: una parte lineal y una parte cuadrática. Como puede verse en la Figura 20, la cantidad total de piretrina cargada no depende en gran medida de la parte lineal de la presión; sin embargo, el efecto de la parte cuadrática es significativo. Adicionalmente, el nivel de temperatura más alta juega un papel favorable, especialmente cuando la presión permanece en su valor más bajo (10 MPa), alcanzándose las mayores cargas de piretrina.

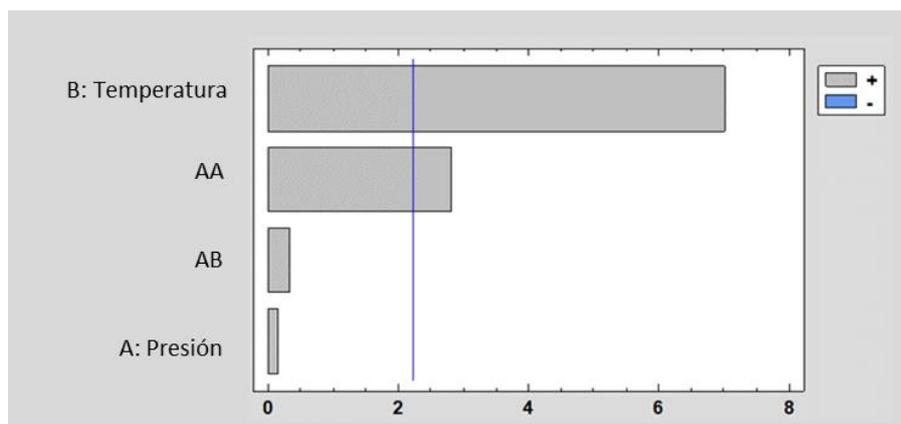


Figura 20

Diagrama de Pareto del proceso de impregnación por el método discontinuo

Nota: A: efecto de la presión, B: efecto de la temperatura

El ANOVA (Tabla 20) muestra la significación estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio con una estimación del error experimental. En el proceso BM, tanto el efecto de la temperatura como el efecto cuadrático de la presión tienen un valor P menor a 0,05, lo que indica que ambos tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta, carga de

impregnación, mientras que la combinación de temperatura y presión ($p > 0,05$) no es significativa.

Tabla 20

Tabla ANOVA del proceso de impregnación BM de piretrina en películas de PP

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Presión	0,0010368	1	0,0010368	0,02	0,8887
B: Temperatura	2,48378	1	2,48378	49,35	0,0000
AA	0,394384	1	0,394384	7,84	0,0188
AB	0,0057122	1	0,0057122	0,11	0,7432
Bloques	0,000081	1	0,000081	0,00	0,9688
Error total	0,503345	10	0,0503345		
Total (corr.)	3,38833	15			

El resultado del análisis estadístico puede ajustarse a la ecuación 5. Esta ecuación permite calcular el valor de la carga de impregnación en mg / cm^2 para diferentes valores de presión (MPa) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en el proceso BM. El coeficiente de correlación para el ajuste resultante es $R^2=85,15\%$. La Figura 21 muestra el gráfico de superficie que corresponde a esta ecuación empírica.

$$I (\text{mg} / \text{cm}^2) = -0,276125 + 0,035175 * T + 0,00157 * P^2 \quad (5)$$

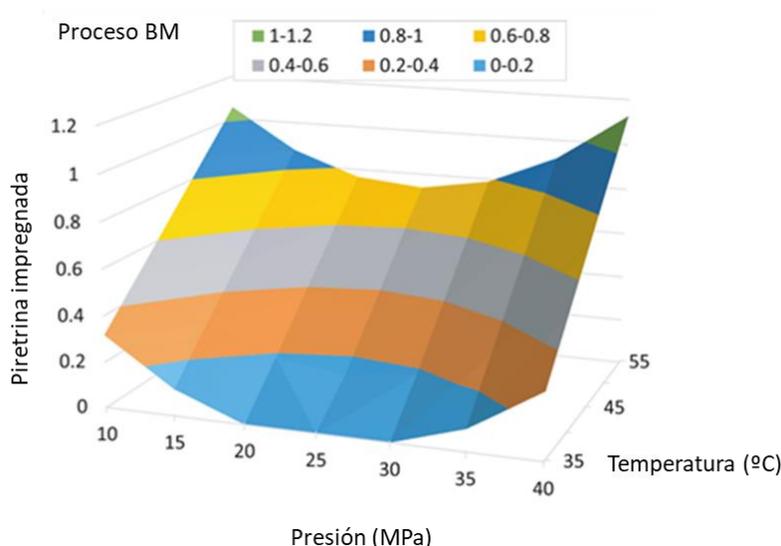


Figura 21

Gráfico de superficie de respuesta estimada del proceso de impregnación de BM

mg de piretrina impregnado / cm² frente a P, T

La Figura 22 A y B muestra los films antes y después del proceso de impregnación supercrítica, respectivamente, a diferentes aumentos de microscopía electrónica SEM. El análisis de la superficie del polímero por SEM permite concluir que el proceso de impregnación no modifica significativamente la estructura de la película de PP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cejudo y col. [116] sobre la impregnación de extractos naturales en películas de PP / PET [116]. Sin embargo, Pajnik y col. [115] informó cambios en las fibras de la superficie de PP. Su análisis SEM indicó que las fibras se habían arrugado después del proceso de impregnación del extracto de piretrina en PP. Estos autores justificaron estos cambios morfológicos como resultado de una fusión parcial del polímero [115]. En el presente trabajo no se ha observado tal modificación estructural del PP. Esto podría explicarse por el hecho de que, aunque el polímero impregnado es el mismo, trabajaron en fibra mientras que en el presente trabajo la impregnación se realizó en películas de polipropileno. Dado que los polímeros de

película o fibra se obtienen a través de diferentes procesos, sus propiedades físicas pueden verse afectadas en consecuencia, lo que explicaría su diferente comportamiento.

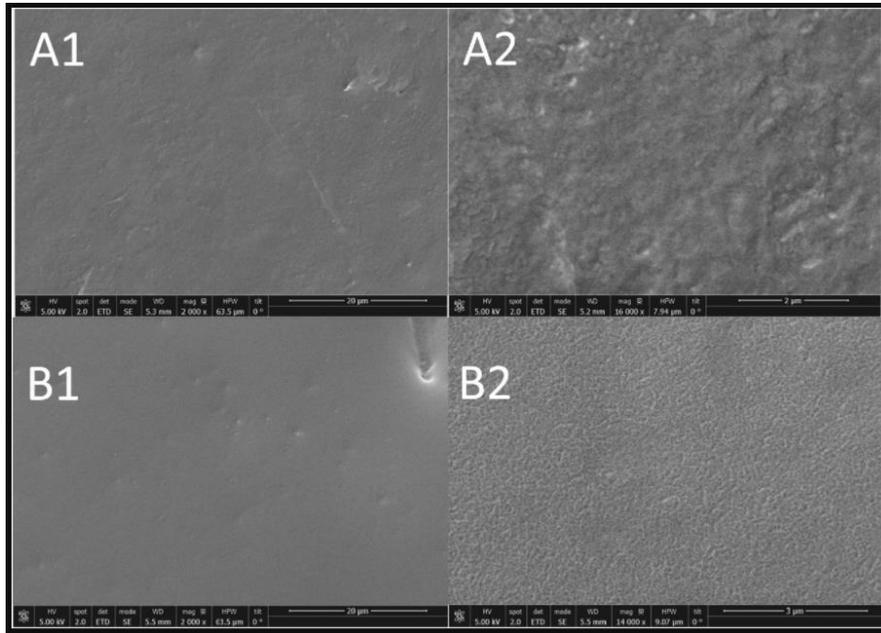


Figura 22

Imagen SEM de película de PP antes y después del proceso de impregnación

Nota: A: imagen antes del proceso: (A1 a 2000 × y A2 a 16.000 ×)

B: imagen después del proceso de impregnación supercrítica (B1 a 2000 × y B2 a 14.000 ×)

Análisis realizado en las mejores condiciones de impregnación en BM.

5.2.1.4 Impregnación del extracto comercial por el método semicontinuo (SM)

Al igual que en el proceso BM, se comenzará analizando el tiempo de funcionamiento del proceso semicontinuo, en este caso también se ha analizado la cantidad de extracto de piretrina añadida en el primer recipiente. Una vez fijado ambos parámetros se procederá al estudio del efecto de la presión y temperatura sobre la carga de piretrina impregnada.

5.2.1.5 Efecto del tiempo de impregnación y la cantidad inicial de extracto añadida utilizando el método semicontinuo

En la Figura 23 se muestra la variación de la carga de impregnación en función del tiempo de operación utilizando el método semicontinuo. Los tiempos de impregnación ensayados fueron 3, 4, 5, 8 h y un tiempo elevado entre 12-22 h. Además, se evaluó la cantidad de piretrina en el recipiente de solubilidad (1 y 2 ml). Las condiciones de impregnación seleccionadas para llevar a cabo este estudio fueron 10 MPa y 55 °C. En esta figura se incluyen además las ecuaciones de correlación encontradas para los diferentes experimentos.

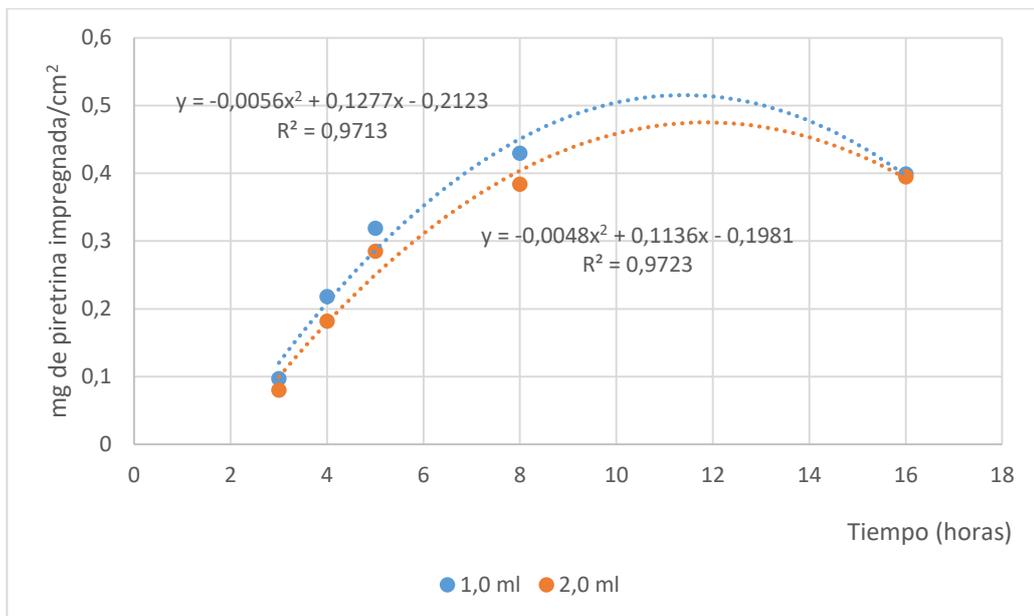


Figura 23

Estudio de la carga de impregnación de piretrina por SM a diferentes tiempos de proceso

Nota: Pruebas realizadas a 10 MPa de presión y 55 ° C de temperatura

La Tabla 21 muestra el análisis estadístico de las ecuaciones de correlación encontradas, en él se incluyen los intervalos de confianza de los parámetros de las ecuaciones. Mediante la observación de los intervalos de confianza de cada término, es posible comparar los resultados obtenidos con las dos ecuaciones y determinar si son diferentes o semejantes desde un punto de vista estadístico. Si los coeficientes de la ecuación encontrados al trabajar con 1,0 ml de piretrina se encuentran dentro de los niveles de confianza de la otra curva y viceversa se puede inferir que ambas ecuaciones son semejantes. Este análisis ha permitido concluir que los datos experimentales obtenidos al utilizar dos cantidades diferente de extracto de piretrina (1,0 y 2,0 ml) son semejantes desde el punto de vista estadístico. Por esta razón se selecciona 1,0 ml de extracto como la cantidad adecuada para seguir realizando el resto de experimentos. Probablemente, valores más altos de esta variable podrían conducir a mejores cargas de impregnación. Sin embargo, se decide mantener estas cantidades para realizar una comparación de los dos métodos de impregnación analizados sin incrementar excesivamente esta cantidad. Futuros trabajos de escalado podrían enfocarse a optimizar esta variable.

El tiempo de trabajo seleccionado para la impregnación fue de 5 h, por ser un valor medio de los tiempos analizados, ya que, como se ha comentado antes, los tiempos de impregnación más altos afectarían a la rentabilidad del proceso.

Tabla 21*Intervalos de confianza (95%) para los coeficientes del modelo*

	Parámetro estimado	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Coeficientes del modelo para 1 ml de extracto de piretrina				
Constante	-0,234	0,047	-0,346	-0,123
Tiempo (h)	0,130	0,013	0,099	0,160
Tiempo (h) ²	-0,006	0,0007	-0,007	-0,004
Coeficientes del modelo para 2 ml de extracto de piretrina				
Constante	-0,178	0,072	-0,349	-0,008
Tiempo (h)	0,096	0,020	0,049	0,143
Tiempo (h) ²	-0,005	0,001	-0,006	-0,002

5.2.1.6 Efecto de la presión y la temperatura por el método semicontinuo

Para determinar la influencia de la presión y temperatura en el proceso de impregnación utilizando el método semicontinuo (SM), se realizaron diferentes pruebas manteniendo el tiempo de impregnación constante (5 h). Los resultados de los experimentos a diferentes presiones (10–40 MPa) y temperaturas (35–55 °C), en función de la cantidad de piretrina (1,0 y 2,0 ml) se muestran en la Figura 24. Un análisis de la misma, refleja un aumento apreciable en la carga de impregnación cuando se aumenta la temperatura desde 35 °C hasta 55 °C y se trabaja a bajas presiones. A medida que se aumenta la temperatura, aumenta la difusividad del dióxido de carbono y también la volatilidad de la piretrina, lo que a su vez favorece los

fenómenos de transferencia de masa y, por tanto, la penetración del soluto en la matriz con la consiguiente impregnación.

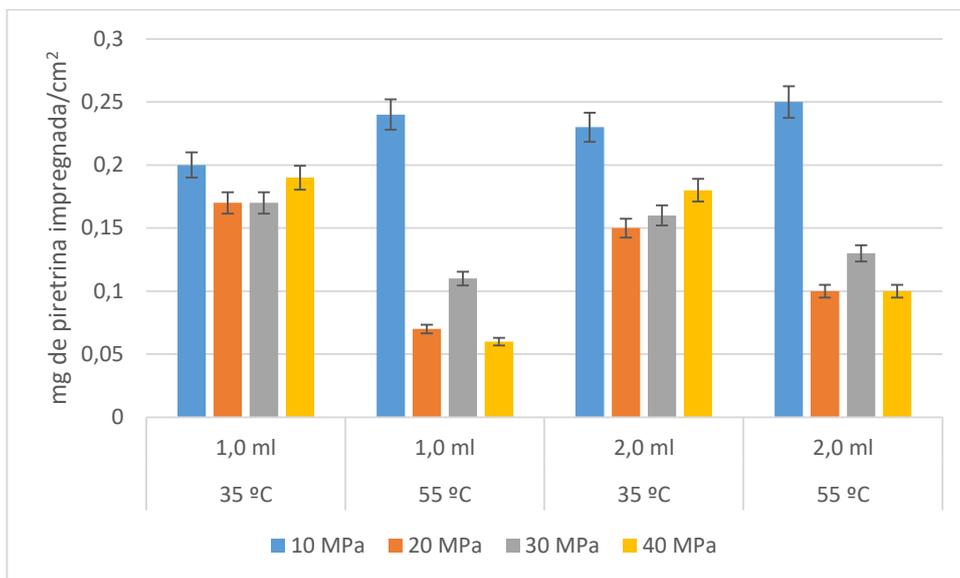


Figura 24

Estudio de la carga de impregnación de piretrina por SM a dos temperaturas y diferentes presiones

Nota: Impregnación realizada a las 5 h de tiempo de impregnación

Pruebas realizadas con dos volúmenes de piretrina (1,0 ml y 2,0 ml) adicionados en el primer recipiente

De manera similar al proceso BM, las mayores cargas de impregnación se obtuvieron al trabajar específicamente a 10 MPa y 55 °C. Sin embargo, al igual de lo que sucedió en los procesos de BM, a medida que la presión superó los 10 MPa, las cargas de impregnación fueron menores, lo que indica que la afinidad de la piretrina hacia el CO₂ en estado supercrítico llega a ser más alto que en el polímero.

El efecto de la temperatura sobre la eficiencia del SM es diferente al que presentan en el proceso BM. Así, mientras que en el proceso BM un aumento de temperatura de 35 °C a 55 °C mejora

la carga de impregnación independientemente del nivel de presión, en el proceso SM las cargas más grandes se obtuvieron a la temperatura más baja, excepto en aquellos casos en los que la presión de operación fue 10 MPa. Esto indica que el efecto de la temperatura sobre el proceso de impregnación del extracto de piretrina cuando se opera en SM depende de la presión de trabajo. El proceso SM demostró ser más complejo que el BM, ya que dos fenómenos diferentes deben equilibrarse en diferentes etapas, es decir, la disolución de la sustancia activa durante la primera etapa y la posterior difusión e impregnación de la sustancia activa en la matriz durante la segunda etapa. Además, el flujo continuo de CO₂ hace que disminuya la cantidad de piretrina en el primer recipiente del proceso SM. El resultado es que el solvente ya no estará saturado y, por lo tanto, el equilibrio se desplazará al solvente, disminuyendo la cantidad de piretrina impregnada.

Se puede observar que a 10 MPa el efecto a un nivel de temperatura más alto fue positivo, de manera similar a lo que sucedió en el proceso BM. En su publicación, Pajnik y col. [114], indican que la solubilidad de la piretrina en sc-CO₂ esta minimizada para 10 MPa y 50 °C (valores para 50 °C; no hay datos para 55 °C). Esto permite favorecer el equilibrio del proceso de impregnación hacia el polímero que se encuentra en el segundo reactor y no hacia la fase supercrítica, favoreciendo así su impregnación.

El proceso de impregnación también se ve favorecido por el aumento de la difusividad a una temperatura más alta. Sin embargo, entre 20 y 40 MPa, se observó un efecto negativo de temperaturas más altas. Como se mencionó anteriormente, la temperatura no solo influye en la solubilidad de las sustancias activas sino también en el comportamiento del polímero. Cejudo y col. [122] analizaron las propiedades de tracción y termogravimétricas de los films de PP

antes y después de ser impregnados con extracto de hoja de olivo a diferentes presiones y temperaturas. Estos autores encontraron un efecto diferente en el rendimiento de las películas de PP dependiendo de las condiciones del proceso. Mientras que las muestras procesadas a 35 °C dieron como resultado una cristalinidad reducida del PP, a 55 °C la cristalinidad del PP no se vio afectada [122]. Esta modificación de la cristalinidad del PP a baja temperatura debería favorecer el efecto de hinchamiento del polímero y, a su vez, facilitar la difusión de las moléculas activas en el polímero. Bonavoglia y col. [120] y Kishimoto y col. [119] ya describen de una mayor capacidad de absorción e hinchamiento de CO₂ de los polímeros a bajas temperaturas. Esto indica que en procesos SM a mayor presión, el efecto más importante es la difusividad del soluto y la plasticidad del polímero producido a temperaturas más bajas, y la menor solubilidad del soluto en el solvente se vuelve poco relevante. Por lo tanto, en los procesos SM que se ejecutan entre 20 y 40 MPa, la temperatura debe mantenerse a niveles más bajos para favorecer la difusión del soluto y su afinidad con el polímero.

El efecto de ambas variables, temperatura y presión, se puede observar en el diagrama de Pareto para las cargas de impregnación (Fig. 25) y en los datos de ANOVA del estudio estadístico (Tabla 22). En este caso, los efectos lineales y cuadráticos de la presión y el efecto de interacción de la presión por la temperatura, tienen un valor de P menor que 0,05, lo que indica que son estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95 %. El diagrama de Pareto, así como los datos de la Tabla 22, indican el efecto negativo tanto de presiones más altas como de la combinación de valores presión y temperatura más altos.

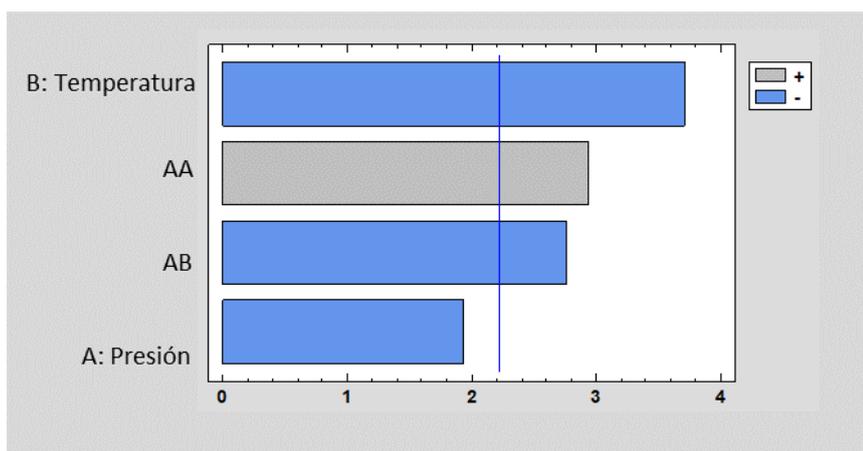


Figura 25

Diagrama de Pareto del proceso de impregnación BM.

Nota: A: efecto de la presión. B: efecto de la temperatura

Tabla 22

Tabla ANOVA del proceso de impregnación SM de piretrina en películas de PP

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Presión	0,0221	1	0,0221	13,77	0,0040
B: Temperatura	0,0060	1	0,0060	3,74	0,0819
AA	0,0138	1	0,0138	8,60	0,0150
AB	0,0122	1	0,0122	7,63	0,0201
Bloques	0,0018	1	0,0018	1,12	0,3139
Error total	0,0160	10	0,00160		
Total (corr.)	0,0720	15			

La relación entre la presión y la temperatura con respecto al rendimiento de extracción se puede expresar de acuerdo con la ecuación 6. El coeficiente de correlación es $R^2 = 77,70\%$.

$$I \text{ (mg / cm}^2\text{)} = 0,200625 - 0,006875 * P + 0,00029375 * P^2 - 0,0002475 * P * T. \quad (6)$$

La Figura 26 muestra el diagrama de superficie de respuesta estimada para el proceso de impregnación SM.

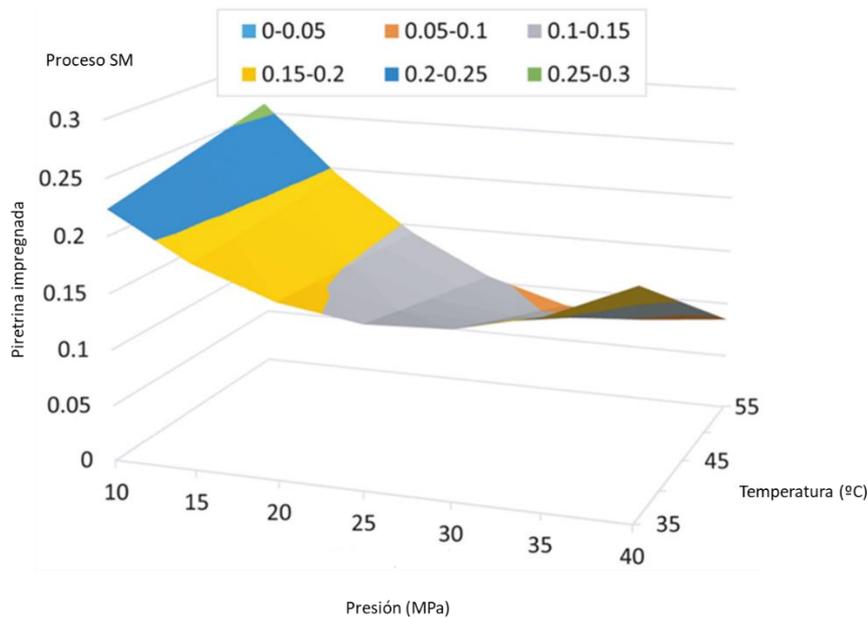


Figura 26

Gráfico de superficie de respuesta estimada

mg de piretrina impregnado / cm² frente a P, T en el proceso de impregnación de SM

Finalmente, de acuerdo con las cargas de impregnación obtenidas, parece claro que la mayor carga de extracto de piretrina impregnado se obtiene en el proceso BM (0,11–1,32 mg/cm²) frente al proceso SM (0,06–0,24 mg / cm²). En ambos casos, las condiciones de operación más favorables se establecieron en 10 MPa y 55 °C. Sin embargo, se obtuvieron resultados diferentes dependiendo de la temperatura. Mientras que a 35 °C no se observaron diferencias significativas entre los resultados de BM y SM (0,11-0,19 y 0,17-0,20 mg/cm² respectivamente), a 55 °C, se

pudo observar que BM (0,4-1,32 mg / cm²) obtuvieron cargas mayores que las obtenidas por SM (0,06-0,24 mg / cm²). Este comportamiento puede explicarse por el rápido proceso de descompresión realizado en el proceso BM. Cuando se produce esta descompresión, una gran parte de la piretrina queda atrapada en el polímero. En SM, el disolvente fluye continuamente a través del recipiente y una cantidad importante de extracto de piretrina se extrae del recipiente de impregnación. El proceso de descompresión se realiza después de un mayor tiempo de impregnación y el resultado es una menor carga de impregnación en SM vs BM. Esto indica que, para una menor solubilidad del soluto, la selección del modo de impregnación es esencial. Mientras que, por otro lado, cuando las condiciones operativas favorecen un nivel adecuado de solubilidad de la sustancia bioactiva en el disolvente, las cargas de impregnación resultantes no parecen verse afectadas por el método de impregnación utilizado, ya sea BM o SM.

Se debe tener en cuenta que la selección del modo de impregnación a aplicar no solo debe basarse en los resultados del proceso de impregnación, sino también en una serie de aspectos económicos y técnicos, particularmente en lo que respecta a la posibilidad de escalado del proceso a nivel industrial. En este sentido, el proceso BM presenta una gran cantidad de dificultades técnicas, como la necesidad de incorporar un dispositivo de agitación al sistema que plantearía algunos problemas en un equipo a escala industrial. Por otro lado, los procesos SM no presentan una gran dificultad técnica en el escalado. De hecho, la celda de disolución solo requeriría el tamaño suficiente para introducir la muestra activa, mientras que la celda de impregnación podría aumentarse de tamaño sin ninguna dificultad particular.

Por lo tanto, aunque generalmente se obtuvieron mayores cargas de impregnación del procedimiento BM, se deben tener en cuenta una serie de inconvenientes con respecto a su

escalamiento y particularmente la incorporación de un dispositivo de agitación. Por esta razón, los procesos SM parecen ser más adecuados para la impregnación de piretrinas en películas de PP. Sin embargo, una posibilidad es utilizar un sistema con recirculación en el que se incremente el valor de este parámetro. Cuando la recirculación tiende a infinito, el modelo tiende a un tanque agitado, aunque los costos de operación se incrementan cuando es necesario aumentar el trabajo del equipo de bombeo de fluidos.

5.2.2 Impregnación con un extracto natural de piretrina

Considerando los resultados obtenidos en el apartado anterior de impregnación del extracto comercial en PP por los dos métodos de impregnación (BM y SM), en el presente apartado se analizan los resultados de las impregnaciones realizadas con el extracto obtenido en el proceso de extracción supercrítica. El extracto seleccionado para estas pruebas ha sido el obtenido a partir de la variedad *Atlantis*, realizando la extracción a 55°C y 10 MPa de presión. Las pruebas se realizaron usando el método discontinuo, que es el que mejores resultados presenta con el extracto comercial, analizando el efecto de la (10 MPa y 40MPa). La temperatura de impregnación (55 °C), y el tiempo de impregnación (5 h) se mantuvieron constantes. Los resultados se muestran en la Figura 27. En esta figura se incluyen además los resultados obtenidos a las mismas condiciones en el proceso de impregnación del extracto comercial en plásticos de PP utilizando un sistema de impregnación en discontinuo (BM).

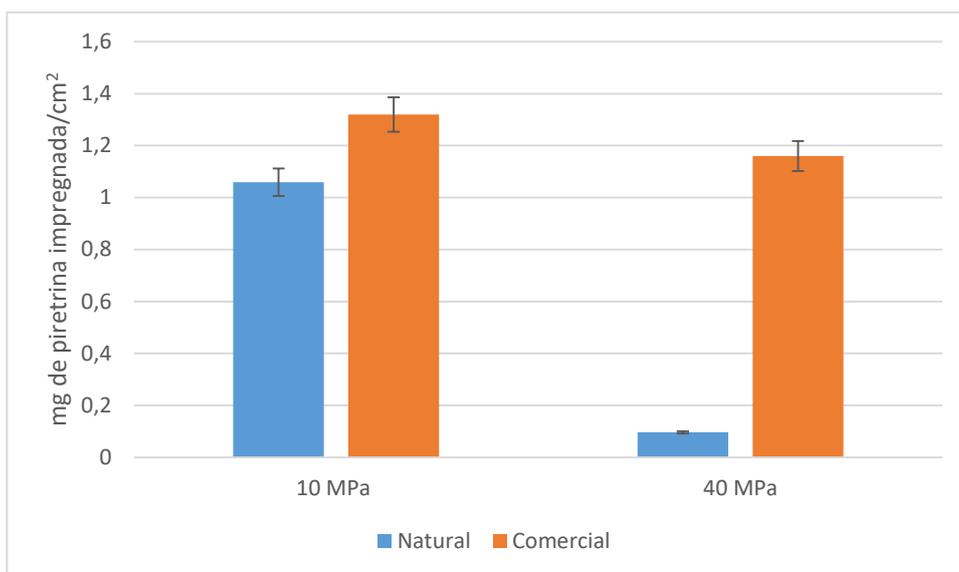


Figura 27

Estudio de la carga de impregnación del extracto natural y del comercial de piretrina por BM

Impregnación a 55 °C, durante 5 h.

De manera similar a la impregnación del plástico con el extracto comercial por el método BM, las mayores cargas de impregnación se obtuvieron al trabajar a 10 MPa. Al aumentar la presión (40 MPa), las cargas de impregnación fueron menores, confirmando lo encontrado en los ensayos realizados con el extracto comercial, que indican que la afinidad de la piretrina hacia el CO₂ en estado supercrítico llega a ser más alta que hacia el polímero al aumentar la presión.

Se puede concluir que a 10 MPa se favorece el equilibrio del proceso de impregnación hacia el polímero y no hacia la fase supercrítica, aumentando la carga de piretrina en el polímero.

Es importante destacar que, en el caso del extracto obtenido por extracción supercrítica, la disminución del rendimiento al pasar a 40 MPa es mucho más acusada. El resultado obtenido a 40 MPa con el extracto natural presenta un rendimiento de extracción significativamente inferior al obtenido a 10 MPa, en comparación con las pruebas realizadas con el extracto comercial. Además, los resultados obtenidos a la misma presión, pero con diferente extracto muestran un menor rendimiento del proceso de impregnación cuando se trabaja con el extracto obtenido mediante extracción supercrítica. Este diferente comportamiento se puede atribuir a que el extracto comercial, obtenido por técnicas convencionales, y el extracto natural, obtenido por extracción supercrítica, presentan composiciones diferentes. El proceso de extracción supercrítica es un proceso más selectivo y la pureza del producto obtenido será diferente a la del extracto comercial. El resultado es un diferente comportamiento en el proceso de impregnación redundando en una menor impregnación cuando se trabaja a 40 MPa. A esta presión, el extracto natural tendrá una solubilidad diferente en dióxido de carbono supercrítico a la que tendrían el extracto comercial, desplazando el equilibrio hacia la fase disolvente favoreciendo el proceso de desorción del extracto del polímero. El hecho de que el extracto natural se haya obtenido a 10 MPa, hace que cuando se trabaje a 40 MPa en el proceso de impregnación, la solubilidad de las sustancias aumente significativamente, y por tanto el proceso de impregnación se vea desfavorecido. Parece obvio concluir que para que el proceso a 40 MPa incrementara su rendimiento, el extracto que debería haberse utilizado era el obtenido a esa misma presión, para que las sustancias extraídas tuvieran la solubilidad en dióxido de carbono adecuada a la presión de trabajo del proceso de impregnación.

5.3 Perspectivas futuras

En el desarrollo de esta investigación se han observado algunos aspectos que podrían dar continuidad al presente trabajo y que estarían orientados a optimizar los procesos de extracción de la piretrina y su impregnación en el plástico. En concreto, basados en los resultados obtenidos en este trabajo y conociendo las mejores condiciones de extracción e impregnación del extracto natural, en trabajos futuros sería de interés analizar la integración del proceso de extracción y el de impregnación. Se podría realizar un montaje de una planta de extracción, que esté conectada en línea con el reactor de impregnación. De esta forma se minimizaría el consumo de disolvente, mejorando el rendimiento económico del proceso global.

Teniendo en cuenta las diferentes publicaciones sobre la estabilidad de los extractos de piretrina, así como los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, resulta de interés analizar el proceso de impregnación, pero en vez de utilizar el extracto de piretrina, emplear derivados de la piretrina, con el fin de comparar los porcentajes de impregnación obtenidos con este tipo de productos y el extracto de piretrina natural.

Otro aspecto interesante a analizar en futuros trabajos, se plantea con la funcionalización de plásticos biodegradables, aprovechando la metodología empleada para la impregnación de polímeros isotácticos. Los métodos empleados en nuestro laboratorio permitieron realizar impregnaciones a bajas temperaturas; condición que se espera poder aprovechar en la impregnación de otro tipo de plásticos que no sean estables a altas temperaturas.

Dado que los resultados de la impregnación del PP fueron muy positivos, se espera poder hacer impregnaciones en este mismo polímero, empleando otro tipo de compuestos de interés agroindustrial, con el fin de disminuir el uso de plaguicidas en la agricultura. Así mismo, sería de interés analizar la impregnación sobre soportes poliméricos con nutrientes orgánicos con bajo efecto residual, que posteriormente serán liberados lentamente sobre el suelo, con el fin de favorecer las condiciones de los cultivos.

6 Conclusiones

La discusión de los resultados experimentales del proceso de extracción e impregnación de piretrinas permite redactar las siguientes conclusiones:

6.1 Con respecto a los resultados de extracción

La extracción con dióxido de carbono supercrítico, ha mostrado ser una técnica efectiva para la extracción de piretrinas de las flores de crisantemo.

A una menor presión se obtienen los mejores rendimientos del proceso de extracción de piretrinas, en todas las variedades de crisantemo analizadas.

Al comparar los rendimientos de extracción obtenidos de las flores de crisantemo, se observa que los resultados se comportan de manera similar en las dos condiciones analizadas.

No se observaron diferencias significativas entre las variedades analizadas en el rendimiento de extracción, obteniéndose un mayor rendimiento en el caso de la extracción de la muestra de crisantemo blanca (Atlantis).

Teniendo en cuenta el rango de presiones y temperaturas analizados, las condiciones de extracción más efectiva son a 10 MPa de presión y 35 °C de temperatura, con una muestra seca.

A una menor presión se obtienen mejores porcentajes de rendimiento de extracción del extracto de piretrinas, en todas las variedades de crisantemo analizadas

6.2 Con respecto a los resultados de impregnación con un extracto comercial de piretrinas

La impregnación con disolvente supercrítico ha demostrado ser una técnica con muy buenos resultados, para la incorporación de una sustancia bioactiva en una matriz de polímero.

Los dos modos analizados, BM y SM, produjeron cargas de impregnación satisfactorias, siendo mayores las obtenidas en el método BM a 55 °C. Entre los dos modos de impregnación (BM y SM) no se observaron diferencias significativas a 35 °C de temperatura.

El tiempo del proceso tiene efecto sobre la carga de impregnación del proceso en BM, de tal manera que, a mayor tiempo, menor cantidad de impregnación.

Se ha encontrado que el proceso de impregnación tiene buenos resultados con menores cantidades de extracto, lo que permite optimizar los procesos de impregnación a escala industrial.

Se ha observado un efecto favorable de la temperatura en la impregnación de piretrinas en el polímero. Así, el aumento de la temperatura produce cambios en las propiedades del PP, cambiando la movilidad y permitiendo una buena difusión del extracto de piretrinas en el plástico.

En cuanto al efecto de la presión, los mejores resultados se obtuvieron a 10 MPa. Sin embargo, una vez superada esta presión, se detectó un aumento de la carga de impregnación con la presión en prácticamente todos los casos.

La cinética de impregnación del proceso SM se analizó incorporando dos cantidades diferentes de la sustancia activa en el primer recipiente. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencia significativa cuando se agregan 1,0 o 2,0 ml de extracto de piretrina al primer recipiente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el laboratorio, las mejores cargas del extracto para los métodos BM y SM, se obtienen en las primeras horas del proceso, no siendo necesario largos periodos de impregnación.

En cuanto a la temperatura se observó un aumento apreciable en la carga de impregnación cuando se aumenta desde 35 °C hasta 55 °C y se trabaja a bajas presiones (10 MPa).

El aumento de la presión conduce a un aumento de la carga de extracto en condiciones isotérmicas debido al aumento de la solubilidad del extracto, de la difusión del CO₂ y del hinchamiento del polímero, sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron.

La solubilidad del extracto aumenta significativamente con la presión. En ese caso, trabajar a baja presión debería mejorar la partición del extracto a favor de la fase polimérica.

Las mayores cargas de impregnación se obtuvieron al trabajar específicamente a 10 MPa y 55 °C. Sin embargo, al igual de lo que sucedió en los procesos de BM, a medida que la presión superó los 10 MPa, las cargas de impregnación fueron menores.

6.3 Con respecto a los resultados de impregnación con un extracto obtenido mediante extracción supercrítica

Los resultados de impregnación del PP con el extracto de piretrina comercial y el extracto obtenido en el laboratorio, presentan un comportamiento similar en el proceso de impregnación.

Las mayores cargas de impregnación se obtuvieron al trabajar a 10 MPa y al aumentar la presión a 40 MPa, las cargas de impregnación fueron menores.

Los resultados obtenidos de impregnación del extracto obtenido por tecnología supercrítica, en relación a la impregnación del extracto comercial, son significativamente menores, atribuyendo este comportamiento a la diferente composición que tienen ambos extractos y a la diferente solubilidad en el dióxido de carbonos supercrítico.

7 Bibliografía

- [1] V. Ghormade, M. V. Deshpande, K.M. Paknikar, Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.007>.
- [2] M.G. Mogul, H. Akin, N. Hasirci, D.J. Trantolo, J.D. Gresser, D.L. Wise, Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management, in: *Resour. Conserv. Recycl.*, 1996: pp. 289–320. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0921-3449(95)00063-1).
- [3] J.M. Bollag, C.J. Myers, R.D. Minard, Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter, *Sci. Total Environ.* 123–124 (1992) 205–217. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90146-J](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90146-J).
- [4] B. Perlatti, P.L. de Souza Bergo, M.F. das G. Fernandes da Silva, J. Batista, M. Rossi, Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals, in: *Insectic. - Dev. Safer More Eff. Technol.*, 2013. <https://doi.org/10.5772/53355>.
- [5] C. Wilson, C. Tisdell, Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs, *Ecol. Econ.* 39 (2001) 449–462. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5).
- [6] R. Nair, S.H. Varghese, B.G. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida, D.S. Kumar, Nanoparticulate material delivery to plants, *Plant Sci.* 179 (2010) 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>.
- [7] C. Zhuang, C. Shi, F. Tao, Y. Cui, Honeycomb structural composite polymer network of gelatin and functional cellulose ester for controlled release of omeprazole, *Int. J. Biol.*

- Macromol. 105 (2017) 1644–1653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.019>.
- [8] E.V.R. Campos, J.L. de Oliveira, L.F. Fraceto, Applications of Controlled Release Systems for Fungicides, Herbicides, Acaricides, Nutrients, and Plant Growth Hormones: A Review, *Adv. Sci. Eng. Med.* 6 (2014) 373–387. <https://doi.org/10.1166/ase.2014.1538>.
- [9] X. Ma, C. Gao, Uptake and accumulation of engineered nanomaterials and their phytotoxicity to agricultural crops, in: *Nanotechnologies Food Agric.*, 2015: pp. 321–342. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14024-7_14.
- [10] S. Mishra, H.B. Singh, Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 1097–1107. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6296-0>.
- [11] K. Bramhanwade, S. Shende, S. Bonde, A. Gade, M. Rai, Fungicidal activity of Cu nanoparticles against *Fusarium* causing crop diseases, *Environ. Chem. Lett.* 14 (2016) 229–235. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0543-1>.
- [12] T. Takei, M. Yoshida, Y. Hatate, K. Shiomori, S. Kiyoyama, Preparation of polylactide/poly(ϵ -caprolactone) microspheres enclosing acetamiprid and evaluation of release behavior, *Polym. Bull.* 61 (2008) 391–397. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0957-z>.
- [13] M. Kah, S. Beulke, K. Tiede, T. Hofmann, Nanopesticides: State of knowledge, environmental fate, and exposure modeling, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43 (2013) 1823–1867. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750>.
- [14] W.E. Rudzinski, A.M. Dave, U.H. Vaishnav, S.G. Kumbar, A.R. Kulkarni, T.M. Aminabhavi, Hydrogels as controlled release devices in agriculture, *Des. Monomers*

- Polym. 5 (2002) 39–65. <https://doi.org/10.1163/156855502760151580>.
- [15] J.T. Koberstein, Molecular design of functional polymer surfaces, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 42 (2004) 2942–2956. <https://doi.org/10.1002/polb.20157>.
- [16] Y. Chen, H.N. Teng, Functionalizing ps microspheres by supercritical deposition of P(S-b-tBA) for diverse interfacial properties exemplified with biocidal ability, *Chinese J. Polym. Sci. (English Ed.)* 30 (2012) 451–459. <https://doi.org/10.1007/s10118-012-1136-0>.
- [17] S. Sharma, S. Barkauskaite, A.K. Jaiswal, S. Jaiswal, Essential oils as additives in active food packaging, *Food Chem.* 343 (2021) 128403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>.
- [18] N. Zhao, S. Liu, Thermoplastic semi-IPN of polypropylene (PP) and polymeric N-halamine for efficient and durable antibacterial activity, *Eur. Polym. J.* 47 (2011) 1654–1663. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.05.017>.
- [19] Y. Chen, Q. He, G. Ren, C. Feng, N. Li, H. Yu, Q. Han, Preparation of biocidal 4-ethyl-4-(hydroxymethyl)oxazolidin-2-one-based N-halamine polysiloxane for impregnation of polypropylene in supercritical CO₂, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (2018). <https://doi.org/10.1002/app.46624>.
- [20] C.H. Tsou, C.S. Wu, W.S. Hung, M.R. De Guzman, C. Gao, R.Y. Wang, J. Chen, N. Wan, Y.J. Peng, M.C. Suen, Rendering polypropylene biocomposites antibacterial through modification with oyster shell powder, *Polymer (Guildf.)* 160 (2019) 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.11.048>.
- [21] J. Jin, J. Ma, L. Song, W. Jiang, T. Ederth, Fabrication of a polypropylene immunoassay platform by photografting reaction, *Mater. Sci. Eng. C.* 102 (2019) 492–501.

- <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.082>.
- [22] Ž. Knez, M. Pantić, D. Cör, Z. Novak, M. Knez Hrnčič, Are supercritical fluids solvents for the future?, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 141 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107532>.
- [23] M. Champeau, J.M. Thomassin, T. Tassaing, C. Jérôme, Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review, *J. Control. Release.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.002>.
- [24] G. Amanatidis, Chemicals and pesticides | Fact Sheets on the European Union | European Parliament, (n.d.). <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/en/sheet/78/los-productos-quimicos-y-los-plaguicidas>.
- [25] Comisión del Códex Alimentario-CCA, Manual de procedimiento. CAC/GL 63-2007, 2015. <http://www.fao.org/3/a-i4354s.pdf>.
- [26] OMS, The WHO recommended clasification of pesticides by hazard, 2020.
- [27] W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards, *Interdiscip. Toxicol.* 2 (2009) 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- [28] V.I. Lushchak, T.M. Matviishyn, V. V. Husak, J.M. Storey, K.B. Storey, Pesticide toxicity: A mechanistic approach, *EXCLI J.* 17 (2018) 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>.
- [29] R.A. Hamza, O.T. Iorhemen, J.H. Tay, Occurrence, impacts and removal of emerging substances of concern from wastewater, *Environ. Technol. Innov.* 5 (2016) 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.02.003>.
- [30] M.B. Isman, Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and

- an increasingly regulated world, *Annu. Rev. Entomol.* 51 (2006) 45–66.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>.
- [31] M. Chen, Y. Du, G. Zhu, G. Takamatsu, M. Ihara, K. Matsuda, B.S. Zhorov, K. Dong, Action of six pyrethrins purified from the botanical insecticide pyrethrum on cockroach sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 151 (2018) 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.05.002>.
- [32] B.L. Atkinson, A.J. Blackman, H. Faber, The Degradation of the Natural Pyrethrins in Crop Storage, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 280–287.
<https://doi.org/10.1021/jf0304425>.
- [33] L.G. Copping, S.O. Duke, Review Natural products that have been used commercially as crop protection agents, *Pest Manag. Sci.* 63 (2007) 524–554.
<https://doi.org/10.1002/ps.1378>.
- [34] O.C. E., O.C. O., U.C. S., O. U., J.P. S., U.A. E., View of Natural Pesticides (Biopesticides) and Uses in Pest Management- A Critical Review, *Asian J. Biotechnol. Genet. Eng.* 2 (2019) 2(3): 1-18.
<https://journalajbge.com/index.php/AJBGE/article/view/30063/56411>.
- [35] V. Andreu, Y. Picó, Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 772–789. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.008>.
- [36] M. Grdiša, K. Gršić, Botanical insecticides in plant protection, *Agric. Conspec. Sci.* (2013).
- [37] European Parliament, Directiva 2009/128/CE por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas, 2009.

- [38] OMS, FAO, Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas, 2014. <https://doi.org/13604S/1/12.14>.
- [39] Reglamento (CE) 396/2005: relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, 2005. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=ES>.
- [40] FAO, OMS, CODEX, Maximun Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL 2-2015, (2015) 22.
- [41] AMIS Market Monitor, Market Monitor, AMIS, 83 (2020) 17.
- [42] ONU, Creciendo a un ritmo menor, se espera que la población mundial alcanzará 9.700 millones en 2050 y un máximo de casi 11.000 millones alrededor de 2100: Informe de la ONU, *Perspect. La Población Mund.* 2019. 1 (2019) 1–4. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_PressRelease_ES.pdf.
- [43] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division: World Population Prospects 2019, Volume II: Demographic Profiles, II (2019) 1–5. https://population.un.org/wpp/Graphs/1_Demographic Profiles/World.pdf.
- [44] Real Decreto 1054 / 2002 , de 11 de octubre , por el que se regula el proceso de evaluación para el registro , autorización y comercialización de biocidas., 2013. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2002/BOE-A-2002-19923-consolidado.pdf>.
- [45] A.L. Andrady, M.A. Neal, Applications and societal benefits of plastics, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364 (2009) 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>.
- [46] K.M. Cantor, P. Watts, *Plastics Materials*, Elsevier, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3514-7.10001-7>.

- [47] P. Europe, EPRO, Plastics - the Facts 2019, (2019).
<https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>.
- [48] S.Z. Ilić, L. Milenković, A. Dimitrijević, L. Stanojević, D. Cvetković, Kevrešan, E. Fallik, J. Mastilović, Light modification by color nets improve quality of lettuce from summer production, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 226 (2017) 389–397.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.009>.
- [49] S. Castellano, G. Scarascia Mugnozza, G. Russo, D. Briassoulis, A. Mistriotis, S. Hemming, D. Waaijenberg, Plastic Nets in Agriculture: A General Review of Types and Applications, *Appl. Eng. Agric.* 24 (2008) 799–808.
<https://doi.org/10.13031/2013.25368>.
- [50] M. Gahleitner, C. Paulik, Polypropylene and Other Polyolefins, in: *Brydson's Plast. Mater.* Eighth Ed., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00011-6>.
- [51] G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai, Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives, *J. Polym. Environ.* 19 (2011) 637–676.
<https://doi.org/10.1007/s10924-011-0317-1>.
- [52] Y. Cao, L. Huang, J. Chen, J. Liang, S. Long, Y. Lu, Development of a controlled release formulation based on a starch matrix system, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 108–116.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.005>.
- [53] B. Singh, D.K. Sharma, A. Gupta, In vitro release dynamics of thiram fungicide from starch and poly(methacrylic acid)-based hydrogels, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.024>.
- [54] B. Singh, D.K. Sharma, R. Kumar, A. Gupta, Development of a new controlled pesticide delivery system based on neem leaf powder, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 290–299.

- <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.031>.
- [55] R. Grillo, A. do E.S. Pereira, N.F.S. de Melo, R.M. Porto, L.O. Feitosa, P.S. Tonello, N.L.D. Filho, A.H. Rosa, R. Lima, L.F. Fraceto, Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.044>.
- [56] K. Lewicka, P. Dobrzynski, P. Rychter, Environment-Friendly , Controlled Release Systems of Agrochemicals, (2020) 1–24.
- [57] S. Dubey, V. Jhelum, P.K. Patanjali, Controlled release agrochemicals formulations: A review, *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 70 (2011) 105–112.
- [58] S. Marre, Y. Roig, C. Aymonier, Supercritical microfluidics: Opportunities in flow-through chemistry and materials science, *J. Supercrit. Fluids.* 66 (2012) 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.11.029>.
- [59] I. M. Al-fagih, F. K. Alanazi, G. A. Hutcheon, I. Y. Saleem, Recent Advances Using Supercritical Fluid Techniques for Pulmonary Administration of Macromolecules via Dry Powder Formulations, *Drug Deliv. Lett.* (2012). <https://doi.org/10.2174/2210303111101020128>.
- [60] E.J. Beckman, Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, *J. Supercrit. Fluids.* 28 (2004) 121–191. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(03)00029-9).
- [61] T. Yasuji, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.025>.
- [62] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of

- bioactive compounds, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 40–51.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.
- [63] Y. Joshi, SEMINAR REPORT ON SUPERCRITICAL FLUIDS AND ITS APPLICATIONS Submitted by : Yash Joshi Guided By : Priya Saxena, (2015).
- [64] A. Taberero, E.M. Martín del Valle, M.A. Galán, Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 60 (2012) 9–25.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.06.004>.
- [65] N. Budisa, D. Schulze-Makuch, Supercritical carbon dioxide and its potential as a life-sustaining solvent in a planetary environment, *Life.* 4 (2014) 331–340.
<https://doi.org/10.3390/life4030331>.
- [66] L. Vázquez, C.F. Torres, T. Fornari, N. Grigelmo, F.J. Señoráns, G. Reglero, Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 659–665.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200600035>.
- [67] S.F. Bruno, F.J.A.A. Ekorong, S.S. Karkal, M.S.B. Cathrine, T.G. Kudre, Green and innovative techniques for recovery of valuable compounds from seafood by-products and discards: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 85 (2019) 10–22.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.004>.
- [68] H. Sovová, Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times, *J. Supercrit. Fluids.* 66 (2012) 73–79.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.11.004>.
- [69] E. Aionicesei, M. Škerget, Ž. Knez, Measurement of CO₂ solubility and diffusivity in

- poly(l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) by magnetic suspension balance, *J. Supercrit. Fluids*. 47 (2008) 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.07.011>.
- [70] I. Kikic, F. Vecchione, Supercritical impregnation of polymers, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2003.09.001>.
- [71] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives, *Food Bioprocess Technol.* (2010). <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>.
- [72] M. Cvjetko Bubalo, S. Vidović, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, *Food Bioprod. Process.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.
- [73] N.R. Putra, L.N. Yian, H.M. Nasir, Z. Binti Idham, M.A.C. Yunus, Effects of process parameters on peanut skins extract and CO₂ diffusivity by supercritical fluid extraction, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 334 (2018). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/334/1/012057>.
- [74] T.M. Fahmy, D.M. Johnson, M.P. McNally, T.M. Fahmy, M.E. Paulaitis, Modifier Effects in the Supercritical Fluid Extraction of Solutes from Clay, Soil, and Plant Materials, *Anal. Chem.* (1993). <https://doi.org/10.1021/ac00058a026>.
- [75] M.M.R. De Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *J. Supercrit. Fluids.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>.
- [76] K.C. Pitchaiah, C.V.S.B. Rao, N. Sivaraman, M. Joseph, G. Madras, I. Brondz, Solubility of dialkylalkyl phosphonates in supercritical carbon dioxide: Experimental and modeling approach, *Fluid Phase Equilib.* (2017).

- <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.12.011>.
- [77] L. Casas, C. Mantell, M. Rodríguez, A. Torres, F.A. Macías, E.J.M. de la Ossa, SFE kinetics of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L, *J. Sep. Sci.* (2009). <https://doi.org/10.1002/jssc.200800663>.
- [78] S. Quispe-Condori, D. Sánchez, M.A. Foglio, P.T.V. Rosa, C. Zetzl, G. Brunner, M.A.A. Meireles, Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 36 (2005) 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.03.003>.
- [79] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *J. Chromatogr. A.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.021>.
- [80] N. Jeran, M. Grdiša, F. Varga, Z. Šatović, Z. Liber, D. Dabić, M. Biošić, Pyrethrin from Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./Sch. Bip.): biosynthesis, biological activity, methods of extraction and determination, *Phytochem. Rev.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09724-2>.
- [81] W.B. Otterbach A, Ultrasonisoxhlet-supercritical extraction Otterbach1999.pdf, (1999).
- [82] H.K. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J.S. Condoret, Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 26 (2003) 193–200. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00165-1).
- [83] D. Ban, B. Sladonja, M. Lukić, I. Lukić, V. Lušetić, K.K. Ganić, D. Žnidarčič, Comparison of pyrethrins extraction methods efficiencies, *African J. Biotechnol.* 9 (2010) 2702–2708. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i18>.
- [84] A. Nagar, A. Chatterjee, L. Ur Rehman, A. Ahmad, S. Tandon, Comparative extraction

- and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Ind. Crops Prod.* 76 (2015) 955–960. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.043>.
- [85] D. Kasaj, A. Rieder, L. Krenn, B. Kopp, Separation and quantitative analysis of natural pyrethrins by high- performance liquid chromatography, *Chromatographia.* 50 (1999) 607–610. <https://doi.org/10.1007/BF02493668>.
- [86] W.H.T. Pan, C.C. Chang, T.T. Su, F. Lee, M.R.S. Fuh, Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower, *Talanta.* (1995). [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01657-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01657-0).
- [87] B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, S. Laconi, D. Deidda, A. Maxia, Chemical and biological comparisons on supercritical extracts of *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir) Sch. Bip. with three related species of chrysanthemums of Sardinia (Italy), *Nat. Prod. Res.* 23 (2009) 190–199. <https://doi.org/10.1080/14786410801946221>.
- [88] M. Gallo, A. Formato, D. Ianniello, A. Andolfi, E. Conte, M. Ciaravolo, V. Varchetta, D. Naviglio, Supercritical fluid extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariifolium*) compared to traditional maceration and cyclic pressurization extraction, *J. Supercrit. Fluids.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.012>.
- [89] L. Baldino, G. Della Porta, E. Reverchon, Supercritical CO₂ processing strategies for pyrethrins selective extraction, *J. CO₂ Util.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.04.012>.
- [90] C.M. Dolinsek JA, Kovac M, Zel J, Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) from The Northern Adriatic as a Potential Source of Natural Insecticide, *Ann. Ser. Hist. Nat.* 17 (2007) 39–46.

- [91] H. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, Supercritical carbon dioxide processing of pyrethrum oleoresin and pale, *J. Agric. Food Chem.* (2003). <https://doi.org/10.1021/jf025998r>.
- [92] M.E.M. Braga, M.T.V. Pato, H.S.R.C. Silva, E.I. Ferreira, M.H. Gil, C.M.M. Duarte, H.C. de Sousa, Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives, *J. Supercrit. Fluids.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.10.002>.
- [93] S. Varona, S. Rodríguez-Rojo, Á. Martín, M.J. Cocero, C.M.M. Duarte, Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch, *J. Supercrit. Fluids.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.06.003>.
- [94] A. Torres, J. Romero, A. Macan, A. Guarda, M.J. Galotto, Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging, *J. Supercrit. Fluids.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.10.011>.
- [95] A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, I.J. Seabra, P. Ferreira, M.H. Gil, H.C. De Sousa, Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.063>.
- [96] S. Milovanovic, D. Markovic, K. Aksentijevic, D.B. Stojanovic, J. Ivanovic, I. Zizovic, Application of cellulose acetate for controlled release of thymol, *Carbohydr. Polym.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.093>.
- [97] S. Milovanovic, I. Jankovic-Castvan, J. Ivanovic, I. Zizovic, Effect of starch xero- And aerogels preparation on the supercritical CO₂ impregnation of thymol, *Starch/Staerke.* (2015). <https://doi.org/10.1002/star.201400134>.
- [98] J. Ivanovic, S. Knauer, A. Fanovich, S. Milovanovic, M. Stamenic, P. Jaeger, I. Zizovic,

- R. Eggers, Supercritical CO₂ sorption kinetics and thymol impregnation of PCL and PCL-HA, *J. Supercrit. Fluids*. (2016). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.001>.
- [99] S. Grüner-Richter, F. Otto, E. Weidner, Impregnation of oil containing fruits, *J. Supercrit. Fluids*. (2012). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.030>.
- [100] S. Lucas, E. González, M.P. Calvo, C. Palencia, E. Alonso, M.J. Cocero, Supercritical CO₂ impregnation of Radiata pine with organic fungicides. Effect of operating conditions and two-parameters modeling, *J. Supercrit. Fluids*. (2007). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.08.003>.
- [101] M. V. Natu, M.H. Gil, H.C. de Sousa, Supercritical solvent impregnation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) and poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications, *J. Supercrit. Fluids*. (2008). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.05.006>.
- [102] Y. Wang, C. Yang, D. Tomasko, Confocal microscopy analysis of supercritical fluid impregnation of polypropylene, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2002). <https://doi.org/10.1021/ie010575k>.
- [103] Q. Lang, C.M. Wai, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review, *Talanta*. (2001). [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00557-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00557-9).
- [104] A.W. Kjellow, O. Henriksen, Supercritical wood impregnation, *J. Supercrit. Fluids*. 50 (2009) 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.06.013>.
- [105] E. Weidner, Impregnation via supercritical CO₂—What we know and what we need to know, *J. Supercrit. Fluids*. 134 (2018) 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.024>.
- [106] S. Milovanovic, G. Hollermann, C. Errenst, J. Pajnik, S. Frerich, S. Kroll, K. Rezwan, J.

- Ivanovic, Supercritical CO₂ impregnation of PLA/PCL films with natural substances for bacterial growth control in food packaging, *Food Res. Int.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.065>.
- [107] H. Zhou, J. Fang, J. Yang, X. Xie, Effect of the supercritical CO₂ on surface structure of PMMA/PS blend thin films, *J. Supercrit. Fluids.* 26 (2003) 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00155-9).
- [108] D.L. Tomasko, H. Li, D. Liu, X. Han, M.J. Wingert, L.J. Lee, K.W. Koelling, A Review of CO₂ Applications in the Processing of Polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2003). <https://doi.org/10.1021/ie030199z>.
- [109] M.L. Goñi, N.A. Gañán, S.E. Barbosa, M.C. Strumia, R.E. Martini, Supercritical CO₂-assisted impregnation of LDPE/sepiolite nanocomposite films with insecticidal terpene ketones: Impregnation yield, crystallinity and mechanical properties assessment, *J. Supercrit. Fluids.* 130 (2017) 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.013>.
- [110] G.R. Medeiros, S.R.S. Ferreira, B.A.M. Carciofi, High pressure carbon dioxide for impregnation of clove essential oil in LLDPE films, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 41 (2017) 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.03.008>.
- [111] P. Franco, L. Incarnato, I. De Marco, Supercritical CO₂ impregnation of α -tocopherol into PET/PP films for active packaging applications, *J. CO₂ Util.* 34 (2019) 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.06.012>.
- [112] S. Milovanovic, D. Markovic, J. Ivanovic, Added-value porous materials for controlled thymol release obtained by supercritical CO₂ impregnation process, *Cell. Polym.* 38 (2019) 153–166. <https://doi.org/10.1177/0262489319872329>.
- [113] M.L. Goñi, N.A. Gañán, J.M. Herrera, M.C. Strumia, A.E. Andreatta, R.E. Martini,

- Supercritical CO₂ of LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*), *J. Supercrit. Fluids.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.017>.
- [114] J. Pajnik, M. Stamenic, M. Radetić, S. Tomanovic, R. Sukara, D. Mihaljica, I. Zizovic, Impregnation of cotton fabric with pyrethrum extract in supercritical carbon dioxide, 128 (2017) 66–72.
- [115] J. Pajnik, M. Radetić, D.B. Stojanovic, I. Jankovic-Častvan, V. Tadic, M. V. Stanković, D.M. Jovanović, I. Zizovic, Functionalization of polypropylene, polyamide and cellulose acetate materials with pyrethrum extract as a natural repellent in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 136 (2018) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.02.014>.
- [116] C. Cejudo Bastante, L. Casas Cardoso, C. Mantell Serrano, E.J. Martínez de la Ossa, Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties, *J. Supercrit. Fluids.* 128 (2017) 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.034>.
- [117] J. Sanchez-Sanchez, M.T. Fernández-Ponce, L. Casas, C. Mantell, E.J.M. de la Ossa, Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 128 (2017) 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.033>.
- [118] M.T. Fernández-Ponce, E. Medina-Ruiz, L. Casas, C. Mantell, E.J. Martínez de la Ossa-Fernández, Development of cotton fabric impregnated with antioxidant mango polyphenols by means of supercritical fluids, *J. Supercrit. Fluids.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.022>.
- [119] Y. Kishimoto, R. Ishii, Differential scanning calorimetry of isotactic polypropene at high CO₂ pressures, *Polymer (Guildf).* (2000). <https://doi.org/10.1016/S0032->

3861(99)00698-9.

- [120] B. Bonavoglia, G. Storti, M. Morbidelli, Modeling of the sorption and swelling behavior of semicrystalline polymers in supercritical CO₂, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 1183–1200. <https://doi.org/10.1021/ie050842c>.
- [121] R.G. Wissinger, M.E. Paulaitis, Swelling and sorption in polymer–CO₂ mixtures at elevated pressures, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 25 (1987) 2497–2510. <https://doi.org/10.1002/polb.1987.090251206>.
- [122] C. Cejudo, Impregnación supercrítica de extractos naturales en la preservación de alimentos, (2019).