

A close-up photograph of a black and orange ladybug (Coccinellidae) on a green leaf. The ladybug is positioned on the leaf, which is adjacent to a dark, textured tree trunk. The background is blurred, showing green foliage and brown leaves. The text "BIOPLAGUICIDAS" is overlaid in the center of the image.

BIOPLAGUICIDAS

Julio A. Zygadlo

AUTORES.

Peschiutta, M.L.

Bióloga, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba (2008), Doctora en Cs. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2015). Trabajó en la Universidad de la Patagonia San Juan Bosco (Sede Comodoro Rivadavia) en el área de la Ecofisiología Vegetal especializándose en frutales (cerezos) y el impacto de la principal plaga de este frutal: la babosita del peral. Realizó trabajos de campo en Comodoro Rivadavia, Bahía Solano y Río Mayo (Chubut) y Los Antiguos (Santa Cruz) (2009-2015). Participó en varios proyectos de investigación relacionados con estudios ecofisiológicos (medición de potencial hídrico, fotosíntesis, flujo, crecimiento) sobre especies arbóreas, cultivos frutales y especies nativas patagónicas; de los cuales obtuvo varias publicaciones. Actualmente se desempeña como Becaria Postdoctoral en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET-CÓRDOBA) (2017), estudiando los efectos de la cochinilla harinosa (*Planococcus ficus*) en los viñedos y su control utilizando aceites esenciales de plantas comerciales. Su área actual de investigación es el desarrollo de bioplaguicidas para el control de plagas de la vid.

Zunino, M.P.

En 1996 obtiene el título de Bióloga y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el 2005, ambos en la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, realizando sus estudios en la bioactividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes. Actualmente se desempeña como Investigadora Adjunta en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Su tema de trabajo son los compuestos orgánicos volátiles su importancia en las interacciones entre artrópodos, microorganismos y granos en un sistema de almacenaje. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygadlo. Ha participado como integrante y ha dirigido proyectos de investigación.

Merlo, C.

En el año 2006 obtuvo el título de Bióloga en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el año 2013 en la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Es Investigadora Asistente en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), e investiga los compuestos volátiles bacterianos como semioquímicos e insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais*. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygadlo. Ha participado como integrante y director de proyectos de investigación. En el año 2009 inicio su actividad docente y actualmente se desempeña como Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Goñi, M.L.

Ingeniera en alimentos egresada de la Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina). Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, Argentina) en 2014. Ha trabajado en la UGhent (Bélgica) y en el INSA-Toulouse (Francia) en el marco del programa Erasmus Mundus. Desde 2015 trabaja en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) como becaria posdoctoral de CONICET. Su trabajo se centra en la impregnación supercrítica de polímeros y biopolímeros con compuestos activos naturales para obtener materiales activos aplicables en envasado de alimentos y como dispositivos de liberación controlada para la agroindustria.

Muratore, F.

Ingeniera química egresada en la Universidad Tecnológica Nacional (UTN, Facultad Regional Córdoba) en 2012. Desde 2015 realiza sus estudios de doctorado en Ciencias de la Ingeniería en la Universidad Nacional de Córdoba. Su proyecto de tesis involucra el desarrollo de papeles bioactivos por injerto de moléculas específicas en celulosa, en particular compuestos con actividad antimicrobiana e insecticida de origen natural.

Martini, R.E.

Investigadora Adjunta de CONICET y Profesora Adjunta de Termodinámica Química en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, Argentina) en 2007, realizando su tesis sobre el uso de fluidos cuasi y supercríticos en la separación de mezclas de polímeros y como medio de reacción para injerto de copolímeros. Realizó una estadía posdoctoral en la Universidad de Perugia (Italia) trabajando en procesamiento de polímeros nanocompuestos. Actualmente trabaja también en la modificación de polímeros comerciales con sustancias bioactivas por injerto químico e impregnación supercrítica.

Gañan, N.A.

Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, CONICET, Argentina) en 2014. Durante su tesis trabajó en la extracción y fraccionamiento de insecticidas naturales con fluidos supercríticos. Entre 2014 y 2016 fue becario posdoctoral de CONICET. Ha trabajado en la Universidad de Coimbra (Portugal) y en el Institut National des Sciences Appliquées (Toulouse, Francia) en el marco del programa Erasmus Mundus. Actualmente es Investigador Asistente de CONICET en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). Su proyecto de investigación involucra el estudio de tecnologías de fluidos supercríticos para el desarrollo de materiales activos.

Lopretti, M.

Su formación académica inicial se realizó en la Universidad de la República, Uruguay, en el año 1978 obtiene el título de Licenciada en Ciencias Biológicas (Bioquímica), en 1991 logra un Msc (Máster en Ciencias) y en 1999 concluye su formación doctoral, realizando sus estudios en la bioquímica de la degradación y depolimerización de la lignina. Su formación académica fue ampliada con una formación post-doctoral en la Universidad de Caxias do Sul (Brasil), Grenoble (Francia), LANOTEC (Costa Rica) y Braganza (Portugal). Participo como investigadora y gerencio el Laboratorio Tecnológico del Uruguay, también fue directora de proyectos internacionales como CYTED. Su area de trabajo es Biomasa como fuente de productos químicos y energía Valorización de biopolímeros (de origen vegetal, animal, microbiano) por medio de procesos bioquímicos y /o tecnológicos. Enzimología, Microencapsulación , radiotrazadores , irradiación a altas dosis y mutagénesis inducida. Consorcios de nuevos microorganismos extremófilo y sus enzimas libres o inmovilizadas por radiopolimerización y otros. Producción de nanopartículas a partir de biopolímeros. Realizo un gran numero de publicaciones científicas en revistas y es editora de libros en el tema. También ha participado en congresos y reuniones científicas nacionales e internacionales.

Lluber, G.

Es Química Farmacéutica y Bioquímica Clínica (2017) de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Su tarea se a desarrollado en el area de producción de compuestos bioactivos. Su labor profesional la ha desempeñado en diferentes empresas nacionales e internacionales del area de la salud y de la ingeniería química. Es docente en el Centro de Investigación Nuclear, Uruguay. A participado en reuniones científicas y ha escrito trabajos científicos.

Pizzolitto, R.P.

En el año 2005 obtiene el título de Microbióloga y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el año 2011, ambos en la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, realizando sus estudios en la prevención de micotoxicosis en la industria avícola por microorganismos bioeliminadores de toxinas fúngicas. Desde el año 2014 se desempeña como Investigadora Asistente en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), investigando los sesquiterpenos de *Fusarium verticillioides* y sus funciones en la interacción hongo-grano-insecto. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygado. Ha participado como integrante de proyectos de investigación y en la actualidad dirige el proyecto titulado: "Compuestos volátiles de granos y los sesquiterpenos de *Fusarium verticillioides*: sus funciones en la interacción hongo-grano-insecto".

Dambolena, J.S.

Licenciado en Química (2003), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Realizó su Tesis Doctoral en el estudio de monoterpenos para el control de *Fusarium verticillioides* y sus micotoxinas, obteniendo el Título de Doctor en Ciencias Biológicas en el año 2010. Se desempeña desde el año 2011 como Investigador Asistente en la Carrera de Investigador Científico de Conicet, investigando la participación de compuestos volátiles en la comunicación grano-insecto-hongo, y su potencial para el diseño un plaguicida de origen natural. En la actualidad dirige, el proyecto de denominado "Micovirus: una alternativa para el control biológico de *Fusarium verticillioides* y sus micotoxinas". Inició su actividad docente en el año 2004, ocupando el cargo de Profesor Asistente de la asignatura Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. En la actualidad se desempeña como profesor permanente en la Maestría de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, y como Profesor Ayudante Cat A en la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, ambos en la Universidad Nacional de Córdoba

Zygado, J.A.

Biólogo (1981) y Dr. en Cs. Biológicas (1989) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Profesor Titular de Química Orgánica y de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Investigador Principal del CONICET. Los aceites esenciales y/o sus componentes son su área de investigación con énfasis sobre el desarrollo de bioplaguicidas. Los resultados de su trabajo se ven reflejados en ciento ochenta artículos publicados en revistas nacionales e internacionales y en trece capítulos de libros. Su labor fue premiada en once oportunidades por diferentes organizaciones. Trece alumnos han obtenido su título de postgrado, maestrías o doctorados, bajo su dirección. Él es editor asociado y revisor externo de algunas revistas científicas internacionales. Su labor ha sido subsidiada por organismos privados, estatales, nacionales e internacionales.

Índice.

7- 28.- LA COCHINILLA HARINOSA DE LA VID: ¿CÓMO CONTROLAR UNA PLAGA DE GRAN IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL?. PESCHIUTTA, María Laura

29 - 59.- ACEITES ESENCIALES COMO BIOPLAGUICIDAS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM*. EVALUACIÓN DE METODOS, ANALISIS DE ESTRUCTURA ACTIVIDAD. ZUNINO, María Paula.

60 - 70.- USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL PARA LA PRESERVACIÓN DE SILOS. MERLO, Carolina.

71 - 84.- FORMULACIONES DE LIBERACIÓN GRADUAL DE BIOPLAGUICIDAS. INCORPORACIÓN EN MATERIALES POLIMÉRICOS MEDIANTE IMPREGNACIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO. GOÑI, María L. ; MURATORE, Florencia ; MARTINI, Raquel E.; GAÑAN, Nicolás A.

85 - 107.- BIOMASA Y BIOPLAGUICIDAS. LOPRETTI, Mary; LLUBERAS, Gabriela.

108 - 123.- BIOPLAGUICIDAS. USO, EFICACIA, REGULACION Y MERCADO. PIZZOLITTO, Romina P.; DAMBOLENA, José S.; ZYGADLO, Julio A.

Prologo.

El crecimiento global y continuo de la población humana demanda un incremento permanente en la producción de alimentos. Esta situación se torna crítica en diferentes regiones del mundo, donde la producción agropecuaria se incrementa sobre la destrucción del ambiente, lo cual lleva a la contaminación del suelo, del agua además de una pérdida importante en la biodiversidad. Esta situación se ve agravada cuando el alimento almacenado para su comercialización y/o industrialización, también sufre un fuerte deterioro por la actividad de diferentes organismos, antes de llegar al consumidor. Existen varias plagas que afectan los alimentos a lo largo de su cadena de producción, ellos incluyen microorganismos, insectos, mamíferos, ácaros y nematodos. Esta situación se vuelve aun más complicada cuando se encuentran las micotoxinas producidas por hongos que deterioran el alimento y que en muchas ocasiones son diseminadas por la actividad de insectos o mamíferos. Con la llegada de los plaguicidas de origen sintético que mostraron una gran capacidad de toxicidad sobre las plagas, gran parte de estos problemas fueron resueltos. De cualquier manera, en los últimos años se ha desarrollado una fuerte presión por parte de los consumidores sobre las empresas productoras de estos compuestos, como también sobre los diferentes gobiernos y agricultores para que dejen de utilizar estos productos o al menos reducir en gran medida su aplicación. Esta presión surge asociada a la contaminación ambiental, al surgimiento de resistencia en la mayoría de las plagas (lo que llevo a un incremento en la aplicación de estas sustancias tóxicas para lograr los mismos resultados que se producían antes) y a enfermedades en la población que se las relaciona muchas veces con estos productos sintéticos presentes en los alimentos o en el agua. Esto ha conducido a un renovado interés en plaguicidas de origen natural, ya sean microbianos, obtenidos desde las plantas o de los animales, como aquellos que pueden surgir de las interacciones entre los organismos, feromonas ó semioquímicos. Estos nuevos compuestos biodegradables y sin la capacidad de dejar residuos tóxicos permiten una opción eco-químicamente amigable con el ambiente y el hombre. El uso de plantas o sus metabolitos para el control de diferentes plagas es una practica antigua en diferentes culturas, como la de India o China.

El presente libro esta enfocado desde el estado actual de los bio-plaguicidas y su proyección futura, este contiene diferentes temas con aportes relevantes y prácticos bajo la consigna de bio-plaguicidas. El primer capítulo abarca desde el ciclo biológico hasta métodos de control de la cochinilla harinosa una plaga de gran importancia en los cultivos de vid en Córdoba. El segundo tiene como objetivos una visión crítica de los diferentes métodos de bioensayos y estrategias de control para una plaga secundaria que afecta alimentos almacenados. Las bacterias como una estrategia para la protección del ensilaje es el tema del tercer capítulo. El cuarto y quinto capítulo son tecnológicos, sobre diferentes aspectos de transportar los bioplaguicidas para su uso en la cadena alimenticia. Por último, el sexto

capítulo hace un resumen de los bioplaguicidas y del nuevo mercado que ellos representan para el control de plagas en una estructura socio-económica global que no acepta los compuestos sintéticos.

Los autores también quieren expresar su agradecimiento a los siguientes organismos, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT 2012-2146 - Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica -Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED-BIORRECER) por la ayuda financiera otorgada para lograr la publicación de este libro.

Julio A. Zygodlo.

**LA COCHINILLA HARINOSA DE LA VID: ¿CÓMO CONTROLAR UNA PLAGA DE GRAN
IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL?.**

Formulaciones de liberación gradual de bioplaguicidas – Incorporación en materiales poliméricos mediante impregnación con CO₂ supercrítico

María L. Goñi, Florencia Muratore, Raquel E. Martini, Nicolás A. Gañán

IDTQ – Grupo Vinculado, PLAPIQUI-UNS-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba,
Av. Velez Sarsfield 1611, X5016GCA, Córdoba, Argentina.

1. Formulaciones para liberación de bioplaguicidas

1.1. Aspectos generales:

Numerosos compuestos terpénicos de origen botánico han sido propuestos y estudiados como bioplaguicidas de gran potencial en el marco de sistemas de manejo de plagas sostenibles y ambientalmente amigables. Esta tendencia se ve estimulada por regulaciones cada vez más restrictivas respecto del uso de plaguicidas sintéticos y por la percepción, por parte de los usuarios y consumidores, de los riesgos ambientales y sanitarios asociados a su uso [1–4]. La síntesis y liberación de terpenos volátiles constituyen un mecanismo natural de defensa de numerosas plantas, de gran selectividad hacia diferentes especies de insectos, gusanos, hongos y malezas. Como se trata de compuestos biodegradables y de baja toxicidad en mamíferos, aves y peces, se los considera generalmente como plaguicidas de “bajo riesgo” [5].

No obstante, a pesar de la abundante información generada en las últimas décadas con respecto a la bioactividad y letalidad de numerosos terpenos, muy pocos compuestos han sido aplicados exitosamente a escala comercial. En gran medida esto se debe a que el uso efectivo de los terpenos (o de sus mezclas naturales conocidas como “aceites esenciales”) como biopesticidas tiene que superar una serie de limitaciones. Como se trata de sustancias volátiles, tienen gran potencial como agentes fumigantes, pero por la misma razón su actividad residual es baja. Además, pueden alterarse fácilmente por oxidación o fotodescomposición –con pérdida de su actividad–, y pueden ser lixiviados por las lluvias y arrastrados por el viento en gran proporción. Por lo tanto, su aplicabilidad depende del desarrollo de formulaciones adecuadas que permitan tanto su protección como su liberación gradual [6]. En este sentido, puede aprovecharse la abundante experiencia acumulada en el desarrollo de formulaciones de liberación controlada de plaguicidas sintéticos de uso comercial, consistentes en la incorporación del plaguicida a

una matriz inerte que sirve a la vez como “reservorio” y como barrera, limitando la velocidad de liberación [7].

Este tipo de formulaciones tienen importantes ventajas, tanto desde el punto de vista económico como ambiental, operativo y sanitario: (a) permiten usar una cantidad mucho menor de plaguicida para el mismo período de actividad, o bien reducir la frecuencia de aplicación; (b) se reducen notablemente las pérdidas por evaporación, lixiviación y degradación (fotolítica, hidrolítica y microbiana); (c) permiten mantener la concentración de plaguicida al mínimo nivel efectivo (o al nivel óptimo de actividad); (d) permiten reducir los costos (tanto de materia prima como de operación); (e) se reduce la contaminación ambiental por pérdidas al aire, agua, suelo, etc; (f) se facilita el manejo y el transporte, al transformarse un pesticida líquido en una formulación sólida.

En estas formulaciones, el plaguicida puede ser incorporado a la matriz de soporte mediante mecanismos físicos o químicos:

FÍSICOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mezclado con el polímero fundido ▪ incorporación en la red de un hidrogel ▪ encapsulación ▪ impregnación del material de soporte ▪ adsorción a la superficie de un material poroso
QUÍMICOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ reacción química con el soporte (injerto)

A su vez, el mecanismo de control de la liberación también puede ser físico o químico, por ejemplo:

- difusión a través del material o de una membrana polimérica de recubrimiento
- desorción desde la superficie de un material poroso
- erosión del material de soporte
- ruptura de enlaces químicos entre el plaguicida y el soporte (hidrólisis, fotólisis, etc.)
- mecanismos combinados: difusión + erosión, desorción + erosión, etc.

Este tipo de formulaciones tienen muchos aspectos en común con los dispositivos de liberación controlada de drogas, pero también algunas diferencias importantes que condicionan su implementación [8]:

- Se aplican en sistemas abiertos, no cerrados.
- Las condiciones ambientales son mucho más variables e incontroladas que las condiciones fisiológicas del cuerpo humano.
- No existe un *carrier* o vehículo natural que transporte el plaguicida hacia el punto de acción, como la sangre en el caso de la liberación de drogas.

- Los plaguicidas son mucho más sensibles a los costos que las drogas farmacéuticas, por lo que deben usarse materiales y tecnologías más baratas.

Se ha propuesto una gran variedad de materiales de soporte para la incorporación de plaguicidas, entre ellos: polímeros termoplásticos; hidrogeles (de almidón, de alginato, de quitosano, etc.); materiales porosos y/o adsorbentes (arcillas, carbón activado, sílica); madera; papel y cartón; fibras textiles; recubrimientos (pinturas, barnices, resinas polimerizables). El mecanismo de incorporación y de liberación depende en gran medida del tipo de matriz de soporte seleccionado.

A su vez, las formulaciones pueden tener gran variedad de morfologías y tamaños: micropartículas, microcápsulas, gránulos, films, recubrimientos, dosificadores, etc.[9].

1.2. Mecanismos físicos:

Existen en este campo varias tecnologías. Una de ellas es la **mezcla** directa del plaguicida con un polímero fundido (*blending*) y la posterior formación de un film o pellet activo. La liberación se produce por difusión del pesticida a través la matriz polimérica hacia la superficie, en donde se evapora. Esta técnica permite una distribución homogénea del plaguicida en el material, pero no es adecuada para compuestos termolábiles, ya que la exposición a las altas temperaturas de fusión de la mayoría de los polímeros comerciales (polietileno, polipropileno, PVC, etc.) puede producir su degradación. Con este método se incorporan distintos aditivos en polímeros comerciales, tales como antioxidantes, plastificantes (ftalatos) y agentes antifúngicos.

Una alternativa que evita el uso de altas temperaturas consiste en la incorporación de plaguicidas en **hidrogeles** sintéticos (acrilato) o de origen natural (alginato, almidón, quitosano, celulosa, etc.) durante la etapa de formación del gel. La liberación se produce por difusión de las moléculas de plaguicida en el gel, y su velocidad puede controlarse mediante el grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas [10]. La erosión natural del hidrogel en contacto con el suelo o el agua puede constituir también un mecanismo de liberación del plaguicida. Esta tecnología tiene interesantes ventajas, ya que los hidrogeles son biodegradables y pueden obtenerse a partir de fuentes renovables; pero su estructura es más sensible a las condiciones ambientales. Esta última característica permite el diseño de hidrogeles “inteligentes”, que pueden modular la velocidad de liberación del plaguicida de acuerdo a las condiciones del entorno (por ejemplo, la humedad relativa o el pH) [11].

Una tecnología muy efectiva es la **encapsulación** del plaguicida en el interior de partículas constituidas por un polímero (natural o sintético). La cápsula cumple una

doble función: por un lado, protege al plaguicida, aislándolo del ambiente, y por otro lado ofrece una barrera difusiva que retarda o modula su liberación al exterior. Si las cápsulas tienen tamaño micrométrico, el proceso se denomina microencapsulación [8]. Las microcápsulas tienen también una ventaja operativa, ya que al tratarse de formulaciones en polvo pueden dispersarse en grandes superficies. Existen numerosos ejemplos de encapsulación de compuestos o extractos naturales con actividad biocida: cinamaldehído y timol en cápsulas de β -ciclodextrinas [12]; microencapsulación de linalool en β -ciclodextrinas, alginato, quitosano y almidón [13]; extracto de neem en cápsulas de alginato de sodio entrecruzado con glutaraldehído [14].

La **impregnación** de polímeros u otros materiales requiere el contacto con un plaguicida líquido (o una solución del mismo) durante un tiempo suficientemente largo como para permitir el hinchamiento del material y a difusión del plaguicida hacia el interior. Este contacto puede lograrse por inmersión o atomización superficial. Esta metodología tiene algunas limitaciones: la difusividad de la mayoría de los pesticidas en materiales poliméricos es muy baja, y por lo tanto la saturación del soporte requeriría tiempos de contacto muy largos; la penetración suele ser sólo superficial; y generalmente se requiere el uso de solventes que luego deben ser removidos del material por secado. Como se verá en la siguiente sección, el uso de CO₂ supercrítico como solvente de impregnación permite superar varias de estas limitaciones. Actualmente, es una técnica muy utilizada para preservar la madera mediante la incorporación de agentes antifúngicos, antimoho, insecticidas, etc. [15].

También se ha investigado el uso de **adsorbentes** inorgánicos (sílica, alúmina, arcillas, carbón activado, etc.) como soportes para liberación controlada de pesticidas y como estrategia para reducir las pérdidas por lixiviación [16]. En este caso, las moléculas de plaguicida son adsorbidas en la gran área superficial disponible de los poros del material, y su liberación se produce por desorción gradual. Si el plaguicida y el adsorbente poseen grupos polares capaces de establecer interacciones fuertes (como puentes de hidrógeno), la retención puede ser muy efectiva [17]. Por ejemplo, se ha estudiado la adsorción de α -pineno y linalool en nanopartículas de sílica como mecanismo de control de plagas agrícolas [18].

El uso de materiales **compuestos** constituidos por un polímero (o hidrogel) y un material inorgánico disperso como adsorbente también ha sido estudiado como estrategia para mejorar el control de la liberación de plaguicidas, al combinar los mecanismos de adsorción en el material poroso y de difusión a través de la red del gel o polímero [19]. Este tipo de formulaciones, propuestas inicialmente para pesticidas sintéticos comerciales [20,21], se ha estudiado también para la liberación controlada de biocidas,

por ejemplo aceite esencial de orégano en films de acetato de celulosa cargados con montmorillonita [22].

1.3. Mecanismos químicos:

Ciertos compuestos se pueden unir de forma irreversible a diferentes soportes para dotarlos de características específicas como la de biocida por contacto y de esta manera evitar que se lixivien con el uso [23]. Agentes activos de contacto se refieren a aquellos biocidas que inactivan las bacterias al contacto mientras están fijados a la superficie del soporte [23–25].

La funcionalización del material puede lograrse injertando la molécula de interés directamente sobre el soporte, como es el caso del injerto de fenoles naturales sobre fibras de lino [26], o mediante un agente ligante, como el uso de hidroxietilmetacrilato para la fijación de ácido cafeico, un reconocido insecticida [27] y antimicrobiano [28] sobre films de polipropileno [29]. En el segundo caso, el ligando además de permitir la fijación del compuesto específico puede cumplir otras funciones. Por ejemplo, puede servir como “espaciador” para otorgarle la suficiente libertad de movimiento para que la porción activa del agente injertado entre en contacto con el microorganismo o insecto a controlar. Otra de las funciones secundarias del ligando puede ser la de reticulación de la matriz de soporte, para otorgarle mayor estabilidad estructural o propiedades específicas. Por ejemplo, los ácidos policarboxílicos como el ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico (BTCA) se han utilizado como agente de entrecruzamiento en soportes de celulosa. Esta misma reacción puede aplicarse además para injertar moléculas funcionales que contienen grupos OH en la cadena de celulosa. De este modo, compuestos bioactivos de origen natural se pueden utilizar para proporcionar propiedades biocidas en telas, papeles y maderas [30,31].

Por último, en otros casos el injerto forma un complejo de inclusión con el agente funcional y luego se promueve la liberación del mismo de manera controlada. Un ejemplo de esto es el caso de injerto de ciclodextrinas. Como se mencionó anteriormente, las ciclodextrinas se han utilizado para la encapsulación de sustancias activas en una amplia variedad de aplicaciones, tales como aromas, plaguicidas o medicamentos, debido su gran la variabilidad de la forma molecular y propiedades moleculares [32,33]. Estas ciclodextrinas pueden ser inmovilizadas mediante enlaces covalentes sobre diferentes soportes, creando así un mecanismo físico-químico para la incorporación de

bioplaguicidas. Se han desarrollado una gran cantidad de trabajos en fibras textiles con ciclodextrinas para otorgarle propiedad repelente de mosquitos, con prolongada actividad luego de ciclos de lavado [34–39]. La fijación permanente de las ciclodextrinas podría permitir la recarga de su agente funcional incluso después de ciclos de lavado consecutivos.

2. Caso de estudio: incorporación de biocidas de origen botánico en polímeros comerciales mediante impregnación supercrítica

2.1. Aspectos generales:

Los fluidos supercríticos (FSC) han sido propuestos y estudiados como solventes en numerosos procesos de extracción, separación, reacción y formación de partículas, debido básicamente a la posibilidad de ajustar su densidad y su poder solvente con modificaciones relativamente pequeñas de presión y temperatura [40]. El más utilizado es el dióxido de carbono (CO_2), que presenta importantes ventajas: tiene una temperatura crítica baja (31°C), lo cual permite preservar compuestos termolábiles durante el procesamiento; es un gas en condiciones ambientales, por lo que se evapora totalmente en la despresurización, sin dejar restos de solvente en los materiales procesados; es un material barato; no es tóxico ni inflamable, permitiendo una operación más segura y compatible con el procesamiento de alimentos y medicamentos. Estas características lo convierten en un solvente “verde” con gran potencial para reemplazar el uso de solventes orgánicos convencionales.

La impregnación con solventes supercríticos aprovecha estas propiedades para la incorporación de sustancias activas en matrices poliméricas, y comprende básicamente tres etapas: 1) la solubilización de la sustancia activa en el FSC a alta presión (en el caso del CO_2 , presiones mayores a ~ 8 MPa), 2) la difusión del FSC y la sustancia activa al interior del polímero, y 3) la despresurización del sistema, que produce la evaporación del FSC y la precipitación de la sustancia activa [41]. La eficiencia de la impregnación depende de varios factores: las propiedades de la matriz a impregnar, las interacciones soluto-solvente y soluto-polímero que puedan generarse y la capacidad del solvente de penetrar en el polímero. De este modo, la precipitación (y/o adsorción) de la sustancia no se produce sólo en la superficie, sino también en el interior de la matriz. En el caso de la impregnación de polímeros, la penetración del solvente supercrítico es considerable, produciéndose a la vez un hinchamiento de la estructura y un efecto “plastificante” que favorece la difusión de los solutos en su interior [42,43]. La velocidad de

despresurización es un parámetro clave: una despresurización muy rápida favorece la precipitación de mayor cantidad de solutos en el interior de la matriz, pero puede ocasionar daños mecánicos al polímero; por otra parte, una despresurización muy lenta preserva la estructura del polímero, pero puede ocasionar pérdida excesiva de solutos en la corriente de salida. Por lo tanto, es un parámetro que debe ser optimizado para cada sistema polímero-soluto-solvente en particular.

En los últimos años, la impregnación con CO₂ supercrítico como solvente ha sido estudiada en varios casos de interés, incluyendo la obtención de envases activos para alimentos y dispositivos de liberación controlada de medicamentos. Pueden mencionarse como ejemplos recientes la impregnación de lentes de contacto con fármacos de acción local (como antiinflamatorios) [44], la impregnación de madera con agentes biocidas para su conservación [45], la impregnación de biofilms de alginato con antibióticos [46], impregnación de *scaffolds* con antimicrobianos naturales [47] y la impregnación de films poliméricos para producir envases de alimentos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana, utilizando compuestos presentes naturalmente en aceites esenciales, tales como eugenol [48], timol [49], 2-nonanona [50] y cinamaldehído [51].

2.2. Incorporación de eugenol y cetonas terpénicas en films de polietileno:

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estudiado a nivel experimental la impregnación de films de polietileno de baja densidad (LDPE) con sustancias de origen botánico con actividad biocida utilizando CO₂ supercrítico como solvente. El objetivo es desarrollar materiales activos que puedan ser utilizados en envases de alimentos o de materias primas alimenticias y que eviten el ataque o proliferación de insectos y microorganismos.

El equipo experimental utilizado, cuyo esquema se muestra en la Figura 1, consiste en una celda de acero con sistemas de agitación, control de temperatura y cierre hermético que permite operar a altas presiones (hasta 250 bar).

En un ensayo típico de impregnación, los films se colocan en el interior de la celda en un soporte metálico que los mantiene separados y en posición vertical, permitiendo así un buen contacto con el solvente y evita que se depositen partículas o gotas de soluto sobre su superficie durante la despresurización. Se carga el compuesto biocida (o una mezcla de ellos) y luego se cierra la celda. Posteriormente, se ajusta la temperatura y se alimenta el CO₂ mediante una bomba o pistón hasta lograr la presión deseada. El sistema entonces se mantiene en esas condiciones y con agitación durante un tiempo determinado, luego del cual se realiza la despresurización a velocidad controlada. Una vez liberado el CO₂,

se retiran los films, se limpian superficialmente y se analizan para determinar la cantidad de biocida incorporado, así como posibles cambios en la morfología y en las propiedades mecánicas del polímero (elasticidad, resistencia, etc.).

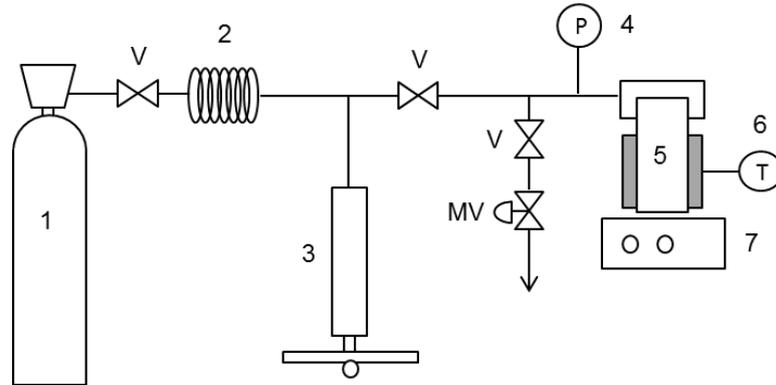


Figura 1. Esquema del equipo de impregnación a alta presión. 1: Tanque de CO₂; 2: refrigerante; 3: bomba o generador de presión; 4: manómetro; 5: celda de impregnación; 6: controlador de temperatura; 7: agitador; V: válvulas; MV: válvula micrométrica

Con esta metodología es posible estudiar el efecto de las distintas variables del proceso: temperatura, presión, concentración de biocida, velocidad de agitación, tiempo de contacto y velocidad de despresurización.

En particular, se ha estudiado la impregnación de films de LDPE con dos tipos de sustancias activas: (a) eugenol, un compuesto presente en el aceite esencial del clavo de olor, de conocidas propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes; y (b) una mezcla de timoquinona y pulegona, dos cetonas terpénicas volátiles presentes en diversos aceites esenciales, cuya actividad insecticida frente al gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) ha sido previamente comprobada y reportada [52,53].

La Figura 2 muestra el rendimiento de impregnación obtenido para el eugenol en diferentes condiciones de presión (10-15 MPa) y velocidad de despresurización (lenta y rápida), elegidas como variables de estudio. Se obtuvieron films con un contenido de eugenol de 1 a 6% aprox., y los resultados sugieren que una despresurización lenta permite incrementar el rendimiento de la impregnación. Las muestras con mayor contenido de eugenol fueron sometidas a ensayos de tracción, observándose que si bien la impregnación reduce la elasticidad del film de LDPE, sin embargo conserva su resistencia mecánica, lo cual es un aspecto fundamental para su aplicación como material de envase.

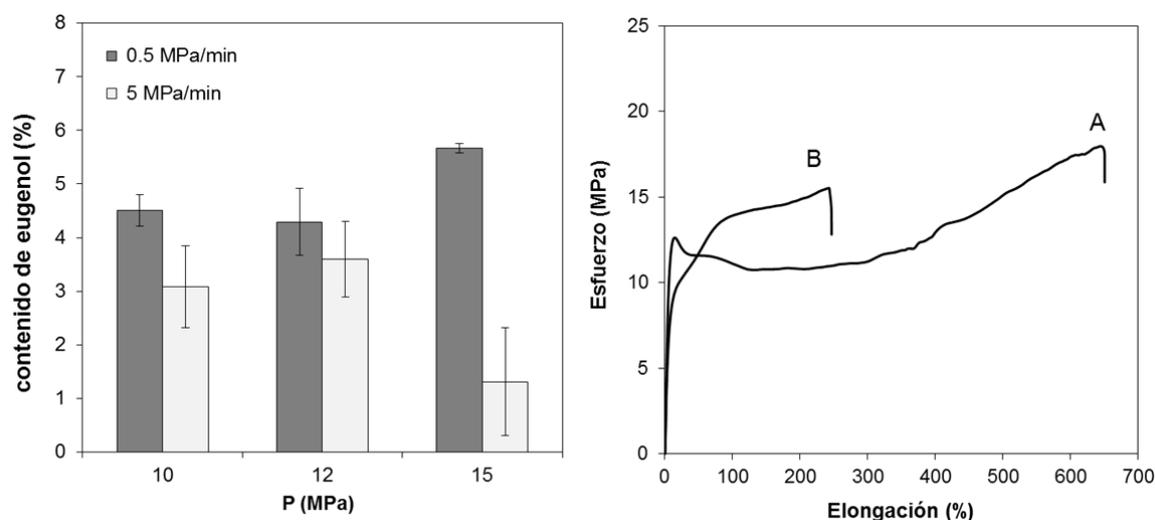


Figura 2. Impregnación supercrítica de films de LDPE con eugenol (T=45°C, t=4 hs). Izquierda: Comparación de rendimientos obtenidos. Derecha: Curvas esfuerzo-elongación, (A) film de LDPE sin tratar, (B) film de LDPE impregnado con eugenol.

En el caso de la mezcla de timoquinona y pulegona, se impregnaron films de LDPE bajo diferentes condiciones de presión, concentración, tiempo de contacto y velocidad de despresurización, analizándose estadísticamente el efecto de cada variable mediante un diseño factorial de experimentos. El objetivo es obtener un material apropiado para la conservación de semillas de maíz durante el almacenamiento o el transporte, evitando el ataque de gorgojos mediante liberación gradual de las cetonas volátiles.

Se obtuvieron films con un contenido de cetonas de entre 2 y 6% aprox., resultados similares a los obtenidos con eugenol, así como a valores reportados por otros autores al impregnar films de LDPE con compuestos de peso molecular y volatilidad comparable, tales como timol [49] y 2-nonanona [50].

La actividad insecticida de los films impregnados con cetonas fue evaluada mediante ensayos de toxicidad fumigante frente al gorgojo de maíz (*S. zeamais*). Brevemente, en dichos ensayos se colocaron films activos en el interior de frascos cerrados herméticamente junto con un cierto número de gorgojos. Luego de 24 horas de exposición, se contabilizaron los insectos muertos. Los films se colocaron luego en nuevos frascos con nuevos insectos, repitiéndose el procedimiento a intervalos de 24 horas. De esta manera, se determinó la actividad fumigante residual de los films a lo largo del tiempo. En la Figura 3 se muestran resultados para dos films obtenidos bajo diferentes velocidades de despresurización. La reducción progresiva de la toxicidad observada indica que la liberación de cetonas se produce de manera gradual.

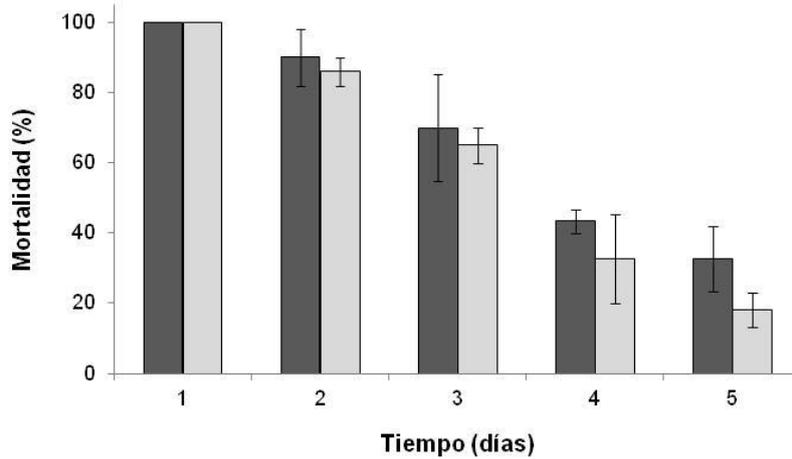


Figura 3. Toxicidad de films de LDPE impregnados con pulegona y timoquinona contra gorgojos adultos (*Sitophilus zeamais*). Condiciones de impregnación: 10 MPa, 45°C y velocidad de despresurización: (■) 0.5 MPa/min y (□) 2 MPa/min.

Se observa también que la velocidad de despresurización podría tener un efecto negativo sobre la velocidad de liberación de los compuestos impregnados, reflejado en una reducción más lenta de la mortalidad para los films obtenidos con una velocidad de despresurización más alta, a lo largo de los 5 días de exposición.

Sin embargo, si bien existe una liberación retardada de los compuestos activos, la mortalidad observada cae por debajo del 50% luego de tres días, lo cual limita el rango de aplicación de los films. Para obtener un mayor nivel de actividad durante más tiempo, es necesario incorporar una mayor cantidad de cetonas, o bien lograr una mayor reducción de su velocidad de liberación.

Una posible solución tecnológica a estas limitaciones podría lograrse utilizando otro tipo de matriz polimérica. En efecto, los estudios analizados indican que los polímeros comerciales más comunes (como polietileno y polipropileno) tienen una capacidad limitada de incorporar compuestos activos, lo cual se ha explicado a partir de su estructura semicristalina, que produce restricciones mecánicas al hinchamiento y a la penetración del CO₂ y los compuestos activos. La ausencia de grupos funcionales polares que puedan generar interacciones con las moléculas de compuesto activo también limita su retención en dichos polímeros. Por lo tanto, una alternativa promisoriosa es la impregnación de materiales compuestos, como los sistemas polímero-arcilla, en los que tanto la incorporación de los compuestos activos como la retención dentro de la matriz polimérica puede mejorarse significativamente, debido a la alta capacidad de adsorción de las arcillas dispersas en el polímero. Estos materiales nanocompuestos presentan numerosas ventajas entre las que puede destacarse una mejora en la resistencia térmica y a la humedad, y cambios en la permeabilidad, disipación de cargas y en la resistencia

química. Esta mejora de las propiedades se debe principalmente a la interacción a nanoescala entre el polímero y las arcillas sumado a un incremento del área interfacial [54].

En este sentido, se ha realizado un estudio preliminar de impregnación de timoquinona y pulegona en films nanocompuestos de LDPE + sepiolita. La sepiolita es un silicato de magnesio hidratado con morfología fibrosa cuya fórmula química es $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH},\text{F})_4(\text{OH}_2)_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Es una arcilla muy utilizada como material adsorbente debido a la gran cantidad de grupos silanol que presenta su superficie. La estrategia de utilizar este material compuesto como matriz permitiría aumentar la cantidad de cetonas que puede incorporarse, así como también su retención dentro de los films, por formación de enlaces tipo puente hidrógeno en la superficie de las nanopartículas. Resultados preliminares de impregnación indican un incremento considerable en la incorporación de cetonas en los films, observándose hasta un 67% de incremento en el contenido final de cetonas, en relación a los porcentajes obtenidos al utilizar el LDPE convencional (sin cargas).

En conclusión, la impregnación utilizando CO_2 supercrítico como solvente aparece como una tecnología adecuada y atractiva para la incorporación de compuestos naturales con actividad biocida en polímeros, debido a una serie de factores: la solubilidad de este tipo de compuestos en solventes supercríticos es generalmente alta; se obtienen materiales libres de solvente (lo cual evita etapas posteriores para su eliminación); permite procesar el polímero a temperaturas bajas (evitando descomposición de los compuestos activos); y permite lograr propiedades de transporte favorables, incrementando la penetración y reduciendo el tiempo de la impregnación. Es además una tecnología adaptable a distintos tipos de polímeros y formulaciones, y su carácter de “tecnología limpia” es altamente atractiva en el desarrollo de formulaciones de bajo impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.K. Tripathi, S. Upadhyay, M. Bhuiyan, P.R. Bhattacharya, A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management, *J. Pharmacogn. Phyther.* 1 (2009) 52–63.
- [2] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [3] M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Prot.* 19 (2000) 603–608. doi:10.1016/S0261-2194(00)00079-X.
- [4] M.B. Isman, Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world., *Annu. Rev. Entomol.* 51 (2006) 45–66. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146.
- [5] C. Regnault-Roger, C. Vincent, J.T. Arnason, Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World, *Annu. Rev. Entomol.* 57 (2012) 405–424.

- doi:10.1146/annurev-ento-120710-100554.
- [6] A. Knowles, Recent developments of safer formulations of agrochemicals, *Environmentalist*. 28 (2008) 35–44. doi:10.1007/s10669-007-9045-4.
- [7] S. Dubey, V. Jhelum, P.K. Patanjali, Controlled release agrochemicals formulations: A review, *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 70 (2011) 105–112.
- [8] K. Tsuji, Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety., *J. Microencapsul.* 18 (2001) 137–147. doi:10.1080/026520401750063856.
- [9] H.B. Scher, *Controlled-release delivery systems for pesticides*, Marcel Drekker, Inc., New York: Basel, 1999.
- [10] 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. doi:10.1163/156855502760151580.
- [11] W.E. Rudzinski, T. Chipuk, A.M. Dave, S.G. Kumbar, T.M. Aminabhavi, pH-sensitive acrylic-based copolymeric hydrogels for the controlled release of a pesticide and a micronutrient, *J. Appl. Polym. Sci.* 87 (2003) 394–403. doi:10.1002/app.11382.
- [12] P.A. Ponce Cevallos, M.P. Buera, B.E. Elizalde, Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability, *J. Food Eng.* 99 (2010) 70–75. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.039.
- [13] M.D. Lopez, A. Maudhuit, M.J. Pascual-Villalobos, D. Poncelet, Development of formulations to improve the controlled-release of linalool to be applied as an insecticide, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 1187–1192. doi:10.1021/jf204242x.
- [14] S.-A. Riyajan, J.T. Sakdapipanich, Development of a controlled release neem capsule with a sodium alginate matrix, crosslinked by glutaraldehyde and coated with natural rubber, *Polym. Bull.* 63 (2009) 609–622. doi:10.1007/s00289-009-0126-z.
- [15] F. Green, T.P. Schultz, *New Environmentally-Benign Concepts in Wood Protection: The Combination of Organic Biocides and Non-Biocidal Additives*, in: 2003: pp. 378–389. doi:10.1021/bk-2003-0845.ch023.
- [16] G. Lagaly, Pesticide – clay interactions and formulations, *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.* (2001) 205–209.
- [17] J. Cornejo, R. Celis, I. Pavlovic, M. a. Ulibarri, Interactions of pesticides with clays and layered double hydroxides: a review, *Clay Miner.* 43 (2008) 155–175. doi:10.1180/claymin.2008.043.2.01.
- [18] P. Usha Rani, J. Madhusudhanamurthy, B. Sreedhar, Dynamic adsorption of α -pinene and linalool on silica nanoparticles for enhanced antifeedant activity against agricultural pests, *J. Pest Sci.* (2004). 87 (2014) 191–200. doi:10.1007/s10340-013-0538-2.
- [19] E.I. Pereira, A.S. Giroto, A. Bortolin, C.F. Yamamoto, J.M. Marconcini, A.C. de Campos Bernardi, et al., Perspectives in Nanocomposites for the Slow and Controlled Release of Agrochemicals: Fertilizers and Pesticides, in: *Nanotechnologies Food Agric.*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 241–265. doi:10.1007/978-3-319-14024-7_11.
- [20] Z. Gerstl, A. Nasser, U. Mingelgrin, Controlled Release of Pesticides into Water from Clay-Polymer Formulations, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3803–3809. doi:10.1021/jf980185h.
- [21] Z. Gerstl, A. Nasser, U. Mingelgrin, Controlled Release of Pesticides into Soils from Clay-Polymer Formulations, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3797–3802. doi:10.1021/jf980185h.
- [22] C.C. Pola, E.A.A. Medeiros, O.L. Pereira, V.G.L. Souza, C.G. Otoni, G.P. Camilloto, et al., Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi, *Food Packag. Shelf Life.* 9 (2016) 69–78. doi:10.1016/j.fpsl.2016.07.001.
- [23] R. Kaur, S. Liu, Antibacterial surface design – Contact kill, *Prog. Surf. Sci.* 91 (2016) 136–153. doi:10.1016/j.progsurf.2016.09.001.
- [24] J.C. Tiller, C.J. Liao, K. Lewis, a M. Klibanov, Designing surfaces that kill bacteria on contact., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 5981–5985. doi:10.1073/pnas.111143098.

- [25] J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 295–304. doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.017.
- [26] A. Fillat, O. Gallardo, T. Vidal, F.I.J. Pastor, P. Díaz, M.B. Roncero, Enzymatic grafting of natural phenols to flax fibres: Development of antimicrobial properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 146–152. doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.030.
- [27] R.S. Joshi, T.P. Wagh, N. Sharma, F.A. Mulani, U. Sonavane, H. V. Thulasiram, et al., Way toward ‘Dietary Pesticides’: Molecular Investigation of Insecticidal Action of Caffeic Acid against *Helicoverpa armigera*, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 10847–10854. doi:10.1021/jf503437r.
- [28] D. Stojković, J. Petrović, M. Soković, J. Glamočlija, J. Kukić-Marković, S. Petrović, *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems, *J. Sci. Food Agric.* 93 (2013) 3205–3208. doi:10.1002/jsfa.6156.
- [29] D. Arrua, M.C. Strumia, M.A. Nazareno, Immobilization of Caffeic Acid on a Polypropylene Film: Synthesis and Antioxidant Properties, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9228–9234. doi:10.1021/jf101651y.
- [30] R. Martini, L. Serrano, S. Barbosa, J. Labidi, Antifungal cellulose by capsaicin grafting, *Cellulose.* 21 (2014) 1909–1919. doi:10.1007/s10570-014-0219-1.
- [31] I. Cerkez, H.B. Kocer, S.D. Worley, R.M. Broughton, T.S. Huang, Multifunctional cotton fabric: Antimicrobial and durable press, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) 4230–4238. doi:10.1002/app.35402.
- [32] J. Garrido, F. Cagide, M. Melle-Franco, F. Borges, E.M. Garrido, Microencapsulation of herbicide MCPA with native β -cyclodextrin and its methyl and hydroxypropyl derivatives: An experimental and theoretical investigation, *J. Mol. Struct.* 1061 (2014) 76–81. doi:10.1016/j.molstruc.2013.12.067.
- [33] B. Martel, M. Weltrowski, D. Ruffin, M. Morcellet, Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters, *J. Appl. Polym. Sci.* 83 (2002) 1449–1456. doi:10.1002/app.2306.
- [34] M. Miro Specos, Z. V., T. D., A. J., V. V., G. J., et al., Controlled release of mosquito repellents by cyclodextrins treated textiles, *Int. Istanbul Text. Congr.* 2013. (2013).
- [35] A. Hebeish, E.-S. S.M., R. M., H. I.A, E.-B. M.K., A.-M. F.A., New textiles of biocidal activity by introduced insecticide in cotton-poly (GMA) copolymer containing β -CD, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 208–217.
- [36] A. Hebeish, M.M.G. Fouda, I.A. Hamdy, S.M. EL-Sawy, F.A. Abdel-Mohdy, Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 268–273. doi:10.1016/j.carbpol.2008.02.013.
- [37] F.A. Abdel-Mohdy, M.M.G. Fouda, M.F. Rehan, A.S. Aly, Repellency of controlled-release treated cotton fabrics based on cypermethrin and prallethrin, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 92–97. doi:10.1016/j.carbpol.2007.11.006.
- [38] F. Vogtle, Bio-organic model compounds, in: *Supramol. Chem. An Introd.*, 1993: p. 135.
- [39] A.F. Shahba, Development of Longer-Lasting Insect Repellence Cellulosic Based Curtain Fabrics, *Mater. Sci. Appl.* 2 (2011) 200–208. doi:10.4236/msa.2011.23025.
- [40] N.A. Gañán, P.E. Hegel, S. Pereda, E.A. Brignole, High Pressure Phase Equilibrium Engineering, in: T. Fornari, R. Stateva (Eds.), *High Press. Fluid Technol. Green Food Process.*, Springer, 2014.
- [41] M.J. Cocero, Á. Martín, F. Mattea, S. Varona, Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications, *J. Supercrit. Fluids.* 47 (2009) 546–555. doi:10.1016/j.supflu.2008.08.015.
- [42] I. Kikic, F. Vecchione, Supercritical impregnation of polymers, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 399–405. doi:10.1016/j.cossms.2003.09.001.
- [43] S. Üzer, U. Akman, Ö. Hortaçsu, Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: A model-component study towards producing controlled-release drugs, *J. Supercrit. Fluids.* 38 (2006) 119–128. doi:10.1016/j.supflu.2005.11.005.
- [44] V.P. Costa, M.E.M. Braga, J.P. Guerra, A.R.C. Duarte, C.M.M. Duarte, E.O.B. Leite, et

- al., Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method, *J. Supercrit. Fluids*. 52 (2010) 306–316. doi:10.1016/j.supflu.2010.02.001.
- [45] A.W. Kjellow, O. Henriksen, Supercritical wood impregnation, *J. Supercrit. Fluids*. 50 (2009) 297–304. doi:10.1016/j.supflu.2009.06.013.
- [46] A.C.K. Bierhalz, M. a. Da Silva, H.C. De Sousa, M.E.M. Braga, T.G. Kieckbusch, Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films, *J. Supercrit. Fluids*. 76 (2013) 74–82. doi:10.1016/j.supflu.2013.01.014.
- [47] M.A. Fanovich, J. Ivanovic, D. Misic, M.V. Alvarez, P. Jaeger, I. Zizovic, et al., Development of polycaprolactone scaffold with antibacterial activity by an integrated supercritical extraction and impregnation process, *J. Supercrit. Fluids*. 78 (2013) 42–53. doi:10.1016/j.supflu.2013.03.017.
- [48] M.L. Goñi, N.A. Gañán, M.C. Strumia, R.E. Martini, Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation, *J. Supercrit. Fluids*. 111 (2016) 28–35. doi:10.1016/j.supflu.2016.01.012.
- [49] 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*. 85 (2014) 41–48. doi:10.1016/j.supflu.2013.10.011.
- [50] A. Rojas, D. Cerro, A. Torres, M.J. Galotto, A. Guarda, J. Romero, Supercritical impregnation and kinetic release of 2-nonanone in LLDPE films used for active food packaging, *J. Supercrit. Fluids*. 104 (2015) 76–84. doi:10.1016/j.supflu.2013.10.011.
- [51] A.C. De Souza, A.M. a Dias, H.C. Sousa, C.C. Tadini, Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 830–837. doi:10.1016/j.carbpol.2013.10.082.
- [52] J.M. Herrera, R.P. Pizzolitto, M.P. Zunino, J.S. Dambolena, J.A. Zygadlo, Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize, *J. Stored Prod. Res.* 62 (2015) 74–80. doi:10.1016/j.jspr.2015.04.006.
- [53] J.M. Herrera, M.P. Zunino, J.S. Dambolena, R.P. Pizzolitto, N.A. Gañán, E.I. Lucini, et al., Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 435–442. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.074.
- [54] R.E. Martini, S. La Tegola, A. Terenzi, J.M. Kenny, S.E. Barbosa, Polyethylene-based nanocomposite films: Structure/properties relationship, *Polym. Eng. Sci.* 54 (2014) 1931–1940. doi:10.1002/pen.23743.