



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Escuela Politécnica Superior de Linares

Trabajo Fin de Grado

EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

Alumno: Noelia Lucena Muñoz

Tutor: Antonio J. Ortiz Hernández

Depto.: Química Inorgánica y Orgánica

Julio, 2019

UNIVERSIDAD DE JAÉN

Escuela Politécnica Superior de Linares

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química Industrial

**EXTRACCIÓN DE PRODUCTOS
NATURALES ASISTIDA POR
ULTRASONIDOS**

Alumno: Noelia Lucena Muñoz

Tutor: Antonio J. Ortiz Hernández

Dpto.: Química Inorgánica y Orgánica

Firma Alumno:



Firma Tutor:

ÍNDICE

1.	Resumen	6
2.	Abstract	6
3.	Introducción	7
3.1.	Fundamento	8
3.2.	Mecanismos de extracción inducidos por ultrasonidos	10
3.2.1.	Fragmentación	10
3.2.2.	Erosión	11
3.2.3.	Efecto sonocapilar	12
3.2.4.	Sonoporación	13
3.2.5.	Tensión de corte local	13
3.2.6.	Detexturación.	14
3.2.7.	Mecanismos combinados	15
3.3.	Parámetros de los que depende la cavitación ultrasónica	15
3.4.	Instrumentación	16
3.4.1.	Baños ultrasónicos	17
3.4.2.	Tipo Horn	17
4.	Objetivo del proyecto	18
4.1.	Objetivos particulares	18
5.	Materiales y métodos	18
5.1.	Materiales y reactivos	18
5.2.	Métodos	19
5.2.1.	Preparación de matriz sintética (PVC)	19
5.2.2.	Puesta a punto ultrasonidos	19
5.2.2.1.	Ultrasonidos.	19
5.2.2.2.	Rotavapor	20
5.2.3.	Tratamiento matriz natural (cuerpo graso <i>Throrectes Lusitanicus</i>)	20
5.2.3.1.	Centrifugación y filtrado de la fase líquida	20
5.2.3.2.	Eliminación de disolventes mediante corriente de nitrógeno	22
5.2.3.3.	Sistema de extracción en continuo	22
5.2.3.4.	Cromatógrafo de líquidos	23
6.	Procedimientos	24
7.	Resultados y discusiones	26
7.1.	Método oficial. Soxhlet	26
7.2.	Puesta a punto de la técnica de ultrasonidos	26
7.3.	Sonicación de las muestras de cuerpo graso	30
8.	Conclusiones	32
9.	Bibliografía	33

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: <i>Extracción asistida por ultrasonido: evolución o revolución</i>	8
Figura 2: <i>zona de actividad de la microburbuja</i>	9
Figura 3: <i>Comparación de la extracción con ultrasonidos (naranja) y maceración (negro)</i>	10
Figura 4: <i>Hojas de boldo con tricomas y efecto del ultrasonido sobre éstas</i>	11
Figura 5: <i>Comparación de la capacidad de retención de agua del orujo de manzana</i>	12
Figura 6: <i>Levadura sin tratar y levadura tratada</i>	13
Figura 7: <i>Efecto del ultrasonido sobre hojas de albahaca. (A- comparación comparación de la cinética de extracción de eugenol en aceite de oliva para EAU (naranja) y para la maceración (negro), B- disipación de energía en el eugenol (naranja) y aceite de oliva (negro), C(1)- glándula de aceite esencial inicial, C(2)- glandula de aceite esencial después de la maceración, C(3)- glándula de aceite esencial después de EAU.</i>	14
Figura 8: <i>Efecto del ultrasonido sobre las semillas carvi</i>	15
Figura 9: <i>reactor tipo baño ultrasónico</i>	17
Figura 10: <i>reactor ultrasónico tipo sonda</i>	17
Figura 11: <i>Extracción Soxhlet junto con la muestra de film</i>	19
Figura 12: <i>Equipo de ultrasonidos</i>	20
Ilustración 13: <i>Equipo rota vapor utilizado en la eliminación de disolventes</i>	20
Figura 14: <i>Centrifuga</i>	21
Figura 15: <i>Filtración de la fase líquida</i>	21
Figura 16: <i>Eliminación de disolventes en</i>	22
Figura 17: <i>Bomba peristáltica</i>	23
Figura 18: <i>Muestras de cuerpo graso y compuestos</i>	25
Figura 19: <i>Sonicación de la muestra</i>	25

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: <i>Resultados de la extracción en 30ml de hexano con el 30% de potencia variando los tiempos</i>	27
Tabla 2: <i>Resultados de la extracción al 30% de potencia durante 5 minutos variando la cantidad de disolvente</i>	28
Tabla 3: <i>Resultados de la extracción al 30% de potencia durante 20 minutos variando la cantidad de disolvente</i>	28
Tabla 4: <i>Resultados de la extracción durante 20min en 70mL variando la potencia de trabajo</i>	29
Tabla 5: <i>Resultados de la extracción de la Ivermectina contenida en el cuerpo graso manteniendo la potencia de trabajo al 40% y variando el tiempo</i>	30
Tabla 6: <i>Resultados de la extracción de la Ivermectina contenida en el tuvo digestivo manteniendo el tiempo de trabajo en 5 minutos y variando la potencia</i>	31

ÍNDICE GRÁFICAS

Gráfica 1: <i>Potencia al 30% en 30 mL de disolvente variando el tiempo de extracción.....</i>	27
Gráfica 2: <i>Potencia al 30% durante 5min variando la cantidad de disolvente</i>	28
Gráfica 3: <i>Potencia al 30% durante 20min variando la cantidad de disolvente</i>	29
Gráfica 4: <i>Tiempo de extracción 20min en 70mL de disolvente variando la potencia</i>	30
Gráfica 5: <i>Concentración en ppb de Ivermectina en el cuerpo graso frente al tiempo de extracción</i>	31
Gráfica 6: <i>Concentración en ppb de Ivermectina en el cuerpo graso frente a la potencia de trabajo</i>	32

ÍNDICE ABREVIATURAS

<i>IVM</i>	Ivermectina
<i>PVC</i>	Ploricloruro de vinilo
<i>EAU</i>	Extracción asistida por ultrasonidos
<i>UCE</i>	Efecto capilar ultrasónico
<i>WHC</i>	Water retention capacity (capacidad de retención de agua)
<i>HPLC</i>	High performance liquid chromatography (cromatografía de líquidos de alta eficacia)
<i>Filtro PTFE</i>	Filtro con membrana de politetrafluoroetileno
<i>LC/ESI-MS/MS</i>	Cromatografía líquida combinada con espectroscopía de masas en tándem de ionización por electropulverización

1. Resumen

El uso de la radiación ultrasónica en las nuevas tecnologías, abre un amplio espectro en disciplinas tales como la sonoquímica, la síntesis de nuevos materiales o en la extracción de compuestos orgánicos. Este trabajo fin de grado (TFG) versa sobre el uso de la técnica de ultrasonidos para la extracción de productos naturales.

Inicialmente nuestro objetivo es optimizar la técnica de extracción de distintas matrices de naturaleza orgánica asistida por ultrasonidos. Se han estudiado la incidencia en la extracción de variables; tales como la potencia, tiempo o el volumen de disolvente.

Con el objetivo de estudiar los factores que afectan a la extracción asistida por ultrasonidos, elegimos la extracción de compuestos plastificantes presente en una matriz polimérica de síntesis como es un film de PVC alimentario de composición perfectamente conocida. En el siguiente estudio, abordamos la extracción de un antiparasitario de amplio espectro como es la Ivermectina (IVM), presente en una matriz compleja y con concentración de analito desconocida, concretamente en los tejidos del coleóptero *Throrectes Lusitanicus*.

En el primer caso, tras realizar los ensayos llegamos a la conclusión de que la sonoquímica presenta una efectividad elevada en la extracción de plastificantes presentes en matrices poliméricas, con un importante ahorro de tiempo y disolvente.

En el caso de la IVM, comprobamos la influencia de las variables potencia y tiempo de extracción.

La técnica de extracción con ultrasonidos es un proceso mecánico y no químico, es por ello que existen diferencias en las condiciones de extracción dependiendo de la matriz que se esté tratando.

2. Abstract

Advances in ultrasound (US) radiation techniques are making the technology appear more useful in disciplines such as sonochemistry, the synthesis of new materials or the extraction of organic compounds. During this study, we implemented the use of US technique for the extraction of natural products.

Initially our objective was to optimize the process variables on extraction of bioactive compounds of different matrices assisted by ultrasound. The optimal extraction conditions have been studied: ultrasound power, extraction time and solid-liquid ratio.

In order to study the factors that affect ultrasound-assisted extraction, we chose the extraction of plasticizing compounds present in a synthetic polymer matrix, such as a food-grade PVC film with a well-known composition. In the following study, we dealt with the extraction of a broad-spectrum antiparasitic agent such as Ivermectin (IVM), present in a complex matrix and with an unknown analyte concentration, specifically in the tissues of the coprophagous beetle *Throrectes Lusitanicus*.

In the first case, after performing the tests we reached the conclusion that sonochemistry has a high effectiveness in the extraction of plasticizers present in polymer matrices, with an important saving of time and solvent.

In the case of IVM, we checked the influence of the variables power and extraction time.

The ultrasound extraction technique is a mechanical and non-chemical process, the final extraction conditions depending on the matrix being treated.

3. Introducción

La técnica de extracción se ha utilizado desde antaño en todas las industrias (farmacéutica, alimentaria, cosmética,...). Debido al aumento de los costos de energía y el impulso para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, éstas se enfrentan al desafío de encontrar nuevas tecnología para reducir el consumo de energía, para cumplir con los requisitos legales sobre emisiones, seguridad y control de productos / procesos, y para la reducción de costos y aumento de calidad, así como la funcionalidad. Debido a estos motivos, ha sido recientemente cuando se han desarrollado tecnologías limpias de extracción de gran eficiencia con buen rendimiento y una pureza elevada. La extracción asistida por ultrasonidos conlleva tiempos de extracción más cortos, necesitan de menos solventes orgánicos y el consumo de energía es más reducido. Para cumplir con los requisitos del mercado y de las regulaciones, el sono-extracto debe cumplir unos criterios de calidad.

En un contexto tan cambiante, hoy en día debemos incluir el cambio de conciencia de extracción de un simple interés en el análisis de datos al interés en modelos y la fuerte consideración de los efectos secundarios ambientales de nuestra práctica como

consecuencia de la alta demanda de información de extracción. Esta evolución o revolución de la extracción de productos naturales se resumen en la Figura 1. La extracción verde de productos naturales podría ser un nuevo concepto para enfrentar los desafíos del siglo XXI, para proteger tanto al medio ambiente como a los consumidores.

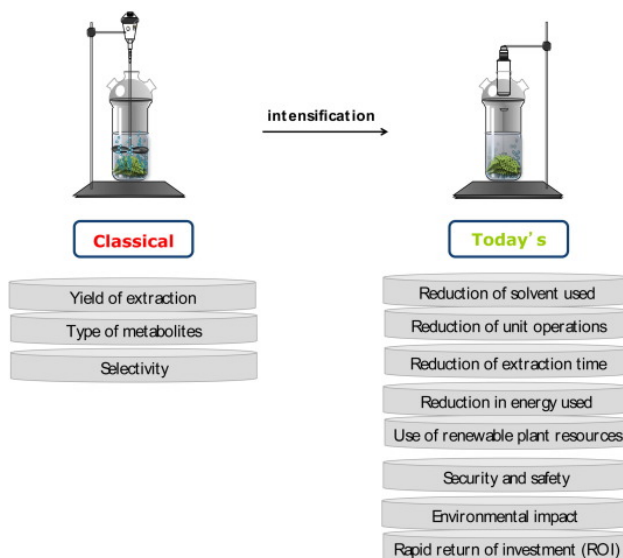


Figura 1: *Extracción asistida por ultrasonido: evolución o revolución*

Se sabe que el ultrasonido tiene un efecto significativo en la velocidad de varios procesos dentro de la industria química y alimentaria. Usando éste, las extracciones completas se pueden completar en minutos con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de solvente, simplificando la manipulación y el procesamiento, dando una mayor pureza al producto final, eliminando el tratamiento posterior de las aguas residuales y consumiendo solo una fracción de la energía fósil que normalmente se necesita para un método de extracción convencional, como la extracción Soxhlet, la maceración o la destilación Clevenger. Se han extraído varias clases de componentes de alimentos tales como aromas, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos orgánicos y minerales. [1]

3.1. Fundamento

La técnica de extracción asistida por ultrasonidos (EAU), también llamada sonoquímica, trata de compresiones y expansiones en forma de onda longitudinal a través de un medio mecánico a frecuencias entre 20 – 100 kHz produciéndose burbujas, llenas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido y cuyo tiempo

de vida es del orden de un microsegundo. La presión que se transmite es presión efectiva que es la suma de la presión hidrostática y acústica en un punto determinado y a un tiempo. A nivel molecular, el fenómeno de la sonoquímica se denomina cavitación. Las microburbujas se generan cuando la distancia que separa las moléculas es superior a la de cohesión. Éstas absorben energía de las ondas y crecen isotérmicamente hasta alcanzar un tamaño crítico e implosionan adiabáticamente. Antes de colapsar, a su alrededor generan puntos calientes (hots pots) con grandes gradientes de presión (1000 – 2000 bares) y temperatura (4000 – 6000 k) y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), hidroxiperoxilo ($\cdot\text{OOH}$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). [2]

En el sistema que cavita existen tres zonas de actividad:

1. Interior de la burbuja, donde se originan reacciones radicalarias por ruptura homolítica de los enlaces.
2. Región interfacial con unas temperaturas alrededor de 1000 K.
3. El líquido externo a la microburbuja donde no hay actividad sonoquímica primaria, pero si se pueden producir reacciones subsiguientes de los intermedios generados.

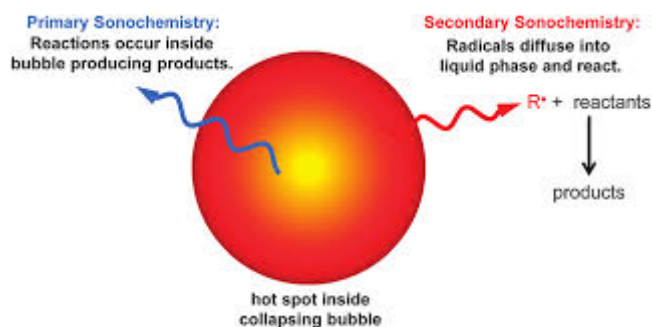


Figura 2: zona de actividad de la microburbuja

El ultrasonidos provoca la ruptura de la pared celular, la reducción del tamaño de las partículas y el incremento de la masa que se transfiere a través de las membranas, también facilita la rehidratación del tejido y la abertura de los poros por lo que las sustancias, que se encuentren en células internas o externas del tejido, son extraídas con mayor rapidez. Al reducir el tamaño de las partículas de la muestra, se incrementa

el área de contacto entre la fase sólida y el disolvente, lo que por difusión y procesos osmóticos, favorece la transferencia de masa de los constituyentes solubles.

3.2. Mecanismos de extracción inducidos por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) de productos naturales ha sido ampliamente investigada. Sin embargo, los mecanismos que conducen a la mejora de la extracción debido al uso de ultrasonido rara vez se investigan.

Para comprender e ilustrar el efecto del ultrasonido en una matriz vegetal durante los EAU, examinamos de cerca diferentes estudios y notamos que la extracción por ultrasonido no actúa con un solo mecanismo, sino a través de diferentes mecanismos independientes o combinados entre la fragmentación, la erosión, la capilaridad y la detexturación, y la sonoporación.

Todos los estudios se refieren a ultrasonidos de alta potencia correspondientes a frecuencias de 20 o 25 kHz. [1]

3.2.1. Fragmentación

En algunos casos, durante la aplicación de ultrasonido en un medio líquido que contiene una materia prima, se puede observar una rápida fragmentación de la materia prima.

En la (Figura 3) vemos el efecto del ultrasonido sobre hojas de espinaca para la extracción de clorofila. Éstas sufrieron una rápida fragmentación durante los primeros minutos de sonicación, mientras que con la extracción convencional, permanecieron intactas.

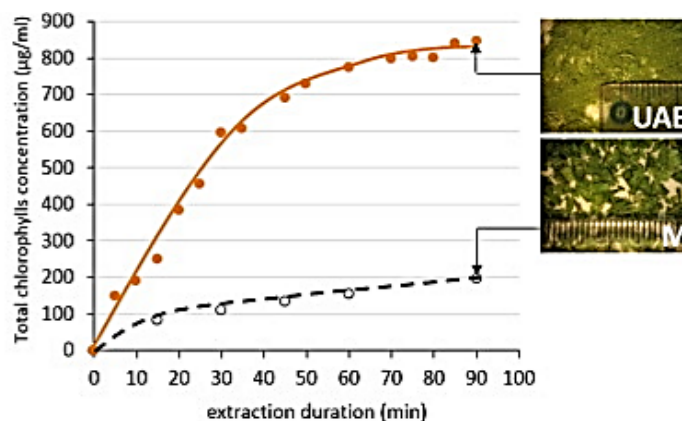


Figura 3: Comparación de la extracción con ultrasonidos (naranja) y maceración (negro)

Al comparar la tasa de extracción de clorofilas entre el proceso de los EAU y el proceso de maceración, método convencional, se obtiene un aumento lineal al comienzo de los EAU,

que corresponde a una solubilización directa de las clorofilas. Este efecto es muy probablemente debido a la reducción en el tamaño de partícula que ocurre durante la aplicación de ultrasonido.

La fragmentación puede deberse a colisiones entre partículas y a las ondas de choque creadas a partir de burbujas de cavitación que colapsan en el líquido. Una consecuencia directa de la reducción en el tamaño de partícula por la acción de ultrasonido es el aumento del área de superficie del sólido que resulta en una mayor transferencia de masa y una mayor tasa de extracción y rendimiento. [1]

3.2.2. Erosión

Algunos autores ya han notado la erosión del material vegetal crudo cuando se tratan con ultrasonido. Por ejemplo, EAU de hojas de boldo ha sido estudiada por Petigny et al. (2013). Comparando la superficie de la hoja antes y después del tratamiento observamos que las hojas no están fragmentadas, pero sí vemos un efecto localizado.

Las hojas poseen tricomas en su superficie, lo que parece ser afectado por el ultrasonido.

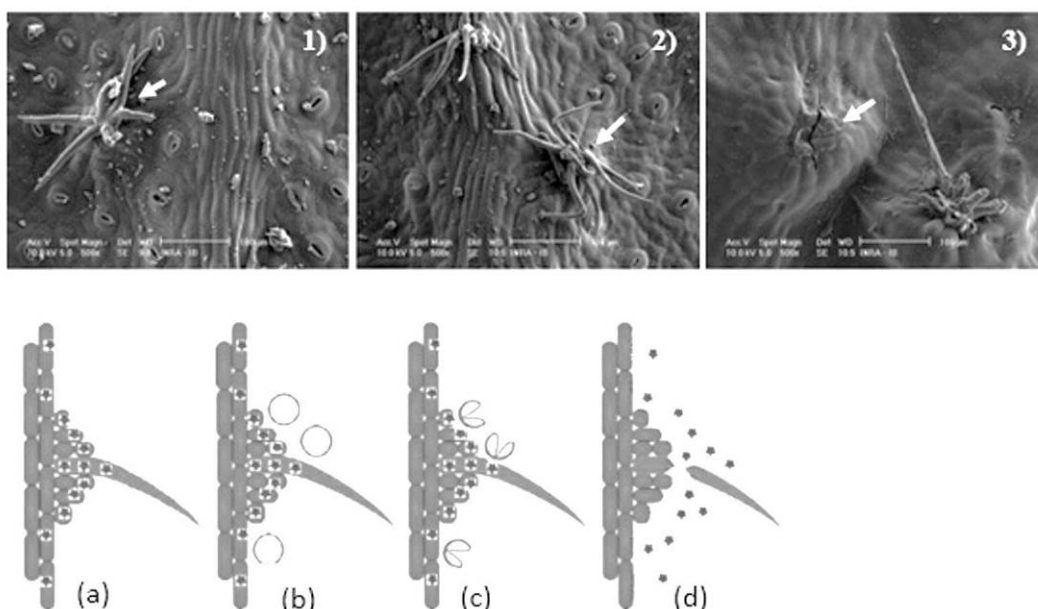


Figura 4: Hojas de boldo con tricomas y efecto del ultrasonido sobre éstas.

(1-control de la superficie de la hoja, 2-superficie después del proceso convencional, 3-superficie después de EAU. (a) Perfil de la planta con tricoma en su superficie, (b) generación de la burbuja de cavitación, (c) colapso de la burbuja, (d) abrasión de la superficie, rotura del tricoma y liberación de material soluble en el medio circundante)

Esta estructura ha sido dañada o eliminada después del tratamiento, que no es el caso de las hojas sometidas a maceración. El agua se utiliza como disolvente, y gracias a la erosión se

facilita la accesibilidad de este en la superficie de la hoja, lo que mejora aún más la extracción y la solubilización.

La erosión es un efecto conocido del ultrasonido y se utiliza para varios fines, como la limpieza o para reacciones sonoquímicas. [1]

3.2.3. Efecto sonocapilar

El efecto capilar ultrasónico (UCE) se refiere al aumento de la profundidad y la velocidad de penetración del líquido en los canales y poros en algunas condiciones de sonicación. Aunque no se comprende completamente, se ha establecido una relación entre la cavitación y la UCE, que también podría ser un mecanismo que explique la extracción mejorada realizada bajo ultrasonido.

Para esto, realizamos un experimento adicional midiendo la capacidad de retención de agua (WHC) mediante un método descrito por Huang et al., 2016. Este método fue adaptado a sólo 10 min para evaluar el efecto de la mezcla sólido/líquido.

La capacidad de retención de agua es aproximadamente un 70% más alto para el orujo de manzana con ultrasonido en comparación con la maceración.

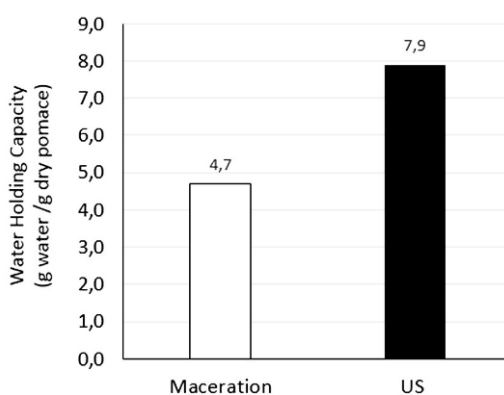


Figura 5: Comparación de la capacidad de retención de agua del orujo de manzana

Esta observación podría contribuir a explicar el aumento del rendimiento de extracción durante la primera parte del proceso.

El impacto de UCE en la extracción fue propuesto por Vinatoru (2001), identificó que el índice de hinchamiento de varias matrices vegetales aumentó de 5 a 10% mediante el uso de ultrasonido, lo que supone un impacto positivo en los mecanismos básicos de las extracciones: desorción y difusión de un soluto a partir de una estructura vegetal.

Otros autores también han investigado la mejora de la matriz WHC aplicada por ultrasonido durante el curado de la carne. Éstos informaron una modificación de la

estructura de la carne, así como el aumento de la transferencia de sal y humedad mediante el procesamiento de ultrasonido. [1]

3.2.4. Sonoporación

El efecto de sonoporación del ultrasonido se aplica cuando se desea una permeabilidad de las membranas celulares. Se ha utilizado *in vitro* para la captación celular en moléculas o destrucción celular, para ello se emplean frecuencias elevadas. Sin embargo, hay estudios que se centran en el uso de baja frecuencia para la permeabilización de la pared celular o la inactividad de bacterias.

En el campo de la extracción, la sonoporación se puede usar para poros de membrana celular reversibles o irreversibles, lo que daría como resultado la liberación de contenido celular en el medio extractivo.

Se ha realizado un trabajo de recuperación de aceite en la levadura, realizando una comparación entre la levadura no tratada y levadura tratada con ultrasonidos.

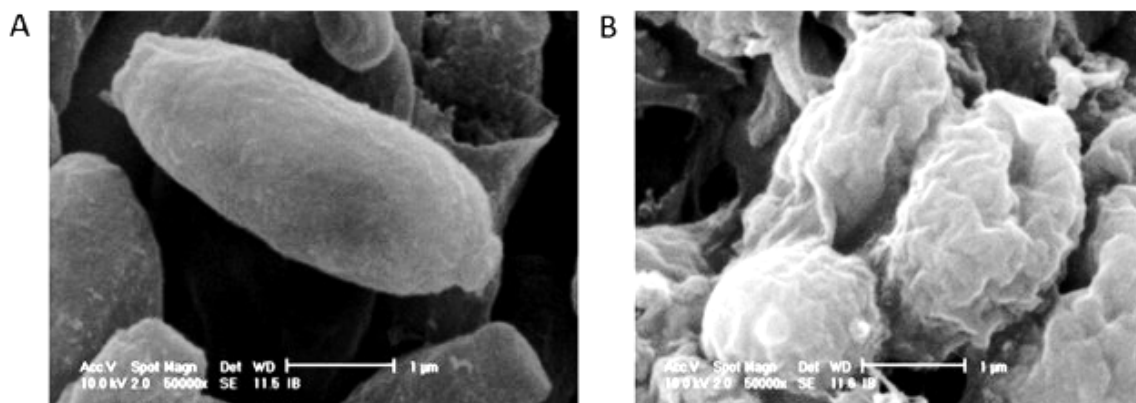


Figura 6: *Levadura sin tratar y levadura tratada*

Las levaduras que fueron tratadas muestran una superficie altamente impactada y se han observado perforaciones de la membrana visible, de las cuales se han obtenido un mayor rendimiento de extracción de aceite. [1]

3.2.5. Tensión de corte local

Durante la irradiación de una mezcla sólido-líquido por ultrasonido, se generan algunas fuerzas de corte dentro del líquido y en la proximidad de materiales sólidos. Las fuerzas de corte y las turbulencias resultan de la evolución (oscilación y colapso) de la burbuja de cavitación dentro del fluido. La transmisión resultante y los efectos de micro-transmisión acústica son de interés en aplicaciones como la mezcla o la emulsificación.

Se investigó el enriquecimiento de aceite en aceite esencial de albahaca. Las hojas de albahaca fueron sometidas a ultrasonido en aceite de oliva. La cinética de extracción del eugenol, un terpeno representativo contenido en el aceite esencial de albahaca, se compara entre los EAU y la maceración (Figura 7-A).

En la albahaca, los aceites esenciales están contenidos en las glándulas que se encuentran en la superficie de las hojas (Figura 7-C-1). Para las hojas tratadas por maceración en aceite de oliva, la envoltura externa de la glándula de aceite aún está intacta (Figura 7-C-2). En el caso de las hojas observadas después de una irradiación con ultrasonido, la glándula de aceite parece haber explotado.

El aumento de la temperatura es mayor con el aceite de oliva que con el eugenol (Figura 7-B), lo que se debe a una mayor capacidad de calor para el eugenol que para el aceite vegetal. La cuantificación de la disipación de energía es mayor en eugenol que en aceite de oliva, lo que indicaría que la cavitación que se produce en el aceite esencial podría ser más importante que en el aceite de oliva. [1]

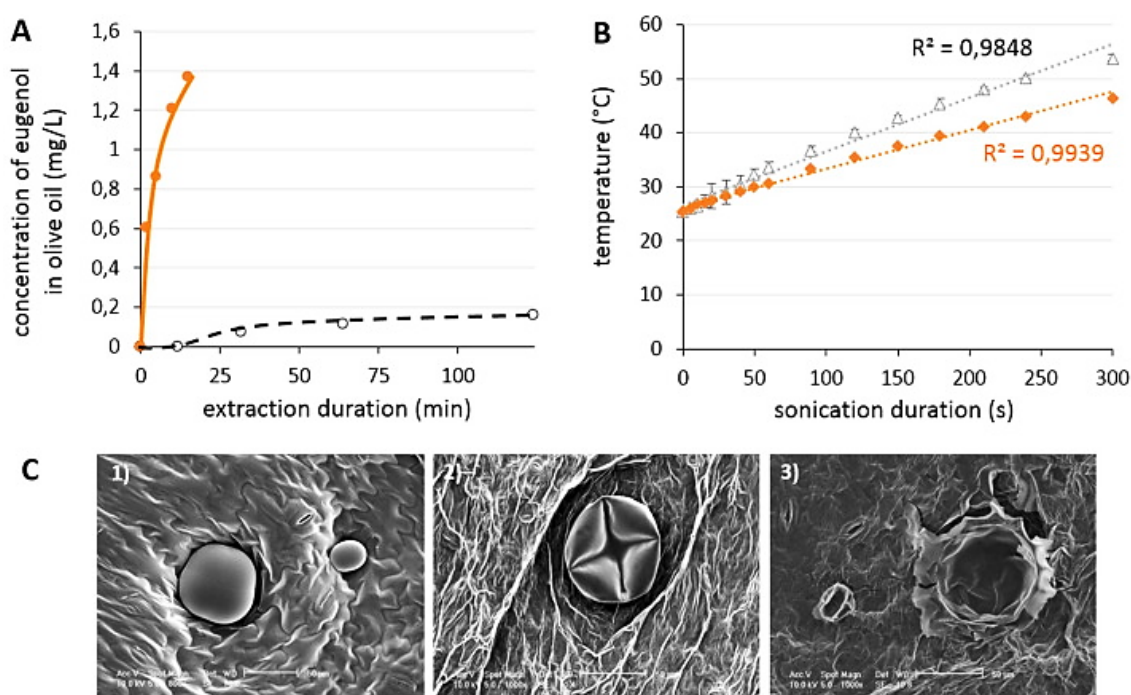


Figura 7: Efecto del ultrasonido sobre hojas de albahaca. (A- comparación de la cinética de extracción de eugenol en aceite de oliva para EAU (naranja) y para la maceración (negro), B- disipación de energía en el eugenol (naranja) y aceite de oliva (negro), C(1)- glándula de aceite esencial inicial, C(2)- glándula de aceite esencial después de la maceración, C(3)- glándula de aceite esencial después de EAU.

3.2.6. Detexturación.

Se ha observado que en algunos casos en un estudio previo sobre la extracción de aceites esenciales de semillas de alcaravea ha dado lugar a una destrucción de las

estructuras de la planta. Entre el método convencional y la extracción asistida por ultrasonidos no existen diferencias significativas respecto a los rendimientos.

Tras la extracción convencional y los EAU a baja temperatura permiten identificar diferentes modificaciones.

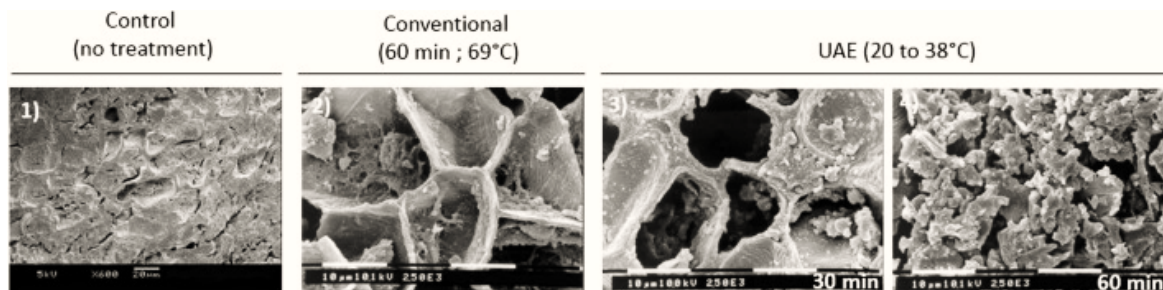


Figura 8: Efecto del ultrasonido sobre las semillas carvi

La extracción convencional deja las estructuras celulares intactas pero se vacía debido a la transferencia del contenido celular en el solvente. Se obtiene una degradación gradual de las paredes celulares después del ultrasonido. [1]

3.2.7. Mecanismos combinados

Durante los EAU es muy probable que se produzca una combinación de efectos, los cuales podrían ser secuenciales durante el proceso de extracción. Además, aunque no se detalla como un mecanismo, el intenso efecto de mezcla contribuye a la mejora de la transferencia de masa, mejorando la tasa de transferencia de soluto.

La comprensión de los posibles mecanismos también señala que la materia prima tiene el mayor impacto en la extracción. A parte, el tipo de tratamiento previo aplicado sobre la materia prima a tratar también contribuirá a los rendimientos e extracción. Por ejemplo, la molienda, la descamación, el secado afectarán la accesibilidad de los compuestos a extraer. [1]

3.3. Parámetros de los que depende la cavitación ultrasónica

- Frecuencia. La producción de burbujas de cavitación se complica conforme aumentamos la frecuencia, de menores (kHz) a mayores (MHz). La más empleada oscila entre 20 a 40 kHz.
- Intensidad. La intensidad de sonicación es proporcional a la amplitud de vibración de la fuente de ultrasonido (W/cm^2). Al aumentar la intensidad del sonido aplicado, superan a las fuerzas de cohesión del medio líquido

y se crean las microburbujas. Pero tiene límites en el transductor y en la generación de burbujas estables que amortiguan el efecto.

- Disolvente. Éste afecta de manera que cuanto mayor es su viscosidad y tensión superficial, mayor dificultad habrá para que se produzca la cavitación.
- Temperatura. La cavitación se obtiene mejor a bajas temperaturas ya que el aumento de temperatura aumenta el número de moléculas en estado vapor que interfiere el proceso.
- Presión externa y burbujas de gas. El aumento de la presión externa implica un aumento de energía para producir cavitación, es decir, mayor energía para romper las fuerzas moleculares. A veces se hace fluir un gas para mejorar el proceso.
- Tiempo de extracción. El aumento de la eficiencia de extracción con el tiempo de sonicación, se obtiene hasta que se alcanza un equilibrio, tiempos mayores al óptimo la reducen.
- Volumen y/o tamaño de partícula de la muestra. No existe una relación analítico/disolvente extractos ideal, por lo que hay que optimizarla.
- Disolvente de extracción. El más idóneo es el menos viscoso.
- Volumen del solvente de extracción. Se debe tener en cuenta que no sea poco volumen, pues se saturaría y dejaría de extraer compuesto. Una vez se optimiza, usar el mínimo.
- Frecuencia de sonicado. Parámetro que también se debe optimizar, sin olvidar que a mayor frecuencia la formación de microburbujas es más difícil.

En cualquier caso, cada extracción requiere unas condiciones distintas. [3] En el presente estudio de las características del equipo utilizado, determinan que la influencia de factores tales como la temperatura y la frecuencia no se han podido estudiar.

3.4. Instrumentación

En la técnica de extracción asistida por ultrasonidos los reactores más utilizados son los reactores sonoquímicos tipo Horn y los baños ultrasónicos. En muchas ocasiones es necesario emplear agitación mecánica y criostatos para mantener constante la temperatura que se incrementa por la acción del ultrasonido.

3.4.1. Baños ultrasónicos

Los baños ultrasónicos consisten en un tanque de acero inoxidable con uno o más transductores ultrasónicos. Operan con una amplitud que varía de 1 a 5 W/cm² y una frecuencia de 40 kHz, mejorándose la cavitación por la adición de un tensoactivo (2%).

Tienen la función principal de limpieza, aunque también se usan en algunas investigaciones sonoquímicas por su bajo costo, pero tienen el inconveniente de que la reproducibilidad de los resultados es baja.



Figura 9: reactor tipo baño ultrasónico

3.4.2. Tipo Horn

Los rectores tipo Horn utilizan transductores tipo sonda, las cuales liberan una gran cantidad de energía directa a la mezcla reaccionante, y trabajan a 20 kHz y mayor rango de frecuencias. La sonicación es directa y los resultados que se obtienen son más favorables que los obtenidos con los baños ultrasónicos, los cuales son preferidos para aplicaciones de extracción.

Existen varios diseños de sondas con diferentes longitudes, diámetros y geometrías de punta. La selección de ésta se realiza de acuerdo con la aplicación y el volumen de la muestra que se vaya a sonicar. [2] [1]



Figura 10: reactor ultrasónico tipo sonda

4. Objetivo del proyecto

Estudio de la viabilidad de extracción asistida por ultrasonidos de compuestos orgánicos en distintas matrices.

4.1. Objetivos particulares

- Puesta a punto del ultrasonido para el máximo rendimiento con film de PVC.
- Extracción de compuestos naturales (*ivermectina*) del cuerpo graso y tubo digestivo del *Thorectes Lusitanicus*.
- Cuantificación de ivermectina mediante LC/ESI-MS/MS.

5. Materiales y métodos

5.1. Materiales y reactivos

- Film de PVC. Film de 7µm proporcionado por Flexia Film.
- Cuerpo graso *Thorectes Lusitanicus*
- Jeringa
- Filtro PTFE 45µm
- Reactivos:
 - Acetonitrilo
For HPLC
Merk
 - n-Hexano
for HPLC (≥97,0%)
Honeyuell I Riedel-de Haën
 - Methanol
for UHPLC Suprtgradiet
PanReac
 - Ivermectina y Abamectina
HPLC (98,9%)
Fluka

5.2. Métodos

5.2.1. Preparación de matriz sintética (PVC)

Se ha desarrollado el procedimiento experimental según la normativa UNE-EN 1186-2 (ANEXO 1) [4].

Se coge una muestra de film a ensayar, concretamente 500mg, y se introduce en un soxhlet el cual está conectado a un circuito de refrigeración. En la apertura inferior de éste, ponemos un matraz de fondo redondo con 200ml de hexano, estará sobre una manta calefactora imantada para realizar la extracción durante 4h.

Una vez transcurrido el tiempo necesario se echa todo el disolvente en el matraz, previamente tarado, y se lleva al rotavapor para que el disolvente se evapore y quede únicamente los plastificantes, por último se pesará la cantidad de plastificantes que se ha extraído.



Figura 11: Extracción Soxhlet junto con la muestra de film

5.2.2. Puesta a punto ultrasonidos

5.2.2.1. Ultrasonidos.

Para la extracción de compuestos se ha empleado un equipo SONOPLUS Ultrasonic Homogenizers HD 3200 cuya potencia máxima de trabajo es de 200 W y una frecuencia constante de 20 kHz.

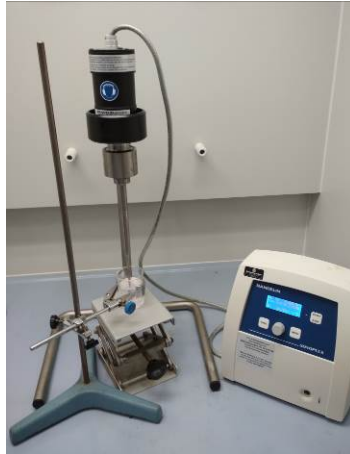


Figura 12: *Equipo de ultrasonidos*

5.2.2.2. Rotavapor

Método para la evaporación de disolventes en el que trabajamos en unas condiciones de presión de vacío, a una temperatura de 53°C y una velocidad de rotación baja.



Ilustración 13: *Equipo rota vapor utilizado en la eliminación de disolventes*

5.2.3. Tratamiento matriz natural (cuerpo graso *Throrectes Lusitanicus*)

5.2.3.1. Centrifugación y filtrado de la fase líquida

Una vez habiendo sido sonicada la muestra y pasada por el vortex para una mejor homogenización, se centrifuga.

La centrifugación se utiliza para la separación de sólidos y líquidos. Quedando la fase líquida arriba, de manera que podemos extraerla fácilmente para su posterior tratamiento pues es de nuestro interés. Se centrifuga durante 5min a 5000 revoluciones. Los tubos se deben colocar encontrados y de igual peso, para que no haya descompensación y pueda haber accidentes.

La fase líquida debe ser filtrada, para ello con una jeringa la pasamos por el filtro PTFE 45 μ m, así se eliminan pequeñas partículas que puedan, interferir en los siguientes pasos.

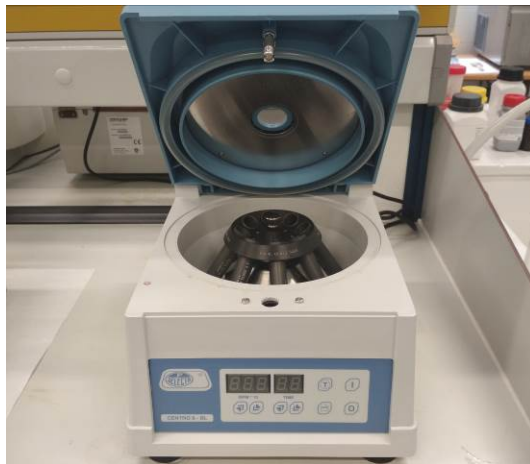


Figura 14: Centrifuga



Figura 15: Filtración de la fase líquida

5.2.3.2. Eliminación de disolventes mediante corriente de nitrógeno

Las muestras filtradas deben estar exentas de disolvente acetonitrilo, para ello las introducimos en baños termostáticas a una temperatura no mayor de 60°C para que la ivermectina no se vea afectada. Para favorecer la evaporación mediante burbujeo, le introducimos una corriente de nitrógeno (N₂).

Por último resuspendemos en 5ml de agua.



Figura 16: *Eliminación de disolventes en baño termostático con aportación de nitrógeno*

5.2.3.3. Sistema de extracción en continuo

Este método es utilizado para la limpieza de las muestras y posterior concentración. El colector de extracción en fase sólida continua utilizado se montó a partir de una bomba peristáltica Gilson Minipuls-3 junto con tubos de cloruro de polivinilo, dos válvulas de inyección y PTFE, y columnas de longitud variable empaquetadas con material absorbente, El Oasis. La columna trabaja a 30 rev./min y 1 loop de 300.

En primer lugar pasamos 1ml de acetonitrilo y 1ml de agua purificada para el acondicionamiento de las columnas absorbentes.

A continuación se pasa 4ml/min a través de la columna absorbente, donde la ivermectina quedará absorbida y la matriz se eliminará.

Finalmente se rellena el bucle con acetonitrilo para recuperar la muestra que ha quedado en la columna. En un vial tendremos 400µl de muestra la cual se conservará a -20°C para su posterior análisis. [5]



Figura 17: Bomba peristáltica

5.2.3.4. Cromatógrafo de líquidos

El análisis LC / ESI – MS / MS consistió en un sistema de HPLC Agilent Tipo 1100 conectado a un analizador de Ion Trap MS (Esquire 6000 de Bruker Daltonics) equipado con una fuente de iones de electrospray (ESI). El sistema se controló con los paquetes de software Agilent ChemStation (versión A.06.01, Agilent Technologies) y Bruker Daltonics esquire control (versión 6.08, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los datos se procesaron con el software Data Analysis (versión 3.2, Bruker Daltonics).

La cromatografía se realizó en una columna C₁₈ Kinetex (75 mm × 3,0 mm, 3,0 μm, Phenomenex, EE. UU.) que se realizó a 40 ° C. El disolvente A de fase móvil era una solución de ácido fórmico al 0,1% (v / v) en agua y el disolvente B era ácido fórmico al 0,1% (v / v) en acetonitrilo. El caudal de la columna fue de 0.25 ml min⁻¹, el volumen de inyección fue de 1 μl y el gradiente de elución del gradiente fue el siguiente: 0–10 min 50% A-50% B; 10-15 minutos, 100% B; 15–20 min 50% A-50% B.

Un tercio del eluyente de la columna se envió a través de ESI al detector Ion Trap. Para la detección de MS / MS, la electropulverización se hizo funcionar en el modo de ión positivo, y los parámetros de la fuente de ionización fueron los siguientes: voltaje capilar, 4.0 kV; Octopole RF amplitud, 144.3 Vpp; tensión de cono 40 V; Presión de gas nebulizante, 40 psi; caudal de gas de secado, 9 l min⁻¹; Voltaje de salida capilar, 300 V; y temperatura de desolvatación, 350 ° C. La afinación del instrumento se realizó para ivermectina y abamectina mediante infusión directa de una solución de 1 μg ml⁻¹. La energía de colisión óptima en el modo MS / MS para los aductos de sodio protonados del ion molecular para la ivermectina (*m/z*.897.4) y la abamectina (*m/z*.895.4) fue de 40 eV. Para fines

cuantitativos, el instrumento operó en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM), escaneando de 50 a 2000 m/z . [6]

6. Procedimientos

Para la realización de este trabajo que trata de la utilización de la técnica de ultrasonidos para la extracción de compuestos orgánicos. En primer lugar tuvimos que poner a punto el equipo pues no sabíamos qué condiciones eran las óptimas, ya que son varios los parámetros que se pueden variar en esta técnica, los cuales son: el tiempo de extracción, la potencia de trabajo y la cantidad de disolvente en el que se encuentra la muestra.

Para ello utilizamos film de PVC destinado a la industria alimentaria, ya que de esta matriz tenemos datos obtenidos con el método oficial y nos sirven de apoyo para los que nosotros obtenemos con la sonda de ultrasonidos.

Comenzamos reproduciendo en método oficial (Soxhlet) con una cantidad de 500mg de film para saber el porcentaje máximo de plastificante capaz de extraer.

Ya conocido el tanto por ciento, trabajamos con el ultrasonidos y decidimos empezar fijando la cantidad de disolvente (30ml) y la potencia del 30%, siendo el tiempo el parámetro que varía, dos minutos y medio, cinco minutos y siete minutos y medio. Manteniendo la potencia en 30% fijamos el tiempo de 5 minutos y variamos la cantidad de disolvente, 30, 50 y 70ml. A continuación decidimos seguir manteniendo la potencia en 30% y aumentar el tiempo hasta 20 minutos variando el disolvente, 30, 70, 90 y 140ml. Por último, fijamos el tiempo en 20 minutos y 70ml de disolvente y variamos la potencia, 20, 40 y 50%.

Observamos que tanto el exceso de disolvente, como el tiempo de extracción y la potencia a la que trabaja el equipo, puede afectarnos de manera negativa en el ensayo, pues consideramos como condiciones óptimas: 30% de potencia de trabajo, durante 20 minutos en 70ml de disolvente.

Partimos sabiendo que la cantidad de plastificante que contiene el film es de 25.2%. El porcentaje de plastificante que nosotros somos capaces de extraer lo determinamos con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso de plastificantes}}{\text{masa de muestra} \cdot \text{porcentaje total de plastificantes}} \cdot 100$$

donde, el *peso de plastificantes* es la cantidad que pesamos después del rota vapor, la *masa de muestra* es la cantidad de film con la que trabajamos, en nuestro caso 500mg, y el *porcentaje total de plastificantes* es el 25,5% que nos indica la empresa que contiene el film.

Por último, cuando observamos las condiciones más óptimas y consideramos el ultrasonidos ya puesto a punto, optimizamos el equipo para tratar otra matriz diferente, el cuerpo graso y tubo digestivo del *Thorectes Lusitanicus*.

Se realiza de la siguiente manera:

1. Preparamos las muestras en tubos de ensayo para su posterior tratamiento con la siguiente composición: 100mg de cuerpo graso, 200 μ l de abamectina (patrón interno necesario para la cuantificación de ivermectina, pues ambas estructuras son muy similares), 400 μ l de agua pura, 600 μ l de acetonitrilo y el metanol que contiene el eppendorf donde se conserva el cuerpo graso.



Figura 18: Muestras de cuerpo graso y compuestos

2. Sonicamos en las condiciones de 40% de potencia y variando el tiempo, 5, 10 y 15 minutos.



Figura 19: Sonicación de la muestra

3. Homogenización de la muestra en el vortex.
4. Centrifugación durante 5min y 5000 revol./min.
5. Evaporación del disolvente acetonitrilo en el baño aportando nitrógeno.
6. Resuspensión en 5mL de agua pura.
7. Filtración en la bomba peristáltica.
8. Cromatógrafo de líquido donde podremos cuantificar la cantidad de ivermectina.

7. Resultados y discusión

7.1. Método oficial. Soxhlet

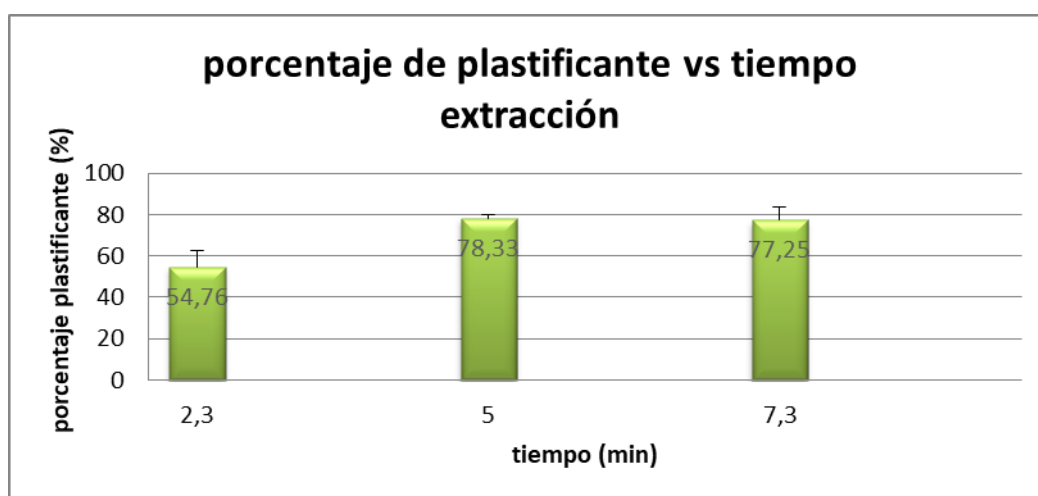
La realización de extracción de plastificantes del film con el shoxlet se llevó a cabo durante 4h recirculando continuamente 200mL de metanol, obteniendo un porcentaje máximo de plastificantes de 81,75%.

7.2. Puesta a punto de la técnica de ultrasonidos

Como anteriormente se ha descrito, en primer lugar realizamos la extracción con ultrasonido en un volumen constante de 30 ml de hexano y potencia del 30%, variando el tiempo, obteniendo los siguientes resultados.

Peso muestra (g)	Potencia (%)	Tiempo (min)	% plastificante	media %	Desv. Media
0,5	30%	2,3	59,29	54,76	7,97
			59,44		
			45,56		
		5	79,92		
			77,06		
			78,02		
		7,3	81,35		
			69,68		
			80,71		

Tabla 1: Resultados de la extracción en 30ml de hexano con el 30% de potencia variando los tiempos

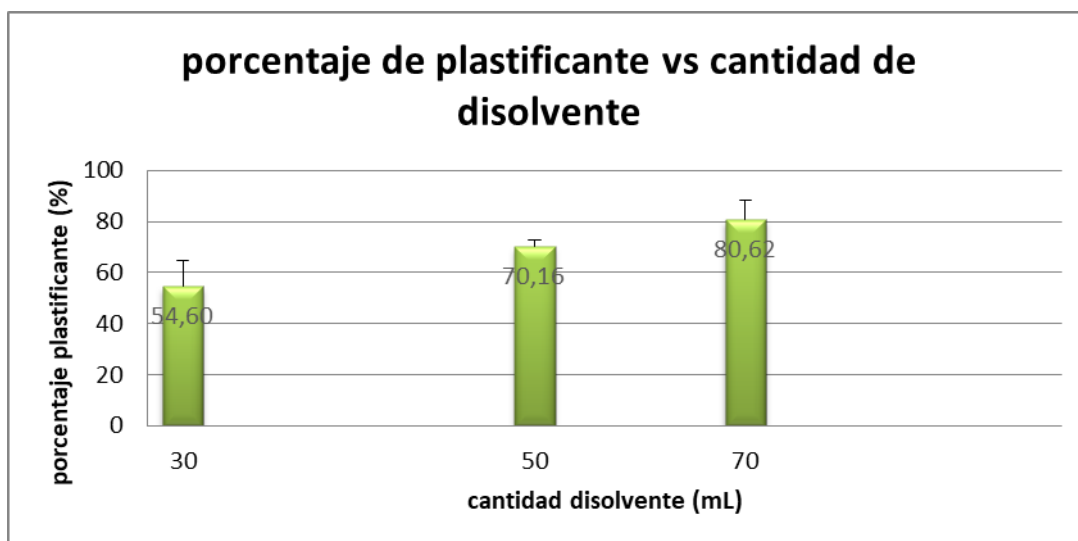


Gráfica 1: Potencia al 30% en 30 ml de disolvente variando el tiempo de extracción

Cuando se realiza el ensayo con una potencia del 30% y en un volumen de 30ml, se observa que la mejor extracción se consigue en un tiempo de extracción de 5 minutos, por lo que para el siguiente ensayo fijamos ese tiempo junto con la potencia del 30% y variamos la cantidad de disolvente.

Peso muestra (g)	Tiempo / Potencia	Disolvente (ml)	% plastificante	media %	Desv. Media
0,5	30% / 5min	30	57,70	54,60	10,12
			48,81		
			57,30		
			75,48		
			66,19		
		50	72,38		
			67,22		
			70,87		
			91,35		
			80,64		
		70	84,21		
			74,68		
			80,62		
			7,64		
			72,22		

Tabla 2: Resultados de la extracción al 30% de potencia durante 5 minutos variando la cantidad de disolvente

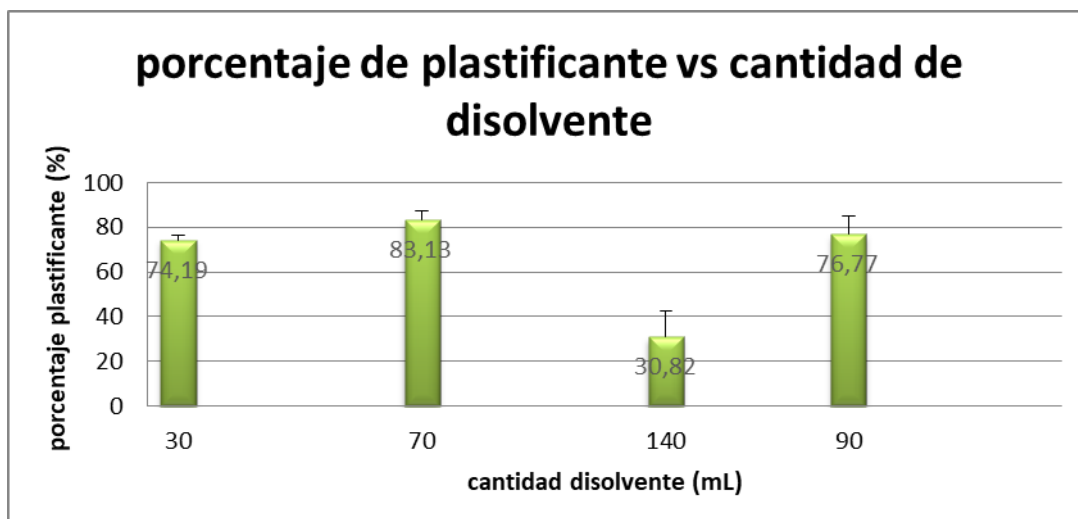


Gráfica 2: Potencia al 30% durante 5min variando la cantidad de disolvente

Vemos que la cantidad extraída durante 5 minutos en 30ml de disolvente ha pasado de un 78,33%, un valor cercano al obtenido con el shoxlet (81,75%), a un 54,60%, por lo que decidimos aumentar el tiempo de extracción a 20min manteniendo fija la potencia de 30% y variando la cantidad de disolvente.

Peso muestra (g)	Tiempo / Potencia	Disolvente (ml)	% plastificante	media %	Desv. Media
0,5	30% / 20min	30	76,67	74,19	2,25
			71,98		
			72,62		
			75,48		
		70	78,41	83,13	4,43
			84,05		
			81,27		
			88,81		
		140	43,81	30,82	11,62
			27,22		
			21,43		
			21,43		
90	87,14	76,77	8,31		
	79,68				
	71,27				
	68,97				

Tabla 3: Resultados de la extracción al 30% de potencia durante 20 minutos variando la cantidad de disolvente

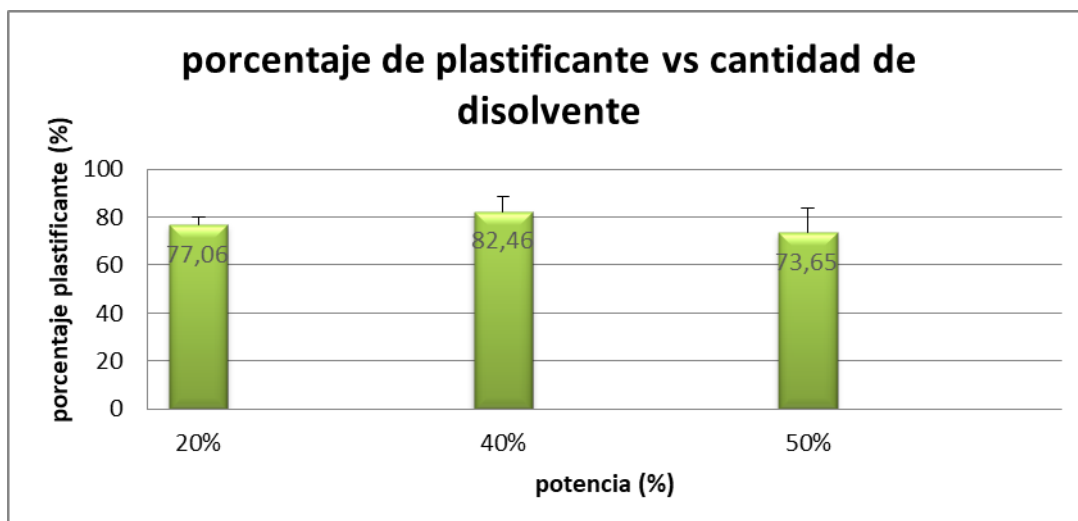


Gráfica 3: Potencia al 30% durante 20min variando la cantidad de disolvente

Comparando los resultados nos damos cuenta de que superamos los valores anteriores obtenidos e incluso lo valores que se obtienen con el método oficial (81,75%), consiguiendo extraer el 83,13% de plastificantes. Pero aún nos queda un último parámetro para poder poner a punto este método. Manteniendo fijo el tiempo y cantidad de disolvente variamos la potencia a la que trabaja el ultrasonidos.

Peso muestra (g)	Tiempo / Disolvente (mL)	Potencia	% plastificante	media %	Desv. Media
0,5 - compacto	20min / 70mL	20%	77,06	77,06	3,09
			73,97		
			80,16		
		40%	89,68	82,46	6,33
			79,84		
			77,86		
		50%	61,59	73,65	10,03
			80,87		
			66,43		

Tabla 4: Resultados de la extracción durante 20min en 70mL variando la potencia de trabajo



Gráfica 4: Tiempo de extracción 20min en 70ml de disolvente variando la potencia

Finalmente seleccionamos como condiciones óptimas de trabajo del equipo de ultrasonidos una potencia del 30%, en 70 mililitros de disolvente durante 20 minutos.

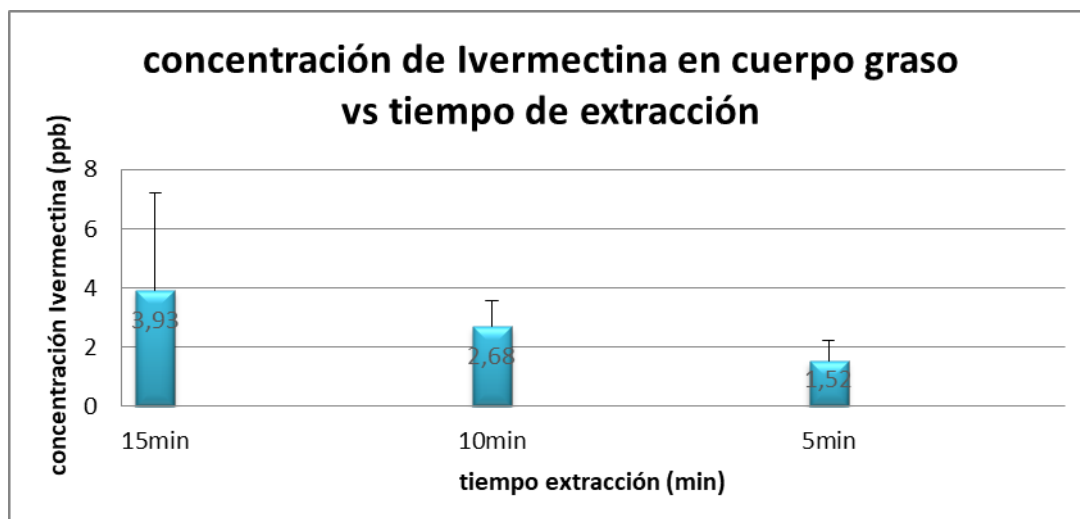
7.3. Sonicación de las muestras de cuerpo graso

Tras realizar el procedimiento como anteriormente se ha indicado, obtenemos los siguientes resultados.

CUERPO GRASO

Muestra (mg)	Parámetros Ultrasonidos		[] obtenida	Media	Desv. Est. Media
	Tiempo	Potencia			
1 (95)	15min	40%	1,23	3,93	3,289
2 (90)			3,83		
3 (100)			1,63		
4 (99)			9,45		
5 (98)			3,49		
6 (100)	10min	40%	2,53	2,68	0,90
7 (100)			2,94		
8 (96)			3,52		
9 (100)			1,22		
10 (97)			3,21		
11 (95)	5min	40%	1	1,52	0,69
12 (101)			1,55		
13 (100)			2,49		
14 (57)			1,04		

Tabla 5: Resultados de la extracción de la Ivermectina contenida en el cuerpo graso manteniendo la potencia de trabajo al 40% y variando el tiempo

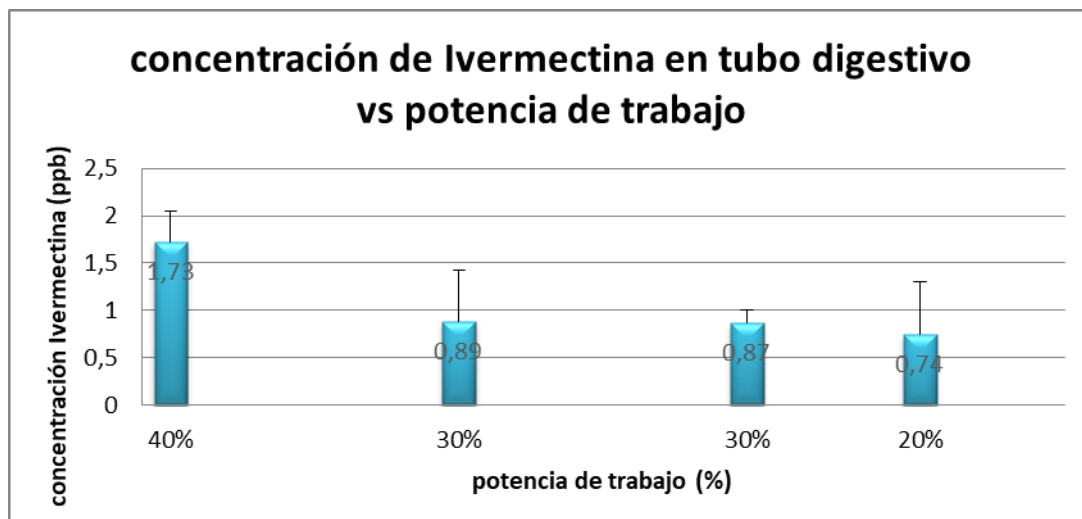


Gráfica 5: Concentración en ppb de Ivermectina en el cuerpo graso frente al tiempo de extracción

TUBO DIGESTIVO

Muestra (mg)	Parámetros Ultrasonidos Tiempo Potencia	[] obtenida	Media	Desv. Est. Media
14 (102) 2 (99) 3 (96) 4 (98) 1 (101)	5 min 40%	1,95 1,4 2,02 1,37 1,9	1,73	0,32
6 (99) 7 (100) 8 (103) 9 (101) 10 (97)	5 min 30%	0 1,38 1,11 1,12 0,83	0,89	0,53
11 (100) 13 (101) 5 (104)	5 min 30%	0,98 0,71 0,91	0,87	0,14
12 (102) 15 (98) 16 (97)	5min 20%	0,48 1,39 0,36	0,74	0,56

Tabla 6: Resultados de la extracción de la Ivermectina contenida en el tubo digestivo manteniendo el tiempo de trabajo en 5 minutos y variando la potencia



Gráfica 6: Concentración en ppb de Ivermectina en el cuerpo graso frente a la potencia de trabajo

Tras realizar la extracción y cuantificación de Ivermectina observamos como el tiempo y la potencia son parámetros determinantes en la sonicación.

8. Conclusiones

La realización de este trabajo nos ha llevado a las siguientes conclusiones:

Las condiciones óptimas del ultrasonidos para la máxima extracción de plastificantes en el film de PVC son; la potencia al 30% durante 20 minutos y la muestra que se encuentre en 70ml de disolvente.

La metodología propuesta implica la reducción de un 28% en el volumen de disolvente extractor y del 8'3%.

Cuando trabajamos con el cuerpo graso de *Thorectes Lusitanicus*, la máxima extracción de Ivermectina se realiza en unas condiciones del 40% de potencia durante 15 minutos.

Mientras que para la extracción de ivermectina en el tubo digestivo las condiciones varían respecto al cuerpo graso, siendo el 40% de potencia durante 5 minutos.

Como conclusión final, consideramos que el método de extracción asistida con ultrasonidos proporciona resultados favorables, si bien las condiciones óptimas hay que ponerlas a punto según la naturaleza de cada matriz y del compuesto objetivo a extraer.

9. Bibliografía

- [1] Farid Chemat, Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Maryline Abert-Vian. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistr*, January 2017, volume 34, 540-560.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716302358?via%3Dihub>
- [2] Zalua Rodríguez-Riera, Malvis Robaina-Mesa, Ulises Jáuregui-Haza, Alejandro Blanco-González y Jorge E. Rodríguez-Chanfrau. Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuesto bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual u perspectivas/Use of ultrasound radiation for extraction of bioactive compounds from natural sources. Current events and persp. *CENIC Ciencias Químicas*, 2014, volumen 45.
<https://revista.cnic.edu.cu/revistaCQ/articulos/empleo-de-la-radiaci%C3%B3n-ultras%C3%B3nica-para-la-extracci%C3%B3n-de-compuestos-bioactivos>
- [3] Antonio J. Ortiz. Tema 6. Reactividad asistida por microondas, fotoquímica y sonoquímica. *Apuntes de clase*, 2018.
- [4] AENOR. Materiales y artículos en contacto con productos alimenticios. Plásticos. Parte 2: Métodos de ensayo para la migración global en aceite de oliva por inmersión total. UNE-EN-1186-2. Madrid: AENOR, 2002.
https://www.researchgate.net/publication/270273043_Empleo_de_la_radiacion_ultrasonica_para_la_extraccion_de_compuestos_bioactivos_provenientes_de_fuentes_naturales_Estado_actual_y_perspectivas
- [5] Antonio J. Ortiz, Vieyle Cortez, Abdelmonaim Azzuouz, José R. Verdú. Isolation and determination of ivermectin in post-mortem and in vivo tissues of dung beetles using a continuous solid phase extraction method followed by LC-ESI⁺-MS/MS. *Plos One*, February 2017.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172202>