UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE BIOCIDAS DE ORIGEN NATURAL MEDIANTE EL USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Nicolás A. Gañán

DIRECTORES

Dr. Esteban A. Brignole

Dr. Julio A. Zygadlo

BAHIA BLANCA ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química / de la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) dependiente de CONICET y la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre febrero de 2009 y marzo de 2014, bajo la dirección del Dr. Esteban A. Brignole (Universidad Nacional del Sur) y el Dr. Julio A. Zygadlo (Universidad Nacional de Córdoba).

Nicolás A. Gañán

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el …./…./…... , mereciendo la calificación de .....(……)

A mi mamá,

por estimular y responder

mis primeras preguntas

AGRADECIMIENTOS

Me resulta muy grato y necesario agradecer a las personas que, de un modo u otro, han contribuido al desarrollo de esta tesis, consciente de que la lista nunca estará completa y de que muchos círculos se entrecruzan.

En primer lugar, a mis directores. A Esteban Brignole, por haber guiado los pasos de este trabajo y haber depositado en mi su confianza; por brindar siempre su experiencia y sus conocimientos, con gran generosidad; por el marco de libertad que me proporcionó desde un comienzo; por la inspiración, por sus consejos y por las conversaciones compartidas en torno a los temas más variados. A Julio Zygadlo, por haber apostado a este trabajo, a pesar de la distancia; por sus útiles consejos y por las ideas que me he llevado siempre de su oficina, muchas de las cuales seguramente darán origen a interesantes colaboraciones futuras. Y a Raquel Martini, mi "primera directora", la que preparó mi llegada a PLAPIQUI y guió aquí mis primeros pasos. Ha sido para mí un gran gusto haber trabajado con ellos (y seguir haciéndolo).

A las instituciones que con su apoyo económico permitieron la realización de esta tesis: CONICET y ANPCYT, así como a las Universidades Nacionales de Córdoba (SECYT) y del Sur.

A Guillermo Mabe, el querido Willy. Por haberme brindado toda su ayuda y su conocimiento en el manejo de los equipos de alta presión; por las horas pasadas en la planta piloto, armando, desarmando, ajustando, haciendo pruebas, y por las charlas compartidas durante esas largas horas.

A los compañeros del grupo de "Termo": Susana, Selva, Marcelo, Gloria, Pablo, Fran, Guille, Ticiana, Mariana, Naty... Por contribuir a crear un clima de trabajo agradable, por el compañerismo, por las charlas, por las rondas de café, por estar siempre dispuestos a brindar su ayuda, su consejo... ¡y su auto!

Al personal de PLAPIQUI, por su siempre buena predisposición, por hacer que todo funcione como funciona. Al personal del taller, y especialmente a Beto, por su gran apoyo

en el trabajo experimental, por su esmerada ayuda, por sus piezas casi artesanales, por cada explicación técnica.

A Nora, por ser el "hada madrina" de los becarios.

A los amigos y compañeros de PLAPIQUI, por los asados, fiestas, viajes y reuniones varias que pusieron su color a mi paso por Bahía. A Andrés y Pili, amigos colombianos que llegaron a ser como hermanos.

A los amigos y compañeros del IDTQ, por todo lo compartido y lo por venir. En especial a mis compatriotas cordobeses con quienes compartí casa, oficina, fiestas y varios etcéteras durante mi estadía en Bahía: a José (un hermano de la vida), Gerardo, Juan M., Juan R., Alexis. A Martín, por todos los estímulos preliminares para sumarme a este proyecto.

A Hermínio Sousa y su equipo de la Universidad de Coimbra, por la enriquecedora estadía que compartí con ellos. Por abrirme las puertas y brindarme todo lo necesario para disfrutar y aprovechar la experiencia.

A Jimena y Yamile, becarias de la UNC, por las ganas que le pusieron a los ensayos de actividad biocida y por permitirme presentar sus resultados.

A mis amigos de siempre y los que son como si fueran de siempre, por su compañía, su apoyo, sus complicidades. Por haberme acompañado en las distintas etapas de mi vida y haber contribuido a ser éste que soy.

A Lau. Por aquellos mates cebados junto al equipo experimental y aquellas caminatas por la Carrindanga, que poco a poco y sin darnos cuenta nos convirtieron en compañeros de vida, de viajes, de gatos, de sueños.

Finalmente, y en especial, a mi familia: mis hermanas Pau y Flor, mi viejos, mis abuelos. Por su amor incondicional, por respetar y apoyarme en cada decisión, por los valores recibidos, por cada estímulo, por cada preocupación, por cada simple y breve momento compartido que, como granitos de arena, me fueron dando forma.

RESUMEN

En esta tesis se estudió el fraccionamiento de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas comunes en el país mediante el uso de dióxido de carbono supercrítico, con el objetivo de obtener compuestos o fracciones con actividad biocida. Se seleccionaron tres plantas: *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* y *Mentha piperita*. La extracción del aceite esencial se realizó mediante hidrodestilación, determinándose su composición mediante cromatografía de gases.

Como parte de esta tesis, se construyó un equipo experimental de alta presión, con el cual se realizaron mediciones de solubilidad y composición de la fase supercrítica para cada sistema [CO_2 + aceite esencial] en distintas condiciones de presión y temperatura (70–120 bar, 313–323 K), utilizando el método dinámico o de gas saturado. Se realizaron también ensayos de fraccionamiento semicontinuo para determinar la influencia de la composición en el grado de separación.

Con los resultados experimentales obtenidos se validó un modelo termodinámico predictivo basado en la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS), previo ajuste de los parámetros necesarios con datos provenientes de otras fuentes. Utilizando dicho modelo como base, y reduciendo la complejidad de los sistemas en términos de dos o tres pseudo-componentes, se realizaron simulaciones de columnas de fraccionamiento de múltiples etapas en contra-corriente, analizando la influencia de las variables operativas (presión, temperatura, relación solvente/ alimentación, relación de reflujo, etc.) con el objetivo de hallar condiciones recomendables de operación para separar los compuestos biocidas de interés. En el análisis, se utilizaron herramientas y consideraciones de la Ingeniería del Equilibrio de Fases.

En el caso del aceite de *T. minuta* se procuró separar la fracción de cetonas insaturadas (ocimenonas); en el caso del aceite de *S. officinalis* se planteó la purificación de la fracción de monoterpenos oxigenados, separándolos a la vez de los hidrocarburos y de los sesquiterpenos; en el caso del aceite de *M. piperita* se planteó la separación de mentona y mentol.

La actividad biocida de las fracciones obtenidas experimentalmente a partir del aceite de *T. minuta* fueron ensayadas frente a dos parásitos: el gorgojo del maíz y el nemátodo del nudo de la raíz.

ABSTRACT

The fractionation of essential oils from local aromatic species using supercritical carbon dioxide was studied, in order to obtain compounds or fractions with biocidal activity. Three species were chosen: *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* y *Mentha piperita*. The essential oil was extracted by hydrodistillation and its composition determined by gas chromatography.

As a part of this project, a lab-scale high-pressure experimental apparatus was built. With this equipment, measurements of solubility and composition in the supercritical phase were performed for each [CO_2 + essential oil] system at different pressure and temperature conditions (70–120 bar, 313–323 K), using a dynamic or gas saturated method. Semi-continuous fractionation experiments were also carried out in order to determine the effect of composition in the separation performance.

With the experimental data a predictive thermodynamic model based on the group contribution equation of state (GC-EOS) was validated, after fitting the necessary parameters with data from other sources. With this model as background, and reducing the systems complexity in terms of two or three pseudo-components, simulations of multistage counter-current columns were carried out, analyzing the influence of the operation parameters (pressure, temperature, solvent-to-feed ratio, reflux ratio, etc.), in order to find recommended conditions for the separation of the biocidal components. In this analysis, phase equilibrium engineering tools and considerations were applied.

In the case of *T. minuta*, the goal was to isolate the unsaturated ketones fraction (ocimenones); in the case of *S. officinalis* the goal was the separation of the oxygenated monoterpenes fraction from both the hydrocarbon and the sesquiterpene fraction; finally in the case of *M. piperita* the separation between menthone and menthol was proposed.

The biocidal activity of the fractions obtained experimentally from *T. minuta* oil was tested against the corn weevil and the root knot nemathod.

ÍNDICE

PREFACIO iii
DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTOS vii
RESUMEN ix
ABSTRACT xi
ÍNDICE xiii

SECCIÓN I : INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

1. Introducción: Los aceites esenciales como fuente de biocidas de origen natural

1.1. Biocidas de origen natural 3
1.1.1. Definiciones y clasificaciones 3
1.1.2. Plaguicidas. Importancia económica y sanitaria 5
1.1.3. Plaguicidas. Breve desarrollo histórico 6
1.1.4. Bioplaguicidas. Ventajas y perspectivas 8
1.2. Aceites esenciales 10
1.2.1. Definición y composición química. Terpenos 10
1.2.2. Aspectos botánicos 13
1.3. Actividad biocida de aceites esenciales 14
1.3.1. Aspectos generales 14
1.3.2. Aceite esencial de *Tagetes minuta* 15
1.3.3. Aceite esencial de *Salvia officinalis* 22
1.3.4. Aceite esencial de *Mentha piperita* 23
1.4. Evaluación de la actividad biocida 26
1.4.1. Métodos de evaluación 26
a) Toxicidad fumigante 26
b) Toxicidad de contacto 27
c) Repelencia 27
1.4.2. Toxicidad de cetonas de *Tagetes minuta*: dos casos de estudio 29
a) Actividad biocida frente al gorgojo de maíz 29
b) Actividad nematicida 33
1.5. Objetivos y estructura de la tesis 34
1.5.1. Objetivos 34
1.5.2. Estructura de la tesis 35
REFERENCIAS 36

2. Fluidos supercríticos. Aspectos fundamentales

2.1. Fluidos supercríticos 43
2.2. Propiedades fisicoquímicas 47
2.2.1. Propiedades termofísicas 48
i) Densidad y compresibilidad 48
ii) Capacidad calorífica 50
iii) Efecto Joule-Thompson 51
2.2.2. Propiedades de transporte 53
i) Viscosidad 53
ii) Conductividad térmica 55
iii) Coeficientes de difusión 55
iv) Tensión superficial 57
2.2.3. Propiedades en la proximidad del punto crítico 58
2.3. Solubilidad y solvatación en fluidos supercríticos 61
2.3.1. Aspectos generales 61
2.3.2. Volumen molar parcial y poder solvente 65
2.3.3. Modelos semi-empíricos de solubilidad 67
2.4. Aplicaciones de los fluidos supercríticos 68
2.4.1. Extracción 68
2.4.2. Fraccionamiento 68
2.4.3. Cromatografía 69
2.4.4. Precipitación y formación de partículas 70
i) Expansión rápida de soluciones supercríticas (RESS) 70
ii) Precipitación supercrítica por efecto anti-solvente (SAS) 70
iii) Partículas a partir de soluciones saturadas de gas (PGSS) 71
iv) Impregnación con solventes supercríticos (SSI) 71
2.4.5. Reacción 71
2.5. Conclusiones 72
REFERENCIAS 73

3. Fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales e Ingeniería del equilibrio entre fases

3.1. Fraccionamiento con fluidos supercríticos 77
3.1.1. Aspectos generales 77
3.1.2. Columnas de fraccionamiento 79
3.1.3. Tipos de columnas de fraccionamiento 83
3.1.4. Fraccionamiento de mezclas naturales. Aspectos operativos 86
3.1.5. Capacidad, selectividad, recuperación 87
3.1.6. Fraccionamiento de sistemas terpénicos. Antecedentes 89
i) Desterpenado de aceites cítricos 90

ii) Extracción fraccionada de aceites herbales 93
iii) Fraccionamiento de concretos y oleorresinas 97
iv) Fraccionamiento de aceites obtenidos por destilación 98
3.1.7. Conclusiones 101
3.2. Fraccionamiento supercrítico y equilibrio entre fases 102
3.2.1. Ingeniería del equilibrio entre fases 102
3.2.2. Diagramas de fases 103
3.2.3. Análisis de la separación y ventana operativa 108
REFERENCIAS 110

SECCIÓN II:
FRACCIONAMIENTO SUPERCRÍTICO DE ACEITES ESENCIALES CON ACTIVIDAD BIOCIDA

4. Materiales, equipos y métodos experimentales

4.1. Medición del equilibrio de fases a alta presión 117
4.1.1. Aspectos generales 117
4.1.2. Métodos analíticos 118
a) Métodos analíticos isotérmicos 119
b) Métodos analíticos isobáricos 121
c) Métodos analíticos isotérmico-isobáricos ("dinámicos") 121
4.1.3. Métodos sintéticos 123
4.1.4. Selección de un método experimental 125
4.2. Equipo experimental de la tesis 128
4.2.1. Extractor supercrítico semicontinuo 128
4.2.2. Procedimientos experimentales 131
a) Procedimiento de carga 131
b) Procedimiento de medición 132
c) Procedimiento de recuperación del refinado 133
d) Procedimiento de descarga y limpieza 134
4.2.3. Análisis cromatográfico 134
4.2.4. Puesta a punto y validación del equipo experimental 135
i) Control de temperatura y presión 135
ii) Sistema de condensación del extracto 136
iii) Validación del equipo 137
4.3. Materiales 139
4.3.1. Obtención de los aceites esenciales 139
4.3.2. Caracterización de los aceites esenciales 143
4.3.3. Otros materiales 144
4.4. Conclusiones 147
REFERENCIAS 148

5. Modelado termodinámico del equilibrio entre fases

5.1. Modelado del equilibrio entre fases a alta presión 153
5.1.1. Aspectos generales 153
a) Ecuaciones de estado (enfoque *fi-fi*) 156
b) Modelos de energía de Gibbs de exceso (enfoque *gama-fi*) 158
5.1.2. Modelado termodinámico de sistemas asimétricos 159
5.1.3. Selección de un modelo termodinámico 161
5.2. Ecuación de Estado a Contribución Grupal (GC-EOS) 162
5.2.1. Descripción del modelo 162
a) Término atractivo de la GC-EOS 165
b) Término repulsivo de la GC-EOS 165
5.2.2. Parametrización 166
5.2.3. Subrutinas de cálculo 167
5.3. Modelado de sistemas CO_2 + aceite esencial 169
5.3.1. Pautas generales 169
5.3.2. Verificación de los parámetros de grupo cetónico 171
5.3.3. Ajuste de parámetros de interacción cetona/olefinas 173
5.3.4. Reproducción de la presión de vapor de terpenos puros 175
5.3.5. Reproducción de ELV de sistemas binarios CO_2+terpeno 178
5.4. Conclusiones 183
REFERENCIAS 184

6. Resultados experimentales y discusión

6.1. Mediciones de equilibrio multicomponente 189
6.1.1. Sistema CO_2 + aceite de *T. minuta* 190
6.1.2. Sistema CO_2 + aceite de *S. officinalis* 195
6.1.3. Sistema CO_2 + aceite de *M. piperita* 199
6.1.4. Conclusiones y discusión. Volatilidad binaria vs. multicomponente 203
6.2. Fraccionamiento semicontinuo 205
6.2.1. Ensayos y cálculos 205
6.2.2. Fraccionamiento de aceite de *T. minuta* 207
6.2.3. Fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* 212
6.2.4. Separación de isómeros y estereoisómeros 216
6.2.5. Selectividad y recuperación en el fraccionamiento semicontinuo .. 219
6.3. Conclusiones 221
REFERENCIAS 222

7. Simulación y análisis de columnas en contra-corriente

7.1. Modelado de la separación en contra-corriente 225
7.1.1. Aspectos generales 225
7.1.2. Aspectos fluidodinámicos y de diseño de la columna 228
7.1.3. Esquemas de proceso y nomenclatura 229
7.1.4. Criterios y consideraciones de análisis 230
7.2. Fraccionamiento de aceite de *Tagetes minuta* 231
7.2.1. Análisis preliminar de las condiciones de operación 231
7.2.2. Operación en contra-corriente simple 233
7.2.3. Efecto de un gradiente de temperatura 236
7.2.4. Columna con reflujo externo 238
7.2.5. Efecto de la composición del aceite 241
7.3. Fraccionamiento de aceite de *Salvia officinalis* 243
7.3.1. Análisis de la columna I 244
7.3.2. Análisis de la columna II 250
7.4. Fraccionamiento de aceite de *Mentha piperita* 252
7.5. Conclusiones 256
REFERENCIAS 257

8. Conclusiones y trabajos a futuro

8.1. Conclusiones de la tesis 259
8.2. Trabajos a futuro 263

SECCIÓN I

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

1. **Introducción: Los aceites esenciales como fuente de biocidas de origen natural**

2. **Fluidos supercríticos. Aspectos fundamentales**

3. **Fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales e Ingeniería del equilibrio entre fases**

1. Introducción: Los aceites esenciales como fuente de biocidas de origen natural

Por su boca las plantas se ponían a hablar
y pregonaban sus propios poderes…

ALEJO CARPENTIER
Los pasos perdidos

1.1. Biocidas de origen natural

1.1.1. Definiciones y clasificaciones

En un sentido general, *biocida* es toda sustancia capaz de producir un daño y/o la muerte a un organismo. El establecimiento de marcos regulatorios para su uso y comercialización ha llevado a la elaboración de definiciones y clasificaciones más precisas y sistemáticas, como por ejemplo:

> ***Agentes biocidas*** *son aquellas sustancias y/o preparaciones que contienen una o más sustancias activas, preparadas en la forma en que son suministradas al usuario, y que apuntan a destruir, repeler, volver inofensivo, prevenir la acción o ejercer algún efecto de control sobre cualquier organismo perjudicial, por medios químicos o biológicos* [1].

La naturaleza es pródiga en este tipo de compuestos que, con diversos grados de actividad, constituyen generalmente mecanismos de protección y defensa de animales y plantas frente a otros organismos invasores o competidores. Desde tiempos antiguos se observó, por ejemplo, que ciertas plantas no crecían en la proximidad de otras, o que los insectos no se acercaban a ellas, o que la ingestión de ciertas especies vegetales podía producir diversos efectos nocivos. Y, de una manera intuitiva y tradicional, se comenzó a

hacer uso de ellas y de su potencial tóxico, primero en su forma natural –hojas, raíces, frutos– y luego, con el desarrollo de tecnologías más avanzadas, extrayendo y concentrando sus principios activos. La mayor complejidad de la organización social llevó al surgimiento de individuos especializados en el conocimiento y administración de dichas plantas y extractos –generalmente en un marco religioso o mágico. En la civilización moderna, podría decirse que dicha función fue "heredada" por los naturalistas, botánicos, farmacéuticos, químicos, médicos, cargándose de un bagaje científico que permitió conocer más sistemáticamente la naturaleza y mecanismos de acción de dichas sustancias, y por lo tanto un uso más racional, sin hablar de la gran posibilidad abierta en el siglo XX de sintetizar compuestos activos más "efectivos" que los naturales. Pero en sociedades más tradicionales, o menos influenciadas por la vida moderna, es frecuente ver todavía un uso de dichas plantas y sustancias basado fundamentalmente en la observación y la transmisión intergeneracional.

De acuerdo al criterio adoptado, diferentes *clasificaciones* de las sustancias biocidas son posibles, por ejemplo:

- según el ***organismo*** sobre el que actúan: antimicrobianos (bactericidas, fungicidas), insecticidas, herbicidas, nematicidas, rodenticidas, etc.
- según su ***naturaleza química***: organofosforados, organoclorados, terpenos, alcaloides, fenólicos, sales inorgánicas, etc.
- según su ***selectividad***: específicos o de amplio espectro.
- según su ***mecanismo de acción***: neurotóxicos, citotóxicos, desorganizadores de la membrana celular, inhibidores enzimáticos, etc.
- según su ***origen***: naturales o sintéticos; inorgánicos, botánicos o microbianos, etc.

No existe un biocida "ideal", sino biocidas más o menos adecuados a cada caso particular. Sin embargo, hay algunas características deseables que debería reunir un buen biocida:

a) ser efectivo a baja concentración, tanto por motivos económicos como de salud;
b) tener persistencia suficiente, es decir, una acción duradera en el tiempo;
c) tener baja toxicidad para el ser humano y otros mamíferos;
d) ser soluble en agua;
e) ser compatible y no reactivo con otros compuestos ambientales;
f) poseer mecanismos de inactivación rápida y controlable.

1.1.2. Plaguicidas. Importancia sanitaria y económica.

Dentro de la amplia clasificación de productos biocidas, los ***plaguicidas*** ocupan un lugar importante, tanto por motivos sanitarios como económicos.

> ***Plaguicida*** *es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas y animales que causan perjuicios o que interfieren de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas (incluyendo no alimenticios como el algodón, remolacha azucarera y otros), madera o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas. El término incluye las sustancias usadas como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de frutas o evitar la caída prematura de frutas y las sustancias usadas antes o después de las cosechas para proteger a los productos del deterioro durante el transporte y almacenamiento* [2].

Es conocida la cantidad de enfermedades ocasionadas por la proliferación de parásitos, en especial insectos y otros artrópodos, que actúan como vectores de microorganimos patógenos. La malaria, el dengue, el mal de Chagas, la fiebre amarilla, etc. son enfermedades endémicas en amplias regiones del mundo, incluyendo nuestro país [3].
Por otra parte, las pérdidas económicas asociadas a los daños ocasionados por numerosos parásitos a las cosechas y productos almacenados son también significativas, y motivo de preocupación. Tales pérdidas no sólo se limitan a los daños materiales, sino también a la pérdida de calidad –y por consiguiente, de valor y de destinos posibles de exportación. En efecto, algunos mercados prohíben el ingreso de productos agrícolas provenientes de zonas infestadas o les exigen costosos tratamientos cuarentenarios [4][5]. En la Tabla 1.1 se enumeran las principales plagas cuarentenarias de impacto económico en la Argentina.

Tabla 1.1. Plagas cuarentenarias de interés económico en Argentina [4]

Plaga	***Tipo de plaga***	***Cultivos afectados***
Carpocapsa (*Cydia pomonella*)	Gusano en estadio de larva	Manzana, pera, membrillo, nuez
Mosca de los frutos (*Ceratitis capitata, Anastrepha fraterculus*)	Insecto adulto	Cítricos, frutales de hueso y de pepita
Picudo del algodonero (*Anthonomus grandis*)	Insecto adulto	Algodón
Cancro citrícola (*Xanthomonas axonopodis*)	Bacteria	Cítricos
Mancha negra (*Guignardia citricarpa*)	Hongo	Cítricos
Roya asiática (*Phakospora pachyrhizi*)	Hongo	Soja

1.1.3. Plaguicidas. Breve desarrollo histórico

Casida y Quistad [6] han presentado una buena revisión de la evolución histórica de los plaguicidas, en la que pueden reconocerse "épocas" o "hitos" caracterizados por un concepto predominante.

Antes del siglo XX, la práctica más común era la de fumigar los cultivos con soluciones acuosas de sustancias inorgánicas, como azufre o arsénico –venenos de acción general–, u orgánicas, como hidrocarburos. Se los considera plaguicidas "de primera generación", y aún puede verse su uso en ciertas regiones rurales poco modernizadas, a pesar de sus efectos tóxicos y contaminantes generales.

Durante el siglo XIX comienza a extenderse el uso de las *piretrinas*, compuestos presentes naturalmente en las flores de plantas del género *Chrysanthemum*, cuya actividad insecticida era conocida ya desde la Antigüedad. Inicialmente se utilizó el material floral seco y molido, en suspensión acuosa, y de manera doméstica. Con el posterior desarrollo de la química, a fines del siglo XIX y principios del XX, sus estructuras fueron elucidadas y se avanzó tanto en su purificación como en su modificación química para mejorar su actividad. Las piretrinas y sus derivados se caracterizan por una alta especificidad y baja toxicidad para mamíferos y aves, aunque son altamente tóxicas para peces. Se degradan fácilmente por efecto de la luz y en el agua, generando subproductos inocuos, lo cual limita su uso en exteriores pero reduce notablemente su potencial contaminante.

Los avances en la síntesis química llevaron pronto al primer gran "hito" en la historia de los plaguicidas: el descubrimiento del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), en 1939. Este

compuesto demostró ser tan eficaz y persistente (por ejemplo, en el inmediato control de la malaria en Europa), que abrió las puertas a una intensa investigación en el campo de los compuestos *organoclorados*, con el objetivo de descubrir nuevos pesticidas más persistentes, selectivos y baratos. Llegaron así productos tales como toxafeno, aldrin, dieldrin, clordane, endosulfan, que relegaron a las piretrinas y sus derivados –así como a otros extractos naturales– a un plano secundario.

Sin embargo, hacia la década de 1970 los efectos nocivos de los pesticidas organoclorados en la salud humana y su acumulación y persistencia en el ambiente motivaron su pregresiva restricción y prohibición en Estados Unidos, y luego en muchos otros países. Poco antes habían ingresado al mercado los plaguicidas *organofosforados* –como el TEPP (tetraetil-pirofosfato) y el paratión– y los metil-carbamilados. Estos compuestos ofrecen la ventaja de tener estructuras simples, que pueden modificarse fácilmente agregando distintos sustituyentes, y de ese modo seleccionarse los derivados con las propiedades más adecuadas para cada caso. Además, son menos persistentes en el ambiente y más fácilmente biodegradables. Son los plaguicidas más utilizados actualmente a gran escala.

Paralelamente, los *piretroides* volvieron a escena, en este caso obtenidos íntegramente por síntesis química: permetrina, cipermetrina, deltametrina. Estos compuestos sintéticos ofrecen las ventajas de biodegradabilidad y selectividad, fotoestabilidad y amplias posibilidades de modificación sin perder la actividad biocida, lo cual permite contrarrestar el desarrollo de resistencias por parte de los organismos blanco.

Todos estos plaguicidas sintéticos (organoclorados, organofosforados, piretroides), más otros que se desarrollaron en las décadas siguientes, se consideran "de segunda generación".

La "tercera generación" de plaguicidas la constituyen las feromonas y reguladores del crecimiento de insectos, lo cual ya avanza hacia el concepto de "control biológico" de plagas. Pero a pesar de su notable actividad y su baja toxicidad en mamíferos, su uso en agricultura es aún muy limitado.

Actualmente existen varias estrategias en desarrollo para el control de plagas, que trascienden la idea del control químico incorporando elementos de control biológico: uso controlado de predadores o competidores naturales inocuos, esterilización o liberación de insectos estériles, uso de repelentes naturales y, en el caso de muchos cultivos, modificación genética de las especies vegetales para incorporarles características de resistencia a plagas y malezas. Este enfoque se denomina "manejo integrado de plagas"

(MIP) [7]. En este marco, los productos de origen biológico –como en tantas otras áreas– vuelven a captar interés como alternativa, por varios motivos: su amplia disponibilidad, la posibilidad de obtenerlos a partir de materiales de escaso valor o de desechos vegetales, su biodegradabilidad, su menor impacto ambiental y menor toxicidad en humanos, entre otros.

1.1.4. Bioplaguicidas. Ventajas y prespectivas

Dentro de la emergente categoría de **"bioplaguicidas",** los compuestos de origen botánico (fitoquímicos) ocupan un lugar especialmente destacado, tanto debido a su gran diversidad y abundancia, como al hecho de haber evolucionado naturalmente como mecanismo de defensa de numerosas especies vegetales contra predadores, parásitos y plagas de diversa índole.

Sin embargo, y a pesar de la abundante literatura desarrollada desde la década de 1980 al respecto, su presencia en el mercado de los plaguicidas es todavía muy limitada. Hacia el año 2000, los plaguicidas de origen botánico (principalmente piretroides) sólo representaban poco más del 1% del mercado global [8], y sólo un producto de origen botánico (derivado de la semilla de *neem*) había sido exitosamente registrado para su uso como insecticida en EEUU y Europa. No obstante esta baja participación en el mercado, su valor total ascendía a USD 1000 millones en 2010, con una proyección de USD 3000 millones para 2014, lo cual indica la gran magnitud del mercado aún potencial [9].

Isman [10][11] ha sugerido que esta disparidad entre la cantidad de bioplaguicidas conocidos y su escaso uso comercial se debe a la existencia de tres limitaciones principales en su producción y comercialización: (1) la disponibilidad de la planta a escala sustentable, (2) la estandarización de los extractos en base a la cuantificación de componentes activos, y (3) la aprobación gubernamental, que normalmente requiere una costosa evaluación toxicológica.

Numerosos extractos de origen vegetal han sido estudiados y postulados como agentes biocidas, identificándose los principales compuestos responsables de su actividad, así como los distintos mecanismos de acción tóxica [12]. Así, por ejemplo, un relevamiento reciente de trabajos reportados en literatura [13] indica que las tres principales familias de compuestos responsables de la actividad insecticida de las plantas son: (a) los terpenos, (b) los alcaloides, (c) los fenoles, como se observa en la Figura 1.1.

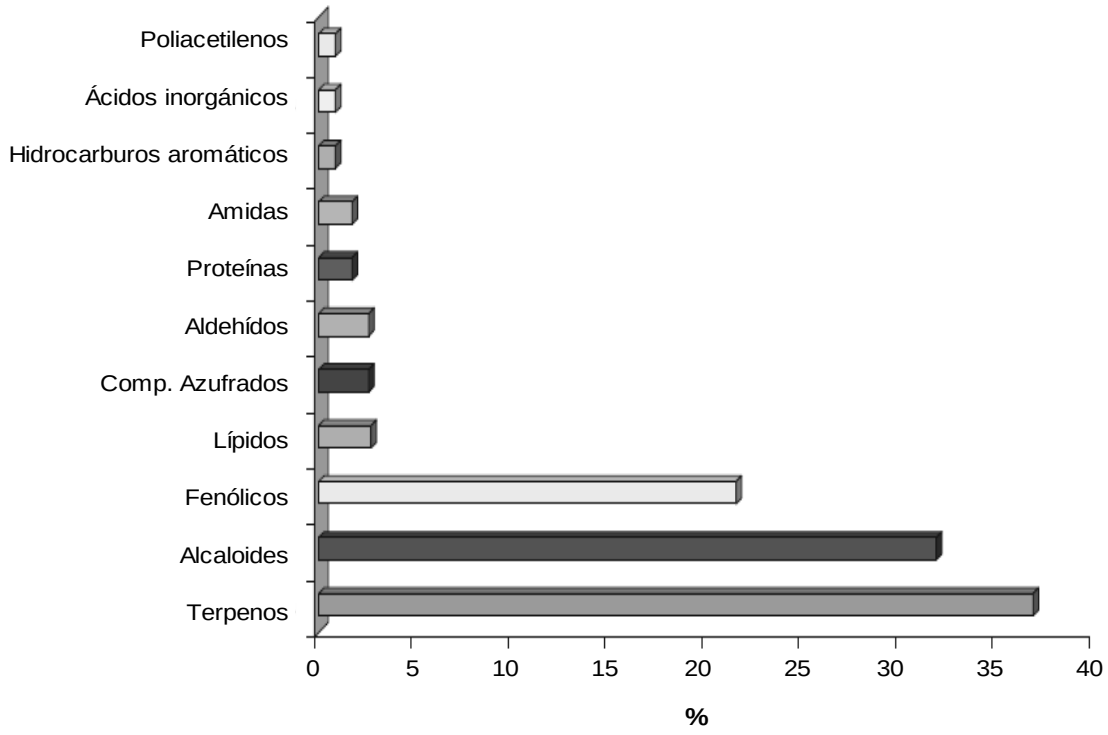


Figura 1.1.
Frecuencia (%) de tipos de compuestos químicos en extractos de plantas con actividad insecticida (relevamiento de literatura). Adaptado de [13].

Como puede verse, los **terpenos** representan más de la tercera parte de los compuestos de origen vegetal con actividad frente a insectos y otras plagas reportados en la literatura, constituyendo una alternativa prometedora con buenas perspectivas de incorporarse a sistemas combinados de manejo integrado de plagas, como lo demuestra el creciente número de investigaciones y patentes [14].

Estos compuestos son extraídos de las plantas en forma de mezclas oleosas denominadas genéricamente "aceites esenciales". A continuación se describirán sus principales características.

1.2. Aceites esenciales

1.2.1. Definición y composición química. Terpenos.

Se denomina ***aceite esencial*** al extracto volátil de numerosas plantas, obtenido tradicionalmente por hidrodestilación, de carácter oleoso, muy poco soluble o insoluble en agua, soluble en solventes orgánicos, y de aroma intenso [15].

Los aceites esenciales son mezclas a la vez complejas y simples. Son complejas ya que pueden estar constituidas por una elevada cantidad de compuestos diferentes, pero son simples por cuanto sus componentes suelen presentar un elevado grado de semejanza química. De hecho, la fracción principal de los aceites esenciales está constituida por compuestos terpénicos, a los que se suman en menor proporción otros compuestos tales como ceras, pigmentos, cumarinas, flavonoides, fenólicos, etc.

Su característica principal es su volatilidad –que los distingue de los aceites "fijos", es decir, los derivados de ácidos grasos–, por lo que también se incluye en su definición a los extractos volátiles obtenidos por otros métodos, como extracción con solventes orgánicos, con fluidos supercríticos o por prensado directo. El método y las condiciones de extracción influyen en la composición del aceite obtenido, y por lo tanto en sus características fisicoquímicas y organolépticas.

Los ***terpenos*** constituyen una familia muy diversa y numerosa de compuestos: actualmente se conocen alrededor de 30.000 moléculas diferentes. El químico alemán Otto Wallach (1847-1931) fue uno de los primeros en aislarlos a partir de los aceites esenciales conocidos en su tiempo y realizó un gran trabajo en la elucidación de sus estructuras químicas, poniendo de manifiesto las semejanzas estructurales de estos compuestos, a los que llamó "alicíclicos", es decir, a la vez alifáticos y cíclicos. Este trabajo le valió el Premio Nobel en 1910 [16]. El químico croata Leopold Ruzicka (1887-1976), quien trabajó intensamente en el campo de los compuestos terpénicos y su biosíntesis, demostró que sus estructuras podían interpretarse como unidades condensadas de isopreno (metil-1,3-butadieno, C_5H_8), unidas en disposición "cabeza-cola" o "cola-cola" [17], según se muestra en la Figura 1.2.

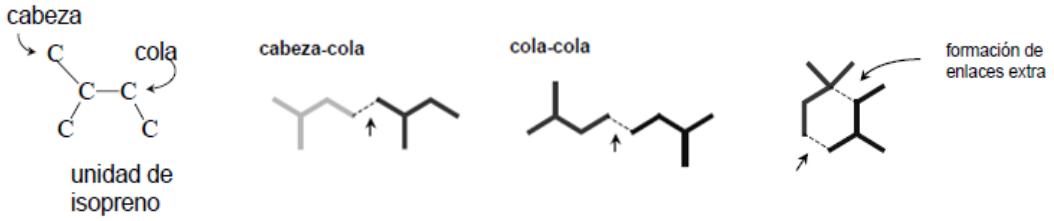


Figura 1.2. Unidad estructural de los terpenos

Este criterio de interpretación todavía prevalece en la clasificación corriente de los terpenos, basada en el número de unidades de isopreno que "contiene" la molécula, como se muestra en la Tabla 1.2, aunque algunos compuestos presentan un grado de modificación química tal que dificulta la identificación de tales unidades.

Tabla 1.2. Clasificación de los terpenos en base al número de unidades de isopreno

Estructura			***Ejemplos***
Hemiterpenos	1 unidad	C_5	isopreno
Monoterpenos	2 unidades	C_{10}	limoneno, alcanfor, mentol
Sesquiterpenos	3 unidades	C_{15}	cariofileno, guaiazuleno
Diterpenos	4 unidades	C_{20}	ác. abiético, taxol, carnosol
Triterpenos	6 unidades	C_{30}	escualeno, saponinas, esteroides
Tetraterpenos	8 unidades	C_{40}	caroteno, retinol, caucho natural

Los aceites esenciales están constituidos principalmente por monoterpenos y, en menor medida, sesquiterpenos. Dependiendo del método de extracción, una fracción de diterpenos y compuestos de mayor peso molecular (pigmentos, ceras, etc.) pueden ser también co-extraídos.

Los ***monoterpenos*** presentan una gran variedad de estructuras químicas, ya que pueden ser: (a) acíclicos, monocíclicos, bicíclicos; (b) saturados, mono-, di- o tri-insaturados; (c) alifáticos o aromáticos; (d) hidrocarbonados u oxigenados (con funciones tan diversas como alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres, ésteres). Además, existe entre los monoterpenos un alto grado de isomería geométrica y óptica. La Figura 1.3 muestra algunas estructuras monoterpénicas comunes.

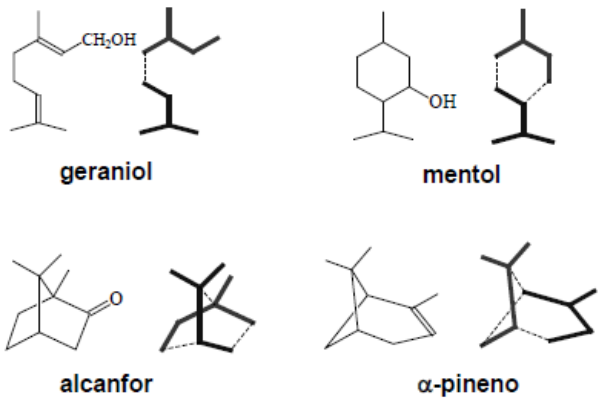


Figura 1.3. Algunas estructuras comunes de monoterpenos

La estructura C_{15} de los ***sesquiterpenos***, por su parte, da lugar a una variedad aún mayor de combinaciones. La Figura 1.4 muestra algunos ejemplos comunes.

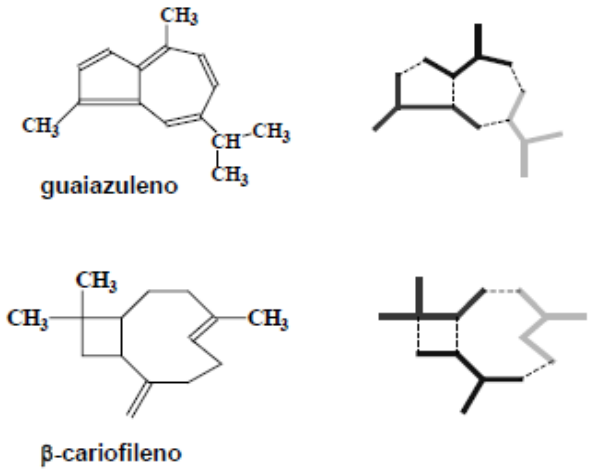


Figura 1.4. Algunas estructuras comunes de sesquiterpenos

Los monoterpenos hidrocarbonados (MT) son los constituyentes más volátiles del aceite, con rangos de temperatura normal de ebullición (NBP) de 430 a 460 K aprox. En general, su volatilidad aumenta con el número de ciclos de la molécula y con el número de ramificaciones, compensando la posible reducción introducida por las insaturaciones.
Los monoterpenos oxigenados (OT) tienen un rango de ebullición más alto, de 460 a 510 K aprox., debido al carácter polar introducido por las funciones oxigenadas. Los fenoles y ciertos aldehídos aromáticos constituyen una excepción, presentando puntos de ebullición más elevados, dentro del rango de los sesquiterpenos (ST), que van de 510 a 550 K aprox. Estas diferencias de volatilidad son aprovechadas por los métodos tradicionales de destilación para *rectificar* aceites esenciales, es decir, modificar su composición u obtener fracciones aisladas, y –como se verá– también es un factor fundamental en su separación mediante fluidos supercríticos. Por otra parte, algunos terpenos como el mentol y el alcanfor son sólidos en condiciones ambientales [15].

1.2.2. Aspectos botánicos

Los terpenos son metabolitos secundarios que cumplen múltiples ***funciones*** en las plantas, tales como:

- Defensa contra depredadores y microorganismos patógenos
- Atracción de insectos polinizadores
- Defensa contra otras plantas (alelopatía)
- Reserva de metabolitos
- Protección en procesos de cicatrización (resinas)
- Regulación de los procesos de evaporación de agua
- Intermediarios y/o desechos del metabolismo vegetal

De acuerdo a ello, pueden acumularse en distintos ***órganos*** de las plantas, como se muestra en la Tabla 1.3:

Tabla 1.3. Órganos de acumulación de aceites esenciales

Órgano	***Ejemplos***
Flores	rosa, jazmín, lavanda
Hojas	menta, eucalipto, salvia
Leños	alcanfor
Raíces	lirio, vetiver
Cortezas	canela
Frutos	anís, cítricos
Semillas	almendras, pimienta

El órgano de acumulación del aceite esencial determina en buena medida los métodos de pretratamiento y extracción más adecuados. Así, la **hidrodestilación** es el método más conveniente para extraer el aceite a partir de hojas, raíces y flores. En el caso de algunas flores –que suelen ser más sensibles a la temperatura– se usa el tradicional método del **"enfleurage",** que consiste en depositar los pétalos sobre películas de grasa, que absorben en frío los componentes aromáticos, y que luego son recuperados por lavado de la grasa con etanol. Cuando el aceite se encuentra en frutos o semillas, muchas veces el simple **prensado** es suficiente para lograr una buena extracción (como en el caso de los aceites de los cítricos, alojados en vesículas ubicadas en la piel de los frutos). Para una mayor descripción de los métodos tradicionales de obtención de aceites esenciales, se recomienda la consulta del ya clásico libro *The Essential Oils* de Guenther [15].

1.3. Actividad biocida de aceites esenciales

1.3.1. Aspectos generales

Existe una abundante literatura referida a la actividad biocida de aceites esenciales y sus componentes individuales. Se han realizado estudios comparativos (*screening*) de actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida, repelente y alelopática de aceites y terpenos provenientes de numerosas especies vegetales, correlacionando el tipo y grado de toxicidad con la composición química y determinando, en muchos casos, las concentraciones y dosis letales. Se han publicado extensivas revisiones de estos trabajos, agrupados y analizados desde distintas ópticas [18][21].

El estudio comparativo de los resultados permite extraer algunas conclusiones o tendencias generales, tal como han sintetizado varios autores [22][23]:

- Los aceites ricos en monoterpenos oxigenados (OT) suelen presentar mayor toxicidad que aquellos ricos en compuestos hidrocarbonados, si bien no es posible establecer una relación lineal directa entre potencial biocida y contenido de oxigenados.
- Dentro de la fracción de compuestos oxigenados, las cetonas son en general más activas que los alcoholes. No obstante, debe tenerse en cuenta que la actividad de estos compuestos depende en gran medida de la especie de insecto o microorganismo estudiado.
- Pequeñas variaciones estructurales pueden determinar grandes diferencias de actividad, no sólo entre isómeros estructurales, sino también entre estereoisómeros tipo *cis-trans* (o *E-Z*) y ópticos.
- Algunos aceites son más activos que su principal componente puro a igual dosis, indicando que pueden existir fenómenos sinérgicos entre componentes mayoritarios y minoritarios que resultan en un incremento de actividad.

De este modo, el conocimiento de la contribución de cada componente a la toxicidad general o específica de un aceite esencial es una herramienta útil para seleccionar las especies y variedades (o quimiotipos) más adecuadas para la producción de un biocida, o

para diseñar artificialmente mezclas de compuestos o aceites (*"blends"*) con determinadas características [23].

Asimismo, es posible modificar la composición de un aceite posteriormente a su obtención, de manera de enriquecer o purificar los componentes activos, separándolos de los componentes indeseables (por distintos motivos: actividad menor o nula, inestabilidad química, etc.) [15].

Dentro de la gran variedad de aceites esenciales cuya actividad ha sido estudiada y reportada, en esta tesis se han seleccionado tres, cuya relevancia y principales características se describen a continuación: *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* y *Mentha piperita*. Debido a su menor grado de conocimiento y a sus numerosas aplicaciones potenciales, se tratará con mayor detalle el caso del aceite de *Tagetes minuta*.

1.3.2. Aceite esencial de Tagetes minuta

El género *Tagetes* es un conjunto de plantas pertenecientes a la familia de las Asteraceae, que incluye varias especies, de las cuales las más importantes son *T. minuta*, *T. patula*, *T. erecta* y *T. tenuifolia*.

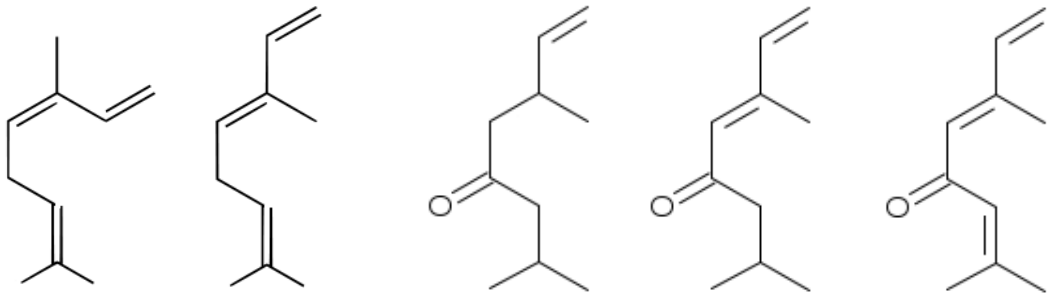
La especie *T. minuta* (también llamada *T. glandulifera*) es originaria de América del Sur, pero luego de la conquista europea se propagó rápidamente como hierba silvestre a casi todo el mundo. Crece preferentemente en zonas boscosas templadas y regiones montañosas. Es una planta anual, que puede alcanzar 1 a 2 metros de altura. La superficie inferior de sus hojas presenta numerosas pequeñas glándulas multicelulares, presentes también en los pétalos, que contienen el aceite esencial. Las flores son amarillas, pequeñas, de 10 a 15 mm de largo y 10 a 20 mm de diámetro. En América presenta distintos nombres locales dependiendo de la región: *chinchilla, chiquilla, chilca, suico, anisillo.* En inglés se conoce como *"false marigold".*

T. minuta se usa de manera tradicional desde tiempos antiguos. Pueblos americanos, africanos e hindúes aún la utilizan como hierba medicinal, mediante la preparación de una infusión para tratar enfermedades respiratorias y digestivas, y como condimento y colorante natural. Otros usos tradicionales de sus flores y hojas incluyen la decoración religiosa y un incipiente uso como insecticida o nematicida para protección de cultivos.

El aroma característico de esta planta despertó el interés de los perfumistas europeos, que extendieron su cultivo para la extracción y comercialización de su aceite esencial. Si bien

su carácter silvestre –con la consiguiente variabilidad genética asociada– ha dificultado la obtención de un aceite de características homogéneas, ha encontrado múltiples usos en la confección de perfumes, aromas y saborizantes, y un mercado creciente. En 1984, la producción mundial de "aceite de Tagetes" genérico era de 1.5 toneladas. En 1999 había alcanzado 12 toneladas. Actualmente, es de alrededor de 15 toneladas, y su precio ronda los USD 70/kg [24].

El aceite esencial de *T. minuta* está compuesto principalmente por una serie de monoterpenos acíclicos relacionados, que constituyen el 75–95% del total: el hidrocarburo insaturado β-ocimeno, y las cetonas insaturadas (estructuralmente relacionadas) dihidrotagetona, *Z*- y *E*-tagetona, *Z*- y *E*-ocimenona. La estructura química de estos compuestos puede verse en la Figura 1.5. Además de estos compuestos mayoritarios, el aceite contiene numerosos componentes secundarios, entre ellos otros monoterpenos (limoneno, α-felandreno, sabineno, mirceno, etc.) y sesquiterpenos (como α- y β-cariofileno, espatulenol).



(a) (b) (c) (d) (e)

Figura 1.5. Principales componentes del aceite de *T. minuta.* (a) Z-ocimeno, (b) E-ocimeno, (c) dihidrotagetona, (d) E-tagetona, (e) E-ocimenona

La composición del aceite es variable, y depende de múltiples factores, tales como la región geográfica, la época del año, la edad de la planta y la parte de la planta extraída. La Tabla 1.4 muestra los rangos típicos de variación en términos de la concentración de sus principales componentes.

Tabla 1.4. Rangos típicos de composición de aceite esencial de *T. minuta*

Componente	***Rango de variación (%)***
d-Limoneno	0 – 10
β-Ocimeno	10 – 50
Dihidrotagetona	2 – 62
E-Tagetona	0 – 5
Z-Tagetona	2 – 20
Z-Ocimenona	1 – 20
E-Ocimenona	2 – 50
Espatulenol	0 – 60

La variabilidad química de los aceites se traduce en una cierta variabilidad en las propiedades físicoquímicas y organolépticas. La Tabla 1.5 muestra algunas de estas características y sus rangos típicos de variación.

Tabla 1.5. Características fisicoquímicas de aceite esencial de *T. minuta* (rangos típicos) [25]

Característica	***Especificación***
Color	Amarillo a anaranjado
Olor	Verde, frutal
Peso específico (g/cm^3)	0.845 – 0.885
Índice de refracción a 27ºC	1.4890 – 1.4905
Rotación óptica a 27ºC	+2º a +1º
Miscibilidad	0.9 – 1.2 volúmenes de etanol al 80% para producir una solución clara de aceite
Valor de ésteres	18.0 – 18.7
Contenido de carbonilo (%, calculado como dihidrotagetona)	43.2 – 44.6

Vasudevan y col. [26] han revisado los distintos tipos de compuestos bioactivos presentes en *T. minuta* y sus aplicaciones actuales y potenciales. La diversidad de propiedades relevadas les permite hablar de "una planta multipropósito". Clasifican a los compuestos de interés en dos grandes grupos: bioactivos y pigmentos. Entre los primeros se incluyen terpenos, piretrinas, compuestos sulfurados (como tienilos y tiofenos) y alcaloides, con propiedades nematicidas, fototóxicas, insecticidas, larvicidas, antibacterianas y antifúngicas. En cuanto a los pigmentos, se incluyen flavonoides, carotenoides, xantofilas.

La Tabla 1.4 muestra un resumen de las investigaciones reportadas en la literatura al respecto, con sus referencias.

Tabla 1.4. Revisión de trabajos sobre actividad biocida de aceite esencial de *T. minuta*

Autores	***Especie***	***Extracto***	***Actividad***	***Ref.***
Hethelyi y col. (1987)	*T. minuta, T. erecta, T. patula, T. tenuifolia*	Aceite esencial (destilación de arrastre con vapor)	Antimicrobiana (40 bacterias y hongos)	[27]
Wells y col. (1992, 1993)	*T. minuta, T. erecta, T. patula*	Aceite esencial	Insecticida y larvicida (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*)	[28][29]
Perich y col. (1994)	*Tagetes (3 especies)*	Aceite esencial y extracto Soxhlet	Insecticida y larvicida (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*)	[30]
Tereschuk y col. (1997)	*T. minuta*	Flavonoides	Antimicrobiana (bacterias)	[31]
Scrivanti y col. (2003)	*T. minuta, S. areira*	Aceite esencial	Alelopática (maíz: *Zea mays*)	[32]
Cestari y col. (2004)	*T. minuta*	Aceite esencial	Antiparasitaria (piojo común: *Poediculus humanus capitis*)	[33]
Tomova y col. (2005)	*T. minuta*	Aceite esencial y fracciones	Antiafídica (pulgones: *Acyrtociphon pisum, Myzus persicae, Aulacorthum solani*)	[34]
Adekunle y col. (2007)	*T. minuta*	Aceite esencial y compuestos aislados	Nematicida (*Meloidogyne incognita*)	[35]
Batish y col. (2007)	*T. minuta*	Planta completa molida	Herbicida (*Echinochloa crusgalli, Cyperus rotundus*)	[36]
Stuffinengo y col. (2007)	*T. minuta, H. latifolia, Eucalyptus sp.*	Aceite esencial	Acaricida (*Varroa destructor*)	[37]
Gillij y col. (2008)	*T. minuta, T. pusilla (y otras plantas)*	Aceite esencial	Repelente (*Aedes aegypti*)	[38]
Lima y col. (2009)	*T. mendocina*	Aceite esencial	Antimicrobiana (bacterias, hongos y parásitos)	[39]
López y col. (2009)	*T. minuta*	Aceite esencial y ocimenonas	Alelopática (varias plantas)	[40]
Shahzadi y col. (2010)	*T. minuta*	Extracto de semillas	Fototóxica, insecticida, anti-malaria, antifúngica (*Plasmodium falciparum 3D7, Lemna minor, Tribolium castaneum, Rhyzopertha dominica, Callosobruchus analis*)	[41]
Chamorro y col. (2011)	*T. minuta*	Aceite esencial	Acaricida (*Varroa destructor*)	[42]
López y col. (2011)	*T. minuta, T. rupestris, T. terniflora, T. filifolia*	Aceite esencial	Insecticida, repelente (mosca de los frutos: *Ceratitis capitata*, vinchuca: *Triatoma infestans*)	[43]
Nchu y col. (2012)	*T. minuta*	Aceite esencial	Antiparasitaria (garrapata: *Hyalomma rufipes*)	[44]

Estas investigaciones permiten llegar a algunas conclusiones generales:

- *T. minuta* presenta, en general, una mayor bioactividad que otras especies del género *Tagetes.*
- *T. minuta* presenta actividad frente a una gran diversidad de organismos.
- Los extractos obtenidos de las flores y hojas presentan mayor actividad que los de otras partes de la planta.
- El método de extracción tiene gran influencia en la composición de los extractos.

La relación entre composición y bioactividad se vuelve más clara cuando se estudia el efecto comparado de aceites de distinta composición, de fracciones aisladas del aceite o de sus componentes individuales.

Siguiendo esta línea, Tomova y col. [34] estudiaron el efecto de distintas fracciones del aceite en la muerte y reproducción de áfidos ("pulgones"), plagas comunes en cultivos de legumbres, por efecto de fumigación (emisión de volátiles). Las fracciones fueron obtenidas por destilación al vacío del aceite, correspondientes a tres rangos de punto de ebullición: 30–40, 40–50 y 50–60ºC (a 1 mmHg). Se utilizó también el residuo, el aceite completo y algunos componentes puros (ocimeno, limoneno y cariofileno, obtenidos comercialmente), a los fines comparativos. Se observó que las fracciones con mayor emisión de monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos en el espacio de cabeza son más efectivas en la reducción de la población de áfidos.

Adekunle y col. [35] han observado que la dihidrotagetona (y en menor medida el β-ocimeno), aislados de aceite de *T. minuta*, presentan una fuerte actividad nematicida. Scrivanti y col. [32] y López y col. [40], por su parte, han sugerido que las ocimenonas liberadas por *T. minuta* son responsables de su actividad inhibidora de la germinación de otras plantas (alelopatía).

Estos resultados concuerdan con trabajos previamente mencionados que indican que los componentes oxigenados (OT) presentes en los aceites esenciales exhiben en general mayor actividad que los monoterpenos hidrocarbonados (MT), y que las cetonas a menudo son más efectivas que los alcoholes [22][23].

Las perspectivas comerciales han estimulado las investigaciones tendientes a un aprovechamiento más sistemático de esta especie. Soule [45], en una revisión de las principales características y usos de esta planta, destaca sus posibilidades futuras en el

marco de la búsqueda de nuevos cultivos con potencial económico. Desde el punto de vista agronómico, Singh y col. [25] han estudiado los efectos de diferentes prácticas de cultivo sobre el aclimatamiento de la planta, el rendimiento de los cultivares y la calidad del aceite obtenido, con el objetivo de convertir el cultivo de *T. minuta* en una actividad económicamente factible. Más recientemente, Ramesh y Singh [46] han reportado un estudio sobre los efectos de la época de siembra en el crecimiento, desarrollo, generación de biomasa aérea y productividad de aceite esencial. Aunque estos investigadores se enfocan en las posibilidades que presenta para el caso de la India, sus conclusiones son de aplicabilidad general.

En la Argentina, distintos autores han estudiado e intentado tipificar sus variaciones, identificando *quimiotipos*, es decir, características genéticas comunes a una variedad de plantas que determinan perfiles químicos semejantes. En particular, Gil y col. [47] determinaron la composición y rendimiento de aceite esencial obtenido de plantas de seis diferentes regiones de la Argentina (Buenos Aires, Jujuy, Mendoza, Río Negro, Salta y San Juan) e identificaron tres quimiotipos, en base a la presencia y/o predominancia de determinandos componentes:

Cluster 1: predominancia de β-ocimeno, limoneno, dihidrotagetona, *Z*- y *E*-tagetona, *Z*- y *E*-ocimenona (Buenos Aires y Jujuy)

Cluster 2: predominancia de dihidrotagetona (San Juan, Río Negro, Mendoza)

Cluster 3: alto porcentaje de α-felandreno y β-ocimeno (Salta).

Zygadlo y col. [48] analizaron la composición del aceite obtenido de plantas recogidas en diferentes lugares de la provincia de Córdoba, obteniendo características similares a las del cluster 1, aunque sin presencia de dihidrotagetona. Chamorro y col. [42] realizaron un trabajo semejante con plantas de la provincia de Chaco, obteniendo características más cercanas al cluster 2.

Todo ello indica que *T. minuta* presenta una gran variabilidad natural entre las distintas regiones del país, y que el origen geográfico de la planta es un factor fundamental a tener en cuenta a la hora de seleccionar un cultivar para el desarrollo de un aceite esencial de características homogéneas.

En cuanto a la edad de la planta, López y col. [40] han estudiado la composición del aceite esencial a lo largo del ciclo de vida en una población natural. Observaron que la cantidad de monoterpenos (tagetonas, ocimenonas) aumenta a lo largo del ciclo anual,

tanto en hojas verdes como en estructuras reproductivas, mientras que en las hojas envejecidas el principal componente es el sesquiterpeno espatulenol.

En síntesis, se observa que se trata de una planta con un gran potencial, productora de una serie de compuestos cetónicos muy poco frecuentes en otras especies vegetales y de probada actividad biocida. La purificación o concentración de sus componentes activos mediante tecnologías simples y de bajo impacto ambiental (como la tecnología de fluidos supercríticos) constituye una oportunidad de valorización de un recurso natural de amplia distribución geográfica en el país y que no es actualmente explotado, y que a su vez puede contribuir al control de plagas de importancia económica y/o sanitaria.

1.3.3. Aceite esencial de Salvia officinalis

Salvia officinalis (salvia) es una especie perteneciente a la familia de las Lamiaceae, originaria de la cuenca del Mediterráneo, pero ampliamente extendida en todo el mundo.

Además de su uso tradicional como especia culinaria, ya desde la Antigüedad se le atribuyeron propiedades curativas (de allí su nombre). Se ha reportado actividad antimicrobiana, antiviral, antiespasmódica, antiinflamatoria, anticolinesterasa y antioxidante de los extractos obtenidos de esta planta [49].

El aceite esencial de *S. officinalis* está constituido principalmente por α- y β-pineno (MT), α- y β-tuyona, 1,8-cineol, alcanfor, borneol (OT) y α-cariofileno (ST). De acuerdo al método de extracción, pueden obtenerse también extractos ricos en diterpenos, triterpenos y compuestos fenólicos, que exhiben también distintos tipos de actividad biológica [50]. El contenido de importantes cantidades de **tuyona** (cetona tóxica que puede llegar a representar hasta el 50% del total) es característico de este aceite. En la Figura 1.6. pueden verse las estructuras químicas de los principales componentes mencionados.

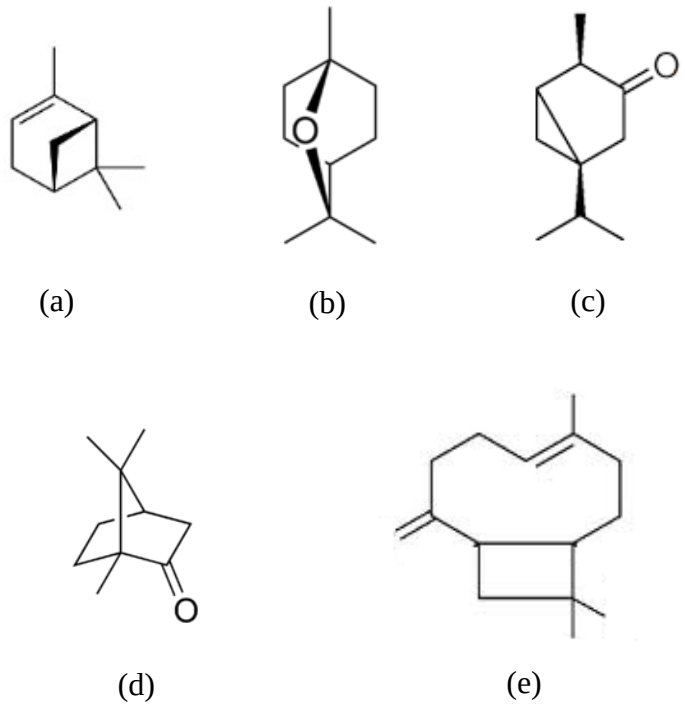


Figura 1.6. Principales componentes del aceite esencial de *Salvia officinalis*.
(a) α-pineno, (b) 1,8-cineol, (c) α-tuyona, (d) alcanfor, (e) α-cariofileno

Con respecto a la actividad biocida del aceite esencial de salvia, se ha reportado su efectividad frente a una gran variedad de hongos y bacterias patógenas, así como a ácaros y otros artrópodos. Una lista seleccionada de trabajos publicados se muestra en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Revisión de trabajos seleccionados sobre actividad biocida de aceite de *S. officinalis*

Autores	***Extracto/compuesto***	***Actividad***	***Ref.***
Carta y col. (1996)	Aceite esencial, fracciones (MT y OT), componentes específicos	Fungicida (*Botrytis cinerea*)	[51]
Longaray Delamare y col. (2007)	Aceite esencial	Bactericida, bacteriostática (*Bacillus spp., Aeromonas spp., Klebsiella oxytoca*)	[52]
Pinto y col. (2007)	Aceite esencial	Fungicida (*Candida*, dermatofitos, *Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium*)	[53]
Bouaziz y col. (2009)	Aceite esencial	Bactericida, fungicida (amplio panel de especies testeadas)	[54]
Laborda y col. (2013)	Aceite esencial	Acaricida (*Tetranychus urticae*)	[55]

Los resultados de actividad biocida del aceite de salvia, así como de sus componentes o fracciones aisladas, indican que los compuestos más activos son el *alcanfor* y las *tuyonas*, es decir, la fracción de monoterpenos oxigenados. Los aceites más ricos en estos componentes muestran en general mayor actividad que aquellos en los que predominan β-pineno y demás compuestos hidrocarbonados.

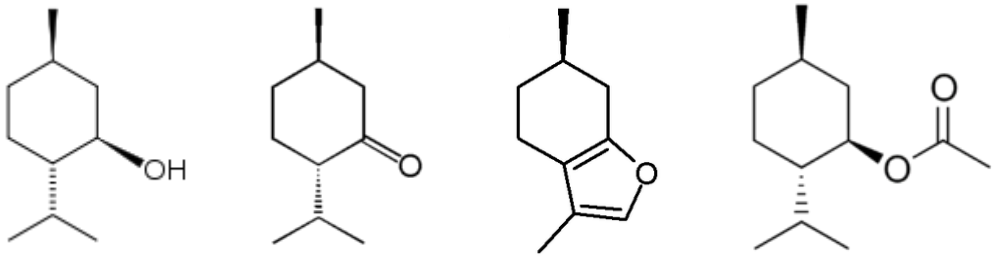
1.3.4. Aceite esencial de Mentha piperita

El género *Mentha* (familia Lamiaceae) comprende varias especies aromáticas ampliamente extendidas en el mundo, tales como: *M. piperita*, *M. arvensis*, *M. spicata*, *M. citrata*, etc.

El aceite de menta es, junto con los de cítricos, uno de los aceites esenciales comerciales más extensamente utilizados como aromatizante, tanto en la industria de alimentos como en productos de limpieza, perfumería, farmacia, etc. Las especies preferidas son *M. piperita* ("peppermint") y *M. spicata* ("spearmint"). La producción mundial de aceites de menta fue de 5000 toneladas en 2006 [56]. El precio varía en un amplio rango (entre 10 y 40 USD por kg), dependiendo de la especie, la composición, el origen, el perfil de aroma, etc. [57].

El valor comercial depende en buena medida de su contenido de mentol, responsable principal de su aroma y carácter "refrescante". Además de mentol y sus isómeros (neomentol e isomentol), los aceites de menta contienen cantidades variables de otros monterpenos relacionados: mentofurano, mentil acetato, mentona, carvona, pulegona, piperitona, limoneno, etc. Su presencia y proporción depende de factores múltiples, como la especie, la parte de la planta, las condiciones de cultivo, la edad y la región geográfica. La Figura 1.7 muestra las estructuras químicas de los principales compuestos.

La actividad biocida del aceite de menta y sus componentes ha sido estudiada y reportada por numerosos autores. La Tabla 1.8 muestra algunos trabajos seleccionados de la literatura.



(a) (b) (c) (d)

Figura 1.7. Principales componentes de los aceites esenciales de menta.
(a) l-mentol, (b) mentona, (c) mentofurano, (d) mentil acetato

Tabla 1.8. Revisión de trabajos seleccionados sobre actividad biocida de aceite esencial de menta y componentes específicos

Autores	***Extracto/compuesto***	***Actividad***	***Ref.***
Sivropoulou y col. (1995)	Aceite esencial de *M. pulegium* y *M. spicata*	Antimicrobiana (8 cepas de bacterias Gram+ y Gram-)	[58]
Franzios y col. (1997)	Aceite esencial de *M. pulegium* y *M. spicata*	Insecticida (*Drosophila melanogaster*)	[59]
Iscan y col. (2002)	Aceites esenciales de *M. piperita*	Antimicrobiana (frente a 21 bacterias y hongos patógenos)	[60]
Dambolena y col. (2008)	Componentes puros (mentol, mentona, timol, limoneno)	Fungicida (*Fusarium verticillioides*)	[61]
Dambolena y col. (2010)	Estereoisómeros de mentol	Fungicida (*Fusarium verticillioides*)	[62]

Franzios y col. [59] estudiaron la actividad insecticida de los aceites esenciales de *M. pulegium* y *M. spicata*, ricos en las cetonas terpénicas pulegona, mentona y carvona. Observaron que ambos aceites presentan actividad insecticida contra la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, aunque en proporción menor a la actividad de los componentes puros. La fuerte actividad tóxica de la pulegona se ve particularmente reducida en presencia de los otros componentes del aceite, evidenciando efectos sinérgicos/antagonistas.

Por otra parte, Iscan y col. [60] llevaron a cabo un screening de la actividad antimicrobiana de 4 aceites de *M. piperita* (constituidos principalmente por mentona y *l*-mentol) frente a 21 microorganismos patógenos para plantas y humanos, concluyendo que el grado de actividad (para una concentración dada) depende fuertemente de la especie microbiana. Los componentes puros mostraron una actividad semejante a la de los aceites.

Dambolena y col. [61][62] estudiaron el efecto de 4 terpenos típicos de la menta (mentona, mentol, limoneno y timol) sobre el crecimiento del hongo *Fusarium verticilloides* y sobre la producción de su toxina. Si bien observaron que los compuestos más activos eran el limoneno y el timol, el mentol y la mentona exhibían actividad inhibitoria a concentraciones mayores, resultando el mentol más activo que la mentona.

El aceite de *M. piperita* es la principal fuente comercial de **mentol**. El mentol es un terpeno sólido a temperatura ambiente, con puntos de fusión en el rango de 303 a 318 K, dependiendo del tipo de cristal y de la estereoespecificidad. Se obtiene por cristalización mediante el enfriamiento lento del aceite y su posterior filtración. También puede obtenerse por vía sintética, aunque el producto obtenido no es estereoespecífico. En efecto, hay 8 estereoisómeros posibles del mentol, en tanto que el mentol natural es casi siempre la forma (*1R,2S,5S*), conocida como *l*-mentol o (–)-mentol.

La cristalización y separación del mentol deja como subproducto un aceite "desmentolado", de menor valor, rico en mentonas y otros compuestos, pero con cantidades residuales de mentol que pueden ser significativas (hasta un 50%). Se han propuesto alternativas para el aprovechamiento de este subproducto, como la hidrogenación catalítica de las mentonas para su conversión en mentol. La principal limitación de este proceso es que no es estereoespecífico, dando como producto una mezcla de los distintos isómeros del mentol [63][64].

En este marco, resulta de interés el desarrollo de técnicas simples de separación que permitan una mayor recuperación del mentol natural del aceite mediante la separación de las mentonas (y otras cetonas relacionadas, como pulegona o piperitona, de potencial biocida), campo en el que las tecnologías de fluidos supercríticos pueden encontrar una atractiva aplicación.

1.4. Evaluación de la actividad biocida

1.4.1. Métodos de evaluación

La implementación de aceites esenciales (u otros extractos vegetales) como plaguicidas de origen natural o bioplaguicidas –ya sea como alternativa a los plaguicidas sintéticos o como un nuevo elemento a incorporar en el marco del manejo integrado de plagas– requiere disponer de técnicas para evaluar tanto cualitativa como cuantitativamente su toxicidad o actividad biocida. Estas técnicas permiten realizar estudios comparativos y evaluar los efectos de la composición de los extractos (y su modificación por distintos métodos) sobre la toxicidad.

Numerosos aceites esenciales pueden actuar como fumigantes, biocidas de contacto, repelentes y pueden afectar algunos parámetros biológicos como la tasa de crecimiento, período de vida, alimentación y reproducción [65]. En otros casos, pueden actuar como atrayentes de insectos hacia trampas.

Se han desarrollado numerosos métodos para evaluar la toxicidad de los aceites esenciales, dependiendo de la especie a combatir y el tipo de toxicidad que se desea observar. Sin profundizar en detalles que escapan al alcance de esta tesis, se describirán brevemente los principales métodos utilizados y más ampliamente reportados en la literatura.

a) Toxicidad fumigante:

En este tipo de ensayos se determina el efecto tóxico de un biocida volátil sobre un organismo mediante la liberación de sus vapores y la exposición de los individuos a dicho entorno. En los ensayos más frecuentes, el biocida es aplicado en distintas dosis sobre discos de papel de filtro. Cada disco de papel se seca al aire y se coloca dentro de un recipiente cerrado, por ejemplo fijado a la cara interna de la tapa. Luego se colocan dentro del recipiente un cierto número de individuos seleccionados y se registra la mortalidad a intervalos regulares de tiempo. Un cierto número de individuos se mantiene en un recipiente similar pero sin aplicación del biocida, a modo de control. Si el recipiente es de gran tamaño, puede usarse un sistema de agitación para mantener una concentración homogénea de volátiles en todo el volumen [66].

También se suelen ensayar distintas dosis, de manera de determinar la concentración que produce la mortalidad del 50% (LC_{50}) o del 95% de la población (LC_{95}).

b) Toxicidad de contacto:

En este tipo de ensayos se evalúa el efecto tóxico de la sustancia biocida mediante su aplicación tópica sobre el cuerpo del organismo objetivo. Generalmente, se seleccionan individuos al azar y se los anestesia bajo una corriente de nitrógeno. Una vez inmovilizados, se les aplica una pequeña dosis (unos pocos microlitros) del biocida disuelto en un solvente volátil a una concentración dada sobre el dorso o alguna otra zona del cuerpo y se los confina en un recipiente. Algunos individuos se reservan para control, aplicándose el mismo volumen de solvente puro. Luego se registra el número de individuos muertos a intervalos regulares de tiempo, informándose como porcentaje de mortalidad a las 24, 48, 72 hs, etc. para la dosis ensayada. También se testean diferentes concentraciones de biocida, de manera de obtener la dosis letal para una mortalidad de 50% (DL_{50}) o 95% (DL_{95}), para un intervalo dado de tiempo.

c) Repelencia:

Los repelentes son sustancias que actúan localmente o a distancia evitando que insectos u otros artrópodos vuelen en torno de una superficie, se aproximen o se asienten sobre ella. La superficie a proteger puede ser la de una planta, un alimento o la piel humana (o de otros animales). Por lo general, los repelentes son compuestos volátiles que proporcionan una barrera en fase vapor en el aire circundante, de manera tal que una pequeña concentración pueda ser detectada por el artrópodo y baste para producir su alejamiento [67]. Es decir que estos compuestos –al menos en las concentraciones aplicadas– no producen mortalidad. Sin embargo, su uso es de gran importancia para prevenir pérdidas en granos, frutas y otros alimentos almacenados, así como para evitar picaduras de insectos transmisores de enfermedades (como el típico caso de los mosquitos), sin tener que recurrir a sustancias de mayor toxicidad, con sus riesgos asociados.

Entre los repelentes de origen vegetal, algunos aceites esenciales han demostrado una actividad comparable a los repelentes sintéticos, utilizándose comercialmente, como los de citronela y eucalipto. Su principal limitación es su efectividad de corta duración, que depende de su volatilidad. A raíz de ello se han desarrollado líneas de investigación tendientes a incrementar y prolongar su eficacia mediante formulaciones que permitan

una liberación más gradual y controlada de los compuestos activos, por ejemplo incorporándolos en cremas, mezclas de polímeros o microcápsulas, o agregando aditivos fijadores. En cuanto a los métodos de evaluación de la repelencia, los tipos principales de ensayos son [67]:

- Ensayos en placa de Petri:

Se divide un papel de filtro en dos mitades. En una mitad se aplica uniformemente un volumen dado de aceite esencial en un solvente volátil (generalmente acetona); en la otra mitad se aplica el mismo volumen de solvente puro, como control. Ambas mitades son unidas nuevamente entre sí, y se libera un número fijo de artrópodos en el centro del papel. Luego de algunas horas, se observa y registra el número de artrópodos que se encuentra en cada mitad, calculándose el porcentaje de repelencia.

- Ensayos olfatométricos en tubo-Y:

Se utiliza un tubo de vidrio en forma de Y, con una rama principal y dos brazos, uno de los cuales contiene el repelente y el otro el control. La muestra de aceite esencial y el control se aplican sobre un papel unido a las ramas del tubo. Los insectos son introducidos a través de un orificio ubicado en el punto de unión de las tres ramas. Se genera un lento flujo de aire mediante succión con una bomba conectada a la rama principal. Luego de dicha introducción, el orificio se cierra con un tapón de goma y se enciende la bomba. Luego de segundos de exposición, se registra el número de insectos en cada uno de los dos tubos (de prueba y de control) para determinar el porcentaje de repelencia.

1.4.2. Toxicidad de cetonas de Tagetes minuta: dos casos de estudio

Se describen a continuación y brevemente dos estudios de toxicidad realizados con fracciones de aceite de *Tagetes minuta* obtenidas durante el trabajo experimental de esta tesis, mediante fraccionamiento supercrítico, frente a dos parásitos de interés agronómico e industrial: (a) el gorgojo del maíz o *Sitophilus zeamais* y (b) el nemátodo *Meloidogyne javanica*. Los resultados aquí presentados pretenden confirmar el incremento en la actividad biocida obtenido al concentrar la fracción de monoterpenos oxigenados

(cetonas) y validar el fraccionamiento con fluidos super-críticos como técnica adecuada y eficiente para lograr dicha mejora.

a) Actividad biocida frente al gorgojo de maíz

El control de plagas que atacan productos almacenados (granos, frutos, alimentos procesados o semi-procesados) constituye un importante campo de acción para los bioplaguicidas, en el que se busca crear nuevas prácticas de baja toxicidad para mamíferos y baja persistencia en el ambiente [68],[69].

El gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) es una severa plaga que ataca el maíz almacenado, causando importantes pérdidas cuantitativas y cualitativas de producto a nivel mundial. Actualmente, el control de esta plaga se basa en el uso de insecticidas sintéticos (principalmente bromuro de metilo).

En este estudio, se evaluó el efecto **fumigante** de varios aceites esenciales ricos en cetonas sobre este insecto. Dentro de ese marco, se estudió la toxicidad del aceite de *Tagetes minuta* y de la fracción de ocimenonas aislada a partir del aceite por medio de fraccionamiento con CO_2 supercrítico. Los resultados fueron obtenidos en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, Universidad Nacional de Córdoba – CONICET) como parte del trabajo doctoral de Jimena Herrera, bajo la supervisión del Dr. Julio Zygadlo, y se encuentran en proceso de publicación [70].

Los aceites esenciales utilizados en este estudio fueron obtenidos por hidrodestilación y caracterizados por cromatografía de gases (GC-MS).

Las cetonas puras α-tuyona, *R*-carvona, *S*-carvona, (–)-mentona y *R*-pulegona fueron adquiridas en Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

La fracción de **ocimenonas** utilizada fue aislada a partir del aceite de *T. minuta* por fraccionamiento semi-continuo con CO_2 supercrítico, siguiendo el procedimiento experimental que se detallará en el Capítulo 4. El proceso se llevó a cabo a una temperatura de 313 K y una presión de 80 bar, obteniéndose un refinado constituido por aprox. 95% de cetonas (fundamentalmente ocimenonas). Este producto fue recuperado en acetona y almacenado en freezer a 263 K, protegido de la luz. En el momento de su utilización, se evaporó el solvente en un rotoevaporador. La composición cromatográfica del producto obtenido puede verse en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9.
Perfil cromatográfico de la fracción de ocimenonas obtenida por fraccionamiento supercrítico de aceite de *T. minuta*

Componente	**% área**
E-ocimeno	4.35
dihidrotagetona	1.33
E-tagetona	2.75
Z-ocimenona	14.67
E-ocimenona	76.90

Los gorgojos fueron criados sobre granos enteros de maíz en condiciones controladas de temperatura (301–303 K) y humedad relativa (70–80%), en la oscuridad, a partir de una cepa obtenida en Metán, provincia de Salta (Argentina). En todos los experimentos se utilizaron adultos asexuados de 2 semanas de edad.

En los ensayos de actividad fumigante, se aplicaron distintas cantidades de aceite esencial o de cetonas puras sobre filtros de papel de 2 cm de diámentro, correspondientes a dosis de 15 a 600 μl/l. Cada filtro de papel luego fue secado al aire por 2 minutos y colocado en la cara interna de la tapa roscada de un vial de vidrio (de 30 ml de volumen interno). Se colocaron 10 adultos de *S. zeamais* en cada vial, realizándose 5 réplicas por cada dosis ensayada. Los insectos de control se mantuvieron en las mismas condiciones, sin exposición a los aceites o cetonas puras. Se registró el porcentaje de mortalidad luego de 24 hs. para cada dosis y la concentración letal LC_{50}.

En términos generales, tanto el aceite de *T. minuta* como la fracción de ocimenonas presentaron toxicidad fumigante frente al gorgojo *S. zeamais*. Sin embargo, como puede verse en la Tabla 1.10, el gorgojo es notablemente más sensible a la fracción de ocimenonas puras que al aceite completo.

Tabla 1.10.
Toxicidad fumigante en adultos de *S. zeamais* luego de 24 hs de exposición

Compuesto	Concentración (μl/l)	% Mortalidad
Aceite de *T. minuta*	150	56.7 (5.8)
Ocimenonas	50	96.0 (8.9)

[1] Cada valor representa el promedio de 5 réplicas, cada una con 10 adultos. Entre paréntesis: desvío estándar.

En efecto, puede observarse que utilizando ocimenonas se obtiene una mortalidad notablemente mayor (96% versus 57%) que con el aceite completo, y con una concentración tres veces menor. Este resultado apoya las observaciones previamente reportadas que indican que estos compuestos son los principales responsables de la toxicidad del aceite frente a insectos.

La concentración letal LC_{50} del aceite de *T. minuta* frente a esta especie no pudo ser calculada, ya que la dependencia de la toxicidad con la dosis no evidenciaba un comportamiento lineal. Sin embargo, los resultados presentados permiten inducir que dicha LC_{50} estará ligeramente por debajo de los 150 μl/l.

La Tabla 1.11, por su parte, muestra los resultados de toxicidad fumigante para la fracción de ocimenonas (en términos de % de mortalidad para una concentración dada, LC_{50} y LC_{95}), comparativamente con las demás cetonas evaluadas, en orden decreciente de toxicidad.

Tabla 1.11.
Toxicidad fumigante de cetonas en adultos de *S. zeamais* luego de 24 hs de exposición

Compuesto	% mortalidad[1] (a 50 μl/l)	LC_{50} (μl/l)	Intervalo de 95% de confianza (μl/l)	LC_{95} (μl/l)	Intervalo de 95% de confianza (μl/l)
R-pulegona	100 (0)[a]	11.81	11.22 – 12.64	14.17	13.15 – 16.81
R-carvona	98.0 (4.47)[a]	17.56	15.17 – 19.88	28.75	25.59 – 33.91
S-carvona	82.0 (21.68)[a]	28.10	23.59 – 33.26	54.18	46.90 – 65.16
ocimenona	**96.0 (8.9)[a]**	**42.30**	**37.87 – 47.55**	**56.86**	**50.59 – 73.32**
α-tuyona	30.0 (25.0)[b]	65.53	57.31 – 73.40	111.56	99.38 – 132.67
mentona	24.0 (11.22)[b]	85.46	72.15 – 97.95	164.49	146.31 – 191.88

[1] Cada valor representa el promedio de 5 réplicas, cada una con 10 adultos. Entre paréntesis: desvío estándar. Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes entre sí de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan para $P \leq 0.05$.

Se observa que todas las cetonas evaluadas presentan actividad insecticida contra *S. zeamais*. Esto concuerda con las observaciones de otros autores que señalan a los componentes oxigenados en general (y a las cetonas en particular) como los principales responsables de la actividad tóxica que exhiben numerosos aceites esenciales [71]. Sin embargo, se pueden distinguir dos grupos. La pulegona, carvona y ocimenona presentan una toxicidad mayor, evidenciada en los altos valores de mortalidad (para una

concentración de 50 μl/l), o en sus bajos valores de concentración letal, mientras que la α-tuyona y la mentona exhiben un grado menor de efectividad.

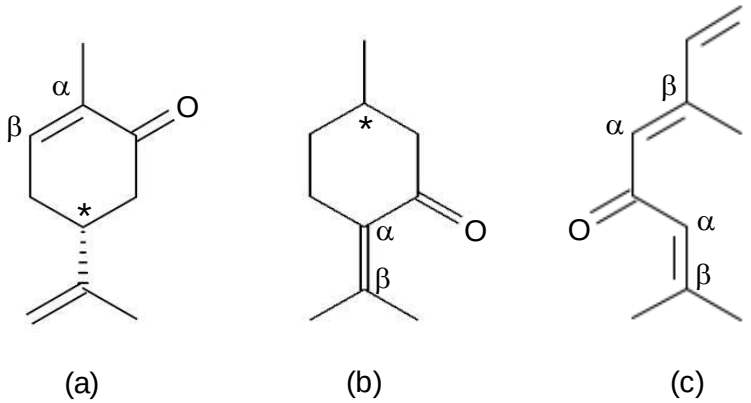


Figura 1.8. Cetonas terpénicas α,β–insaturadas: (a) carvona, (b) pulegona, (c) ocimenona.

A partir de estos datos, puede señalarse que las cetonas más activas son las que presentan α,β–insaturaciones, sugiriendo que esta característica estructural puede jugar un papel importante en la toxicidad. Se denomina **α,β–insaturados** a los compuestos que presentan un doble enlace C=C conjugado con respecto al grupo carbonilo, es decir, en el par de átomos de carbono inmediatamente adyacentes (denominados α y β, en orden de alejamiento). Como puede verse en la Figura 1.8, la carvona, pulegona y ocimenona (y sus estereoisómeros) presentan esta característica química, a diferencia de la α-tuyona y la mentona que son cetonas saturadas.

Los compuestos α,β–insaturados actúan como "aceptores de Michael", en un tipo de reacción de adición en la que el doble enlace es atacado (generalmente en el carbono β) por grupos nucleofílicos, por ejemplo, de proteínas [72]. Se ha reportado que estos compuestos son potentes inhibidores de las enzimas glutatión-S-transferasas que participan en el metabolismo de xenobióticos, lo cual puede estar conectado con su mecanismo de toxicidad [73].

b) Actividad nematicida

El nemátodo *Meloidogyne javanica* (también llamado "nemátodo del nudo de la raíz") es un parásito interno de las raíces de numerosas plantas, incluyendo cultivos de importancia agrícola, como la caña de azúcar, el olivo, la vid, el tomate, el tabaco, la soja, la papa, etc. [74].

En este estudio, se evaluó la actividad nematicida de distintas fracciones del aceite de *T. minuta* con distinta composición cuantitativa (relación MT/OT), con el objetivo de correlacionar el grado de actividad con el contenido de cetonas.

Las fracciones ensayadas (E1–E4) fueron obtenidas a partir del aceite crudo mediante fraccionamiento con CO_2 supercrítico, de manera similar al estudio descripto anteriormente. En este caso, en lugar de obtener una fracción de cetonas puras, se separaron varios cortes intermedios de distinta composición (32.8%, 54.4%, 82.4% y 95% de OT, respectivamente).

Los ensayos de actividad nematicida fueron realizados por la doctorando Yamile Massuh, quien estudia dicha especie en el marco de su tesis doctoral, dirigida por la Dra. Marta Ojeda y el Dr. Julio Zygadlo. Los ensayos se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencias Agrarias (ICA) de Madrid, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) durante una estancia de investigación bajo la dirección de las Dras. María Fé Andrés Yaves y Azucena Gonzáles Coloma. Los resultados aquí comentados se encuentran en proceso de publicación [75].

Se evaluó la **toxicidad por contacto**, aplicando sobre nemátodos jóvenes pequeñas alícuotas de cada fracción de aceite disueltas en DMSO y Tween 20, y registrando el porcentaje de letalidad para cada concentración.

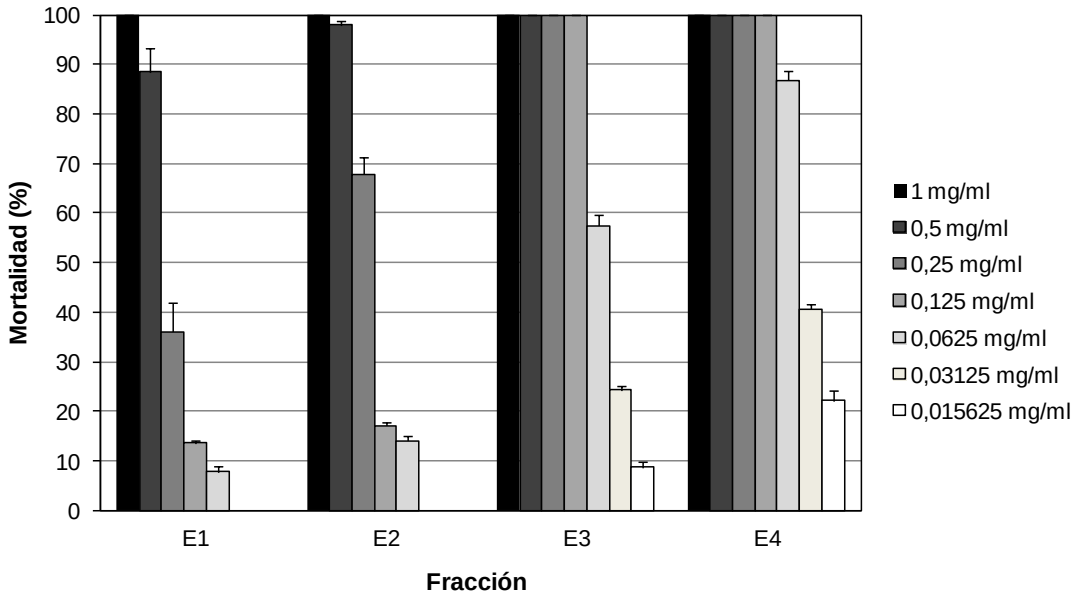


Figura 1.9.
Mortalidad de fracciones de *Tagetes minuta* en nemátodos en función de la concentración ensayada.
Contenido de cetonas insaturadas (principalmente ocimenonas):
E1=32.8%, E2=54.4%, E3=82.4%, E4=95.0%.

Los resultados se muestran en la Figura 1.9. Allí puede observarse que la toxicidad aumenta en forma correlativa con el contenido de cetonas, para una misma concentración aplicada. Por ejemplo: para una concentración de 0.0625 mg/ml, la letalidad del extracto E1 (32.8% de cetonas) es menor al 10%, mientras que llega a ser superior al 85% para el extracto E4 (95% de cetonas). De este modo, en consecuencia, la utilización de extractos enriquecidos en cetonas permite obtener mayores niveles de toxicidad con concentraciones más bajas.

1.5. Objetivos y estructura de la tesis

1.5.1. Objetivos

El objetivo *general* de la tesis es aportar conocimientos para el aprovechamiento de las fracciones y/o compuestos purificados con **actividad biocida** presentes en los aceites esenciales obtenidos de las especies *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* y *Mentha piperita*, plantas comunes en la región, con vistas a su implementación en el control de plagas de interés sanitario y/o económico. Para ello se propone como metodología el **fraccionamiento con fluidos supercríticos** (en particular dióxido de carbono), tecnología considerada "verde" por su bajo impacto ambiental.

Dentro de ese marco, los objetivos *específicos* de esta tesis son:

- La puesta a punto de un sistema experimental de alta presión a escala de laboratorio, para el estudio del equilibrio de fases y el fraccionamiento de los aceites mencionados en condiciones dinámicas.
- Adquirir datos experimentales de equilibrio de los sistemas CO_2 + aceite esencial a alta presión, determinando la influencia de las distintas variables operativas (temperatura, presión, composición) sobre la calidad de los productos obtenidos (en términos de recuperación y concentración de los componentes activos).
- El modelado matemático del comportamiento termodinámico de los sistemas estudiados utilizando la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS), y realizando el ajuste de los parámetros necesarios para una correcta descripción.

- El estudio (mediante simulaciones asistidas por computadora) de un proceso continuo de fraccionamiento con fluidos supercríticos, analizando la influencia de las variables operativas, y la búsqueda de condiciones recomendables de operación.

1.5.2. Estructura de la tesis

Esta tesis se estructura en dos secciones. La Sección I es introductoria, y comprende los Capítulos 1 a 3. En ellos se establece el marco teórico y se presenta una revisión bibliográfica referida a las propiedades de los aceites esenciales como agentes biocidas de origen natural (Capítulo 1), se describen las características de los fluidos supercríticos como solventes y sus principales aplicaciones (Capítulo 2) y se introducen aspectos teóricos y prácticos del fraccionamiento supercrítico en columnas multietapa y el enfoque de la Ingeniería del Equilibrio entre Fases (Capítulo 3).

En la Sección II se desarrolla el tema principal de la tesis, es decir, el estudio del fraccionamiento de los aceites de *T. minuta*, *S. officinalis* y *M. piperita* con CO_2 supercrítico, con el objetivo de concentrar o purificar sus componentes biocidas, a través de las siguientes etapas: la obtención y caracterización de las materias primas y la construcción y puesta a punto del equipo experimental (Capítulo 4), el modelado termodinámico (Capítulo 5), la presentación y discusión de los datos experimentales y la validación del modelo (Capítulo 6) y el análisis de columnas de separación mediante simulación asistida por computadora (Capítulo 7). Finalmente, en el Capítulo 8 se presentan las conclusiones generales y los trabajos a futuro.

REFERENCIAS

[1] *Directiva 98/8/EC de la Unión Europea respecto de la colocación de productos biocidas en el mercado (1998).* En internet: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:123:0001:0063:EN:PDF

[2] *Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura.* OMS y PNUMA. Ginebra (1992). En internet: http://cidbimena.desastres.hn/docum/crid/Septiembre2007/CD2/pdf /spa/doc6916/doc6916-a.pdf

[3] Datos del Ministerio de Salud de la Nación. En internet: http://www.msal.gob.ar/dengue; http://www.msal.gob.ar/chagas.

[4] Huerga, M., San Juan, S. *El control de las plagas en la agricultura argentina (Informe).* Estudio Sectorial Agrícola Rural. Banco Mundial/Centro de Inversiones FAO. Buenos Aires, Argentina (2005).

[5] Programa PROSAP. En internet: http://www.prosap.gov.ar

[6] Casida, J.E., Quistad, G.B. *Golden age of insecticide research: Past, present or future?*, Annual Review of Entomology 43 (1998) 1–16.

[7] Romero, F. *Manejo Integrado de Plagas: Las bases, los conceptos, su mercantilización*. Universidad Autónoma Chapingo, (Chapingo, Tezcoco, México). En internet: http://www.agro.uncor.edu/~biblio/Manejo%20de%20Plagas.pdf

[8] Isman, M.B. *Plant essential oils for pest and disease management*. Crop Protection 19 (2000) 603–608.

[9] Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. *Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world*. Annual Review of Entomology 57 (2012) 405–424.

[10] Isman, M.B., Machial, C.M., *Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization,* en: Rai and Carpinella (Eds.), Naturally Occurring Bioactive Compounds (2006), Chapter 2, p. 29.

[11] Isman, M.B. *Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer*. Pest Management Science 64 (2008) 8–11.

[12] Rattan, R.S. *Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin (Review)*. Crop Protection 29 (2010) 913-920.

[13] Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G. *Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review*. Environmental Chemistry Letters 10 (2012) 325.

[14] Regnault-Roger, C. *The potential of botanical essential oils for insect pest control*. Integrated Pest Management Reviews 2 (1997) 25–34.

[15] Guenther, E., *The Essential Oils*, D. Van Nostrand Company, Inc. (1947)

[16] Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1966).

[17] Ruzicka, L. *The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds*. J. of Cellular and Molecular Life Sciences 9 (1953) 357–367.

[18] Morris, J.A., Khettry, A., Seitz, E.W., *Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils*, Journal of The American Oil Chemists' Society 56 (1979) 595-603.

[19] Shaalan, E.A., Canyon, D., Younes, M.W.F., Abdel-Wahab, H., Mansour, A.H., *A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential*, Environment International 31 (2005) 1149-1166.

[20] Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review*, International Journal of Food Microbiology 94 (2004) 223-253.

[21] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., *Biological effects of essential oils – a review*, Food and Chemical Toxicology 46 (2008) 446-475.

[22] Papachristos, D.P., Karamanoli, K.I., Stamopoulos, D.C., Menkissoglu-Spiroudi, U., *The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against Acanthoscelides obtectus* (Say), Pest Management Science 60 (2004) 514-520.

[23] Miresmailli, S., Bradbury, R., Isman, M.B., *Comparative toxicity of Rosmarinus officinalis L. essential oil and blends of its major constituents against Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) *on two different host plants*, Pest Management Science 62 (2006) 366-371.

[24] Essential Oils and Oleorresins, Market News Service, 2007.

[25] Singh, V., Singh, B., Kaul, V.K. *Domestication of wild marigold (Tagetes minuta L.) as a potential economic crop in Western Himalaya and North Indian plains*. Economic Botany 57 (2003) 535–544.

[26] Vasudevan, P., Kashyap, S., Sharma, S. *Tagetes: a multipurpose plant*. Bioresource Technology 62 (1997) 29–35.

[27] Héthélyi, E., Dános, B., Tétényi, P, Koczka, I. *GC-MS analysis of the essential oils of four Tagetes species and the anti-microbial activity of Tagetes minuta*. Flavour and Fragrance Journal 1 (1986) 169–173.

[28] Wells, C., Bertsch, W., Perich, M. *Isolation of volatiles with insecticidal properties from the genus Tagetes (marigold*). Chromatographia 34 (1992) 241–248.

[29] Wells, C., Bertsch, W., Perich, M. *Insecticidal volatiles from the marigold plant (genus Tagetes). Effect of species and sample manipulation*. Chromatographia 35 (1993) 209–215.

[30] Perich, M.J., Wells, C., Bertsch, W., Tredway, K.E. *Toxicity of extracts from three Tagetes against adults and larvae of yellow fever mosquito and Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)*. J. of Medical Entomology 31 (1994) 833-837.

[31] Tereschuk, M.L., Riera, M.V.Q., Castro, G.R., Abdala, L.R. *Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of Tagetes minuta*. J. of Ethnopharmacology 56 (1997) 227–232.

[32] Scrivanti, L.R., Zunino, M.P., Zygadlo, J.A. *Tagetes minuta and Schinus areira essential oils as allelopathic agents*. Biochemical Systematics and Ecology 31 (2003) 563–572.

[33] Cestari, I.M., Sarti, S.J., Waib, C.M., Castello Branco Jr., A. *Evaluation of the potential insecticide activity of Tagetes minuta (Asteraceae) essential oil against the head lice Pediculus humanus capitis (Phthiraptera: Pediculidae)*. Neotropical Entomology 33 (2004) 805–807.

[34] Tomova, B.S., Waterhouse, J.S., Doberski, J. *The effect of fractionated Tagetes oil volatiles on aphid reproduction*, Entomologia Experimentalis et Applicata 115 (2005) 153-159.

[35] Adekunle, O.K., Acharya, R., Singh, B., *Toxicity of pure compounds isolated from Tagetes minuta oil to Meloidogyne incognita*, Australasian Plant Disease Notes 2 (2007) 101–104.

[36] Batish, D.R., Arora, K., Singh, H.P., Kohli, R.K., *Potential utilization of dried powder of Tagetes minuta as a natural herbicide for managing rice weeds*, Crop Protection 26 (2007) 566-571.

[37] Ruffinengo, S., Maggi, M., C. Faverin, C., García de la Rosa, S.B., Bailac, P., Principal, J., Eguaras, M., *Essential oils toxicity related to Varroa destructor and Apis mellifera under laboratory conditions*, Zootecnia Tropical 25 (2007) 63–69.

[38] Gillij, Y.G., Gleiser, R.M., Zygadlo, J.A., *Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina*, Bioresource Technology 99 (2008) 2507–2515.

[39] Lima, B., Agüero, M.B., Zygadlo, J., Tapia, A., Solís, C., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., Zacchino, S., Egly Feresin, G., Schmeda-Hirschmann, G., *Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from Tagetes mendocina*, J. of Chilean Chemical Society, 54 (2009) 68-72.

[40] López, M.L., Bonzani, N.E., Zygadlo, J.A., *Allelopathic potential of Tagetes minuta terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach*, Biochemical Systematics and Ecology 36 (2009) 882–890.

[41] Shahzadi, I., Hassan, A., Khan, U.W., Shah, M.M., *Evaluating biological activities of the seed extracts from Tagetes minuta L. found in Northern Pakistan*, J. of Medicinal Plants Research 4 (2010) 2108-2112.

[42] Chamorro, E.R., Sequeira, A.F., Velasco, G.A., Zalazar, M.F., Ballerini, G.A., *Evaluation of Tagetes minuta L. essential oil to control Varroa destructor (Acari: Varroidae*), J. of the Argentine Chemical Society 98 (2011) 39–47.

[43] Lopez, S.B., Lopez, M.L., Aragon, L.M., Tereschuk, M.L., Slanis, A.C., Feresin, G.E., Zygadlo, J.A., Tapia, A.A., *Composition and anti-insect activity of essential oils from Tagetes L. species (Asteraceae, Helenieae) on Ceratitis capitata Wiedemann and Triatoma infestans Klug*, J. of Agricultural and Food Chemistry 59 (2011) 5286–5292.

[44] Nchu, F., Magano, S.R., Eloff, J.N., *In vitro anti-tick properties of the essential oil of Tagetes minuta L. (Asteraceae) on Hyaloma rufipes (Acari: Ixodidae)*, Onderstepoort Journal of Veterinary Research 79 (2012).

[45] Soule, J.A. *Tagetes minuta*: *A potential new herb from South America*, en: J. Janick and J.E. Simon (eds.), New Crops, Wiley, New York (1993) 649-654.

[46] Ramesh, K., Singh, V. *Effect of planting date on growth, development, aerial biomass partitioning and essential oil productivity of wild marigold (Tagetes minuta) in mid hills of Indian western Himalaya (short communication)*. Industrial Crops and Products 27 (2008) 380–384.

[47] Gil, A., Ghersa, C.M., Leicach, S., *Essential oil yield and composition of Tagetes minuta accessions from Argentina*, Biochemical Systematics and Ecology 28 (2000) 561–574.

[48] Zygadlo, J.A., Grosso, N.R., Abburra, R.E., Guzmán, C.A., *Essential oil variation in Tagetes minuta populations*, Biochemical Systematics and Ecology 18 (1990) 405-407.

[49] Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. *Herbal Medicines* (3rd Edition). Pharmaceutical Press, Londres, 2007.

[50] Wu, Y.B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. *Constituents from Salvia species and their biological activities*. Chemical Reviews 112 (2012) 5967-6026.

[51] Carta, C., Moretti, M.D.L., Peana, A.T. *Activity of the oil of Salvia officinalis L. against Botrytis cinerea*. J. of Essential Oils Research 8 (1996) 399-404.

[52] Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. Food Chemistry 100 (2007) 603-608.

[53] Pinto, E., Ribeiro Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Goncalves, M.J. *In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of Salvia officinali*s. Industrial Crops and Products 26 (2007) 135-141.

[54] Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., Dhouib, A. *Disinfectant properties of essential oils from Salvia officinalis L. cultivated in Tunisia*. Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 2755-2760.

[55] Laborda, R. Manzano, I., Gamón, M., Gavidia, I., Pérez-Bermúdez, P., Boluda, R. *Effects of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis essential oils on Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. Industrial Crops and Products 48 (2013) 106-110.

[56] Ortuño Sanchez, M.F. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones, España (2006).

[57] Essential Oils and Oleorresins, Market News Service, 2010.

[58] Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. *Antimicrobial activity of mint essential oils.* J. of Agricultural and Food Chemisty 43 (1995) 2384-2388.

[59] Franzios, G., Mirotsou, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P. *Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils*. J. of Agricultural and Food Chemisty 45 (1997) 2690-2694.

[60] G. Iscan, N. Kirimer, M. Kurkcuoglu, K.H. Can Baser. F. Demirci. *Antimicrobian screening of Mentha piperita essential oils*. J. of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 3943-3946.

[61] Dambolena, J.S., López, A.G., Cánepa, M.C., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A., Rubinstein, H.R. *Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on Fusarium verticilloides MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis*. Toxicon 51 (2008) 37-44.

[62] Dambolena, J.S., López, A.G., Rubinstein, H.R., Zygadlo, J.A. *Effects of menthol stereoisomers on the growth, sporulation and fumonisin B1 production of Fusarium verticilloides*. Food Chemistry 123 (2010) 165-170.

[63] Yori, J.C., Manuale, D.L., Marchi, A.J., Grau, J.M. *Liquid-phase hydrogenation of dementholized peppermint oil on Pt/Al_2O_3 catalysts. Part I: A study of catalyst performance.* Applied Catalysis A: General 275 (2004) 221-226.

[64] Ravasio, N., Zaccheria, F., Fusi, A., Psaro, R. *One pot selective hydrogenation and dynamic kinetic resolution over Cu/Al_2O_3: A way to (-)-menthol starting from low value mint oils.* Applied Catalysis A: General 315 (2006) 114-119.

[65] Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C. *Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on Acanthoscelides obtectus (Say) (Coleoptera: Bruchidae).* J. of Stored Products Research 38 (2002) 117–128.

[66] Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U., Pissarev, V. *Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects.* J. of Chemical Ecology 17 (1991) 499–504.

[67] Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. *Repellent activity of essential oils: A review*. Bioresource Technology 101 (2010) 372–378.

[68] Lee, S., Peterson, C., Coats, J. *Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects*. J. of Stored Products Research 39 (2003) 77–85.

[69] Rani, P.U. *Fumigant and contact toxic potential of essential oils from plant extracts against stored product pests*. J. Biopest. 5 (2012) 120–128.

[70] Herrera, J. (comunicación personal).

[71] Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E. *Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils.* Flavour and Fragrance Journal 13 (1998) 98–104.

[72] Xavier, N., Rauter, A. *Sugars containing α,β-unsaturated carbonyl systems: synthesis and their usefulness as scaffolds in carbohydrate chemistry*. Carbohydrate. Research 343 (2008) 1523–1539.

[73] Yu, S., Abo-Elghar, G. *Allelochemicals as inhibitors of glutathione S-transferases in the fall armyworm*. Pesticide Biochemestry and Physiology 68 (2000) 173–183.

[74] Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO – SENASA). En internet: www.sinavimo.gov.ar/plaga/meloidogyne-javanica

[75] Massuh, Y. (comunicación personal).

2. Fluidos supercríticos. Aspectos fundamentales

2.1. Fluidos supercríticos

Si se observa el diagrama de fases *presión-temperatura* de un compuesto puro, como el que se esquematiza en la Figura 2.1, se distinguirán regiones bidimensionales correspondientes a fases o estados homogéneos y líneas correspondientes a estados de equilibrio bifásico (sólido–líquido, gas–líquido y gas–sólido). Estas tres líneas se unen en un punto –denominado *"punto triple"*– en el que coexisten las tres fases. A partir de él, la línea de equilibrio gas-líquido se extiende hacia la región de mayor presión y temperatura, hasta terminar en un punto, más allá del cual no existe separación entre gas y líquido. Dicho punto se denomina ***"punto crítico"*** y corresponde a un par único de valores de presión y temperatura que es propio de cada sustancia.

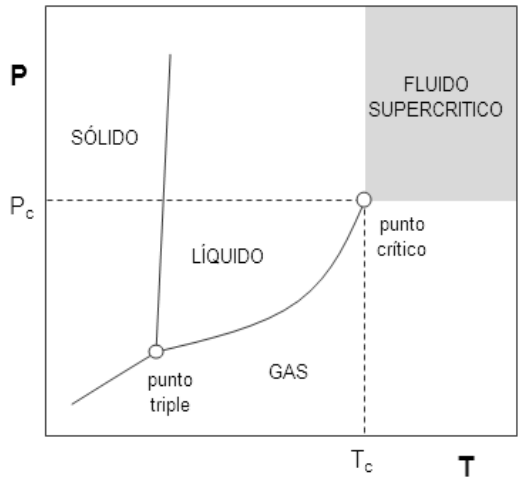


Figura 2.1. Diagrama presión-temperatura típico de un compuesto puro.

Si se observa el diagrama *presión-densidad* correspondiente, esquematizado en la Figura 2.2, se verá una región bifásica gas-líquido delimitada por una curva acampanada. Dentro

de esa región, coexisten las dos fases en equilibrio. A medida que aumenta la temperatura y la presión, las densidades de ambas fases se van haciendo cada vez más próximas, hasta volverse idénticas en el punto crítico.

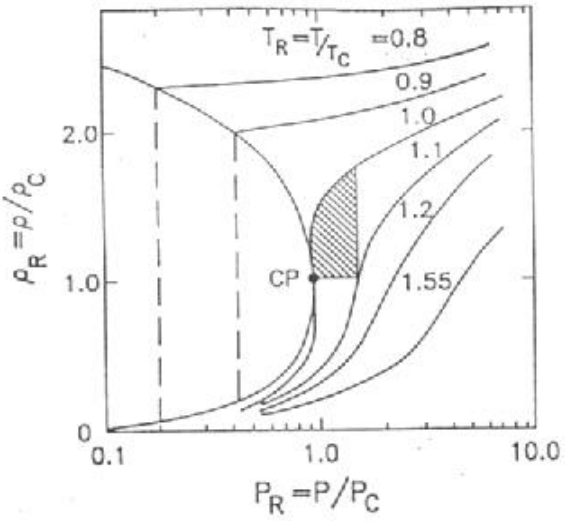


Figura 2.2. Diagrama presión-densidad típico de un compuesto puro, en coordenadas reducidas. La zona sombreada corresponde a la "región crítica" operativa más común en procesos de separación [1].

En el marco de esta tesis, se considera que un fluido se encuentra en estado "***supercrítico"*** cuando tanto su presión como su temperatura se encuentran por encima del punto crítico.

Nótese que el fluido puede estar por arriba de su presión crítica pero no de su temperatura crítica (o viceversa). En tales casos, se suele hablar de "líquidos comprimidos" y "gases sobrecalentados", aunque no existe una nomenclatura establecida. A través de estos estados homogéneos, y mediante una adecuada modificación de la temperatura y la presión, puede pasarse del estado líquido al gaseoso (o viceversa) rodeando el punto crítico, sin atravesar la curva de equilibrio bifásica (es decir, sin observar separación de fases).

En el caso especial de fluidos que se encuentran a presión y/o temperatura subcríticas, pero a densidades próximas a la crítica, se hablará de ***"fluidos cuasi-críticos"***, los cuales presentan muchas veces propiedades semejantes a los fluidos supercríticos.

Cuando se trata de mezclas fluidas *binarias o multicomponente*, la definición del estado supercrítico es más compleja, ya que debe considerarse también la composición del sistema. Por lo tanto, en vez de un único punto crítico, existirá una línea crítica (***"locus crítico"***) en el espacio tridimensional *presión-temperatura-composición*, para el caso de

sistemas binarios. En la Figura 2.3 se muestra esquemáticamente el diagrama *presión-composición* de un sistema binario a temperatura fija, en el cual uno de los componentes se encuentra por encima de su punto crítico. El punto crítico de la mezcla a la temperatura dada corresponde al máximo valor de presión de la región bifásica.

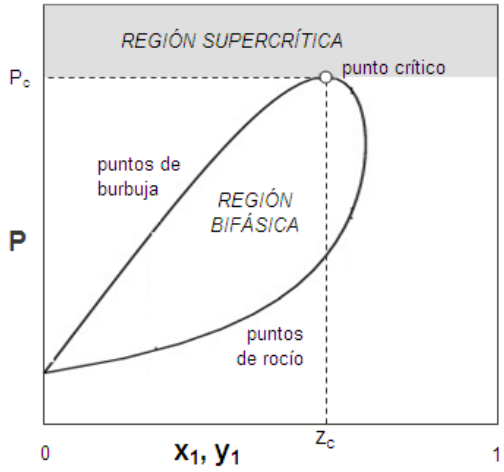


Figura 2.3. Diagrama presión-composición típico de un sistema binario

Asimismo, se generaliza la definición de punto crítico como toda condición de presión, temperatura y composición en donde se vuelven idénticas dos fases en equilibrio, ya sean: gas–líquido, líquido–líquido o líquido–fluido supercrítico. La Figura 2.4 permite visualizar el comportamiento de fases de una mezcla binaria en un espacio tridimensional.

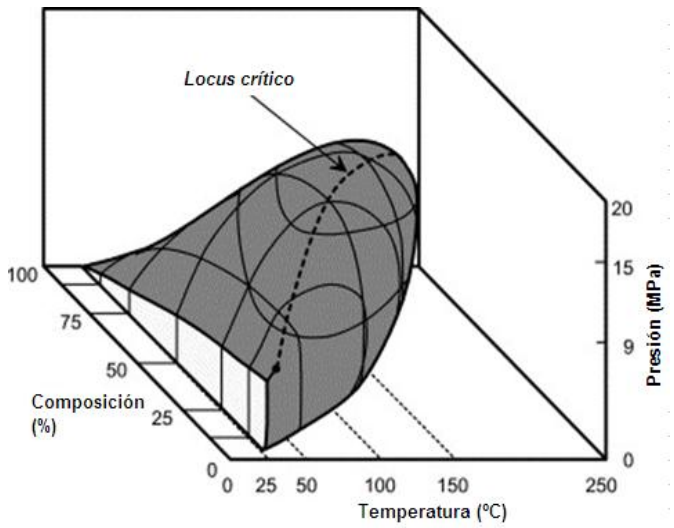


Figura 2.4. Diagrama presión-temperatura-composición de un sistema binario [2].

En la Tabla 2.1 se indican las propiedades críticas de algunas sustancias usadas como solventes en estado supercrítico.

Tabla 2.1. Temperatura crítica (T_c), presión crítica (P_c) y densidad crítica (ρ_c) de algunos fluidos supercríticos comunes [3].

Compuesto	T_c **(K)**	P_c **(bar)**	ρ_c **(kg/m^3)**
Metano	190.6	46.0	162
Etano	305.4	48.8	203
Etileno	282.4	50.3	218
Propano	369.8	42.4	217
Propileno	365.0	46.2	233
Dióxido de carbono	304.2	73.8	486
Agua	647.3	220.0	322
Amoníaco	405.6	113.0	235
Dietil éter	467.7	36.4	265
n-Pentano	469.6	33.7	237
Acetona	508.1	47.0	278
Metanol	512.6	80.9	272
Benceno	562.1	48.9	302
Tolueno	591.7	41.1	292
Piridina	620.0	56.3	312
Clorotrifluorometano	302.0	39.2	579

En particular, el **dióxido de carbono (CO_2)** constituye un solvente muy adecuado para el procesamiento de productos naturales [4][5] debido a una serie de características:

- Su temperatura crítica cercana a la ambiente (304.2 K) permite operar a temperaturas relativamente bajas, preservando así compuestos termolábiles y contribuyendo a la eficiencia energética de los procesos.
- Su alta densidad crítica (486 kg/m^3) le otorga un buen poder solvente en condiciones leves de presión y temperatura.
- Es un gas en condiciones ambientales, permitiendo su completa evaporación y eliminación del producto final por simple despresurización.
- No es tóxico, reactivo ni inflamable, permitiendo una operación más segura.
- Es compatible para su uso con productos alimenticios o farmacéuticos.
- Es un compuesto de bajo costo y amplia disponibilidad.

En esta tesis se utiliza CO_2 como solvente supercrítico, por lo que la siguiente discusión de propiedades –aunque de carácter general– hace especial hincapié en este compuesto. Del mismo modo, al tratar las propiedades de mezclas se proporcionan en lo posible datos de CO_2 + sistemas terpénicos, de mayor interés para esta tesis. Se tratan primero las propiedades fisicoquímicas de estos fluidos y cómo son afectadas por la temperatura, la presión y la presencia de solutos. Luego, en la sección siguiente, se tratan las propiedades asociadas a su poder solvente.

2.2. Propiedades fisicoquímicas

Los fluidos supercríticos presentan propiedades fisicoquímicas intermedias entre las de los gases y los líquidos, como se muestra en la Tabla 2.2, en la que pueden verse los rangos típicos de variación.

Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas de gases, líquidos y fluidos supercríticos [3].

Estado	**Densidad, ρ (g/cm^3)**	**Difusividad, D_{11} (cm^2/s)**	**Viscosidad, η (g/cm.s)**
Gas (P=1 atm, T=15-30ºC)	$(0.6 – 2) \times 10^{-3}$	0.1 – 0.4	$(1 – 3) \times 10^{-4}$
Líquido (P=1 atm, T=15-30ºC)	0.6 – 1.6	$(0.2 – 2) \times 10^{-5}$	$(0.2 – 3) \times 10^{-2}$
Supercrítico			
($P=P_c$, $T=T_c$)	0.2 – 0.5	0.7×10^{-3}	$(1 – 3) \times 10^{-4}$
($P=4P_c$, $T=T_c$)	0.4 – 0.9	0.2×10^{-3}	$(3 – 9) \times 10^{-4}$

Su uso como solventes aprovecha el efecto de su alta densidad (del tipo de los líquidos) combinado con su alta difusividad y baja viscosidad (del tipo de los gases).

A continuación se presentará el comportamiento de las principales propiedades termodinámicas y de transporte de interés en la región supercrítica, y se discutirá brevemente el comportamiento peculiar de estas propiedades en las cercanías del punto crítico. Para una mayor profundización, se recomienda la consulta del ya clásico libro *The Properties of Gases and Liquids* [6] así como de los artículos citados a lo largo de la sección.

2.2.1. Propiedades termofísicas

i) Densidad y compresibilidad

La Figura 2.5 muestra el diagrama *presión-volumen* para el CO_2 puro en la proximidad del punto crítico.

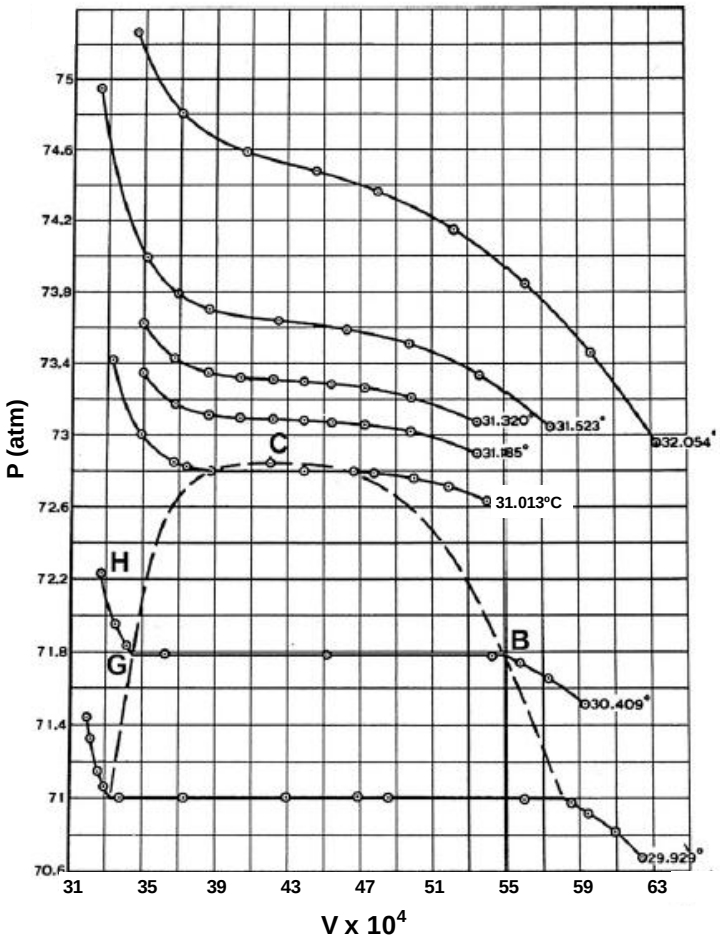


Figura 2.5. Diagrama presión-volumen de CO_2. Adaptado de Guiochon y Tarafder [2].

Si se continúa la trayectoria de la isoterma crítica, se observa que su pendiente es cero en el punto crítico. Como este punto constituye a la vez un punto de inflexión de la isoterma, la criticalidad se caracteriza por las siguientes condiciones:

$$\left(\frac{\partial P}{\partial V}\right)_T = 0 \qquad \left(\frac{\partial^2 P}{\partial V^2}\right)_T = 0$$

Físicamente hablando, esto quiere decir que en la región crítica pequeñas variaciones de presión producen grandes variaciones de densidad. La ***compresibilidad isotérmica*** (K_T) de los fluidos es, pues, infinita en el punto crítico y muy alta en sus inmediaciones:

$$K_T = -\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T$$

Esta característica desaconseja la operación de procesos supercríticos en la región cercana al punto crítico, debido a la dificultad de controlar adecuadamente la densidad [4].

La densidad de los fluidos supercríticos, como se mencionó, es intermedia entre la de los gases y la de los líquidos. Esto les otorga una característica particular: *se trata de fluidos densos, pero a la vez muy compresibles*. Incluso lejos del punto crítico, la dependencia de la densidad con respecto a la presión y la temperatura es marcada: aumenta con la presión (a temperatura constante) y disminuye con la temperatura (a presión constante). La Figura 2.6 muestra varias curvas isotérmicas de densidad de CO_2 en la región supercrítica.

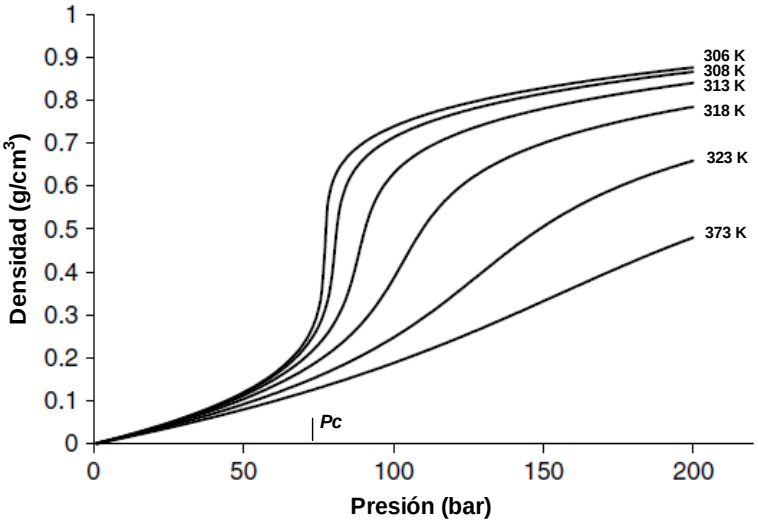


Figura 2.6. Densidad de CO_2 puro en función de la temperatura y la presión [7]

Como se verá, la dependencia de la densidad con respecto a las condiciones de presión y temperatura determina el comportamiento de muchas otras propiedades asociadas a la densidad, como el poder solvente y las propiedades de transporte.

En el caso de mezclas bifásicas *líquido-fluido supercrítico*, parte de los solutos que constituyen la fase líquida son disueltos en la fase supercrítica, a la vez que una cantidad

(que puede ser muy significativa) de fluido supercrítico se disuelve en la fase líquida. Este fenómeno, común en los procesos de separación con fluidos supercríticos, modifica la densidad de ambas fases con respecto a sus densidades originales. Por ejemplo, la Figura 2.7 muestra la variación de densidad de las fases para el sistema CO_2 + aceite de naranja a medida que aumenta la presión y la densidad del CO_2 puro [8]. Nótese que en este sistema la densidad de la fase supercrítica se vuelve mayor a medida que aumenta la concentración de solutos disueltos, a la vez que la densidad de la fase líquida disminuye a medida que se disuelve más CO_2 en ella. El aumento de presión favorece ambos fenómenos, hasta que se alcanza la presión crítica de la mezcla y la densidad de ambas fases se vuelve idéntica.

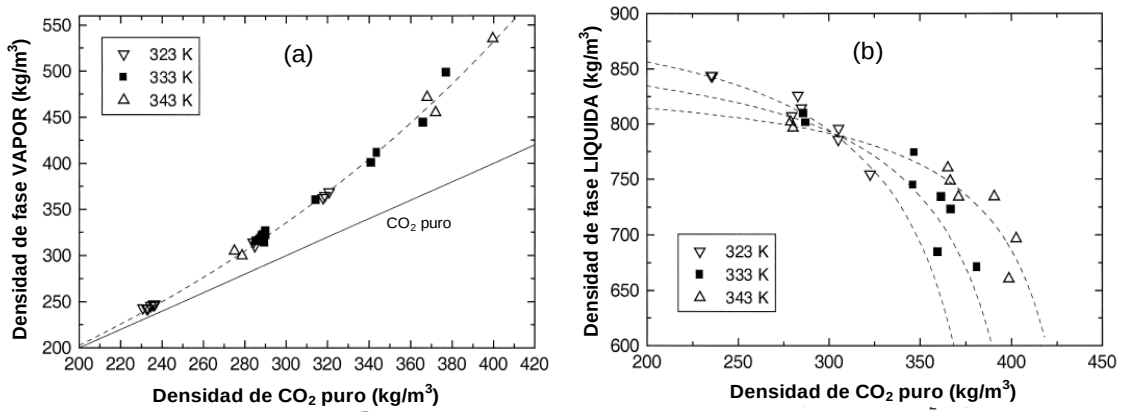


Figura 2.7. Sistema CO_2+aceite de naranja. (a) Densidad de la fase vapor/supercrítica. (b) Densidad de la fase líquida [8].

ii) Capacidad calorífica

La Figura 2.8 muestra la capacidad calorífica a presión constante (C_P) de CO_2 puro en la región cuasi- y supercrítica. A temperaturas bajas, cercanas a la crítica, se observa que C_P pasa por un valor máximo, determinando dos regiones de distinto comportamiento: por debajo de cierto valor de presión, C_P aumenta con la temperatura, mientras que por arriba de esa presión disminuye. A medida que la temperatura aumenta, el efecto se va haciendo menos pronunciado, el valor máximo se va reduciendo y desplazando hacia presiones mayores, hasta llegar a un comportamiento monótonamente creciente con la presión. A densidades altas, C_P tiende a estabilizarse (en torno a 2 J/g· K), y tanto su dependencia con la temperatura como con la presión se vuelve menos significativa.

El comportamiento de C_P cerca de la región crítica es un efecto de las grandes desviaciones que experimenta la densidad y otras propiedades relacionadas en el punto crítico, como se verá más adelante.

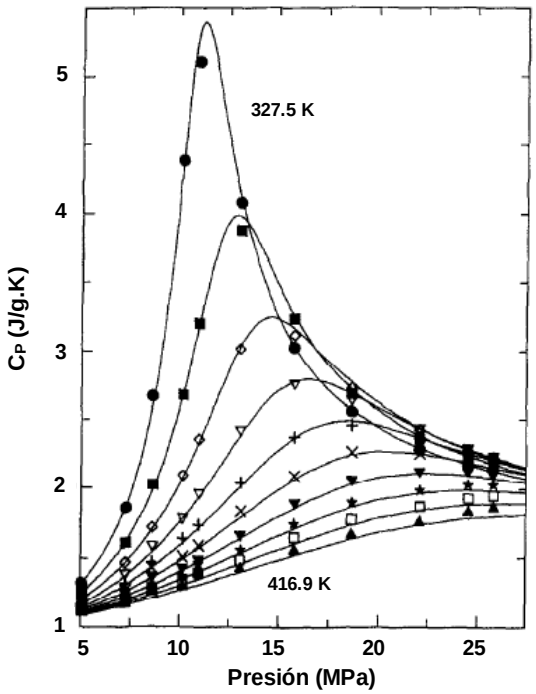


Figura 2.8. Capacidad calorífica a presión constante (C_P) de CO_2 puro en la región supercrítica [9].

iii) Efecto Joule-Thomson

En todo proceso que utiliza fluidos supercríticos, siempre existe alguna etapa que involucra una reducción de la presión. La temperatura de la mayoría de los gases disminuye cuando se reduce rápidamente su presión en forma adiabática (por ejemplo, a través de una válvula). Este fenómeno se denomina ***efecto Joule-Thomson***, en honor a sus descubridores. El *coeficiente de Joule-Thomson* ($h_{J\text{-}T}$) de una sustancia o mezcla fluida se define como la variación de temperatura con respecto a la variación de presión, a enalpía constante:

$$h_{J-T} = \left(\frac{\partial T}{\partial P}\right)_H$$

Y puede derivarse de propiedades volumétricas:

$$h_{J-T} = \frac{T\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P - V}{c_P}$$

El coeficiente de Joule-Thomson de un gas ideal es igual a cero. Para gases reales, es distinto de cero y depende de las condiciones de presión y temperatura. Puede ser positivo o negativo, y la temperatura en la que cambia de signo se denomina *"punto de inversión"* [4].

El efecto de enfriamiento por reducción de presión puede ser particularmente problemático al trabajar con CO_2, dado su alto valor del coeficiente de Joule-Thomson. La presión del punto triple del CO_2 (5.19 bar) es varias veces superior a la atmosférica, por lo que su expansión a presión atmosférica da lugar a su solidificación ("hielo seco"). Del mismo modo pueden precipitar o condensar los solutos, conribuyendo todo ello a la obturación de líneas y válvulas.

La Figura 2.9 muestra el valor de h_{J-T} para CO_2 puro en distintas condiciones de presión y temperatura, de acuerdo a la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST). Allí puede observarse por ejemplo que a 80 bar y 313 K, h_{J-T} es igual a 0.8 K/bar, aproximadamente. Haciendo un cálculo rápido, esto implica que una depresurización isoentálpica desde esas condiciones hasta la presión atmosférica puede producir un descenso de temperatura de 64 K.

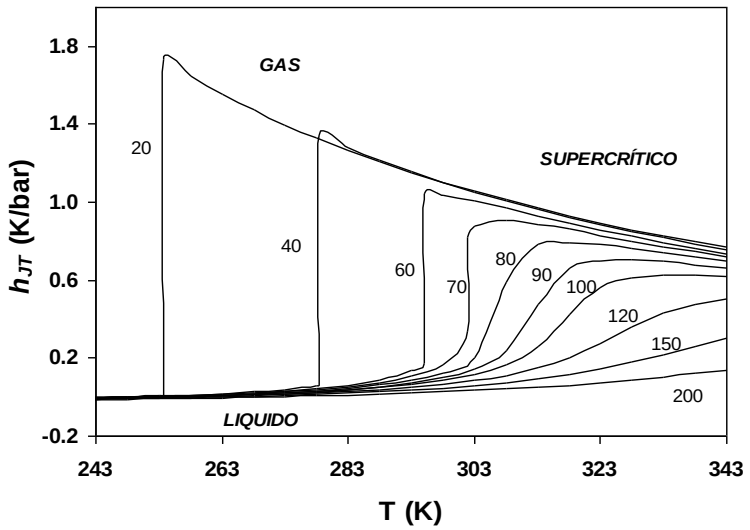


Figura 2.9. Coeficiente de Joule-Thomson (h_{JT}) de CO_2 puro en función de la temperatura para distintas presiones (en bar). Fuente: NIST.

Nótese la discontinuidad en la zona bifásica gas-líquido y el cambio de tendencia que se produce en la región supercrítica, pasando de un comportamiento de tipo líquido a uno de tipo gas a medida que aumenta la temperatura. Asimismo, a medida que se incrementa la presión, el comportamiento de tipo líquido se extiende hacia regiones de mayor temperatura.

2.2.2. Propiedades de transporte

i) Viscosidad

Como se mencionó anteriormente, la viscosidad de los fluidos supercríticos es intermedia entre la de los gases y líquidos comunes, y depende fuertemente de las condiciones de presión y temperatura.

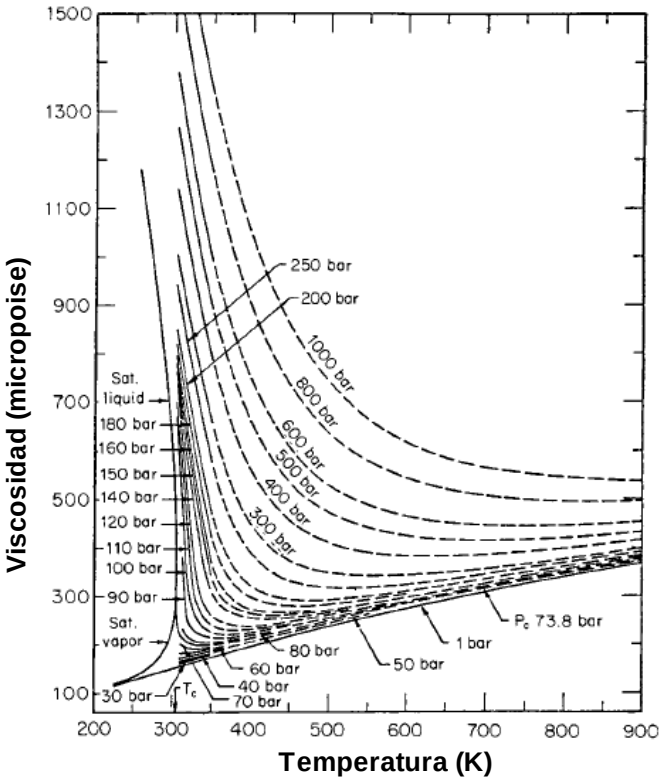


Figura 2.10. Viscosidad de CO_2 en función de P y T [6]

La Figura 2.10 muestra la viscosidad de CO_2 en función de la temperatura, en el rango de condiciones cuasi- y supercríticas. Pueden observarse dos regiones de diferente

comportamiento. A temperaturas reducidas altas, la viscosidad aumenta con la temperatura y la presión, siguiendo un comportamiento de tipo gas. A temperaturas reducidas más bajas y presiones reducidas altas, la viscosidad disminuye fuertemente con la temperatura, evidenciando un comportamiento de tipo líquido. En la cercanía del punto crítico, por otra parte, la viscosidad es muy sensible tanto a la temperatura como a la presión, como puede observarse a partir de las isobaras prácticamente verticales.

Por su parte, en *sistemas complejos* la presencia de solutos en el fluido supercrítico y la disolución del fluido supercrítico en la fase líquida pueden modificar sensiblemente su viscosidad, como se mencionó previamente con respecto a la densidad. Así, por ejemplo, para sistemas binarios constituidos por CO_2 y ácidos grasos se ha observado que la viscosidad de la fase líquida disminuye rápidamente con la presión, a medida que más CO_2 se disuelve en ella, y disminuye con la temperatura. Por otra parte, la viscosidad de la fase supercrítica dependerá de la concentración de solutos disueltos. Si ésta es baja, la viscosidad será prácticamente igual a la del fluido puro; pero a medida que la concentración aumenta, la desviación puede ser importante. La Figura 2.11 muestra estos efectos para el sistema CO_2 + ácido oleico [4].

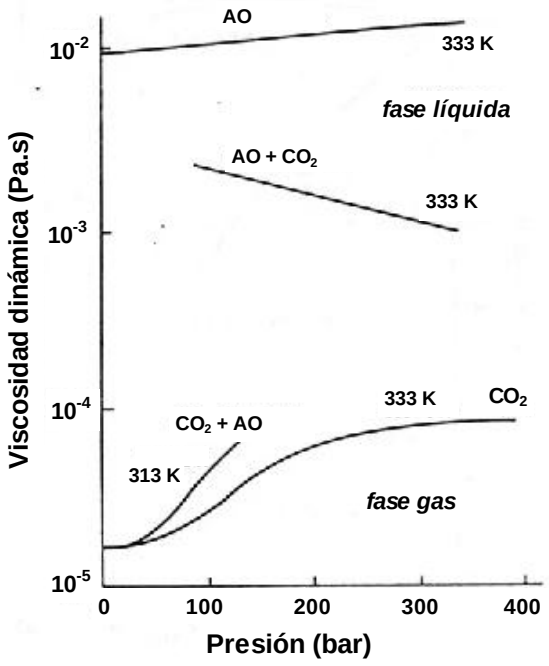


Figura 2.11. Viscosidad del sistema CO_2 + ácido oleico (AO) y de los componentes puros [4].

La viscosidad es un parámetro importante en los procesos supercríticos, ya que tiene gran influencia en la caída de presión en columnas rellenas, en el poder solvente y en la eficiencia de transferencia de masa entre las fases, por lo que es conveniente disponer de herramientas que permitan predecir o estimar su valor en distintas condiciones de proceso [6]. La región de mayor variación de la viscosidad con respecto a la presión es la misma que para la densidad (la región crítica), lo cual sugiere que la densidad es una variable importante para describir el comportamiento de la viscosidad a alta presión. De este modo, las correlaciones existentes normalmente requieren una ecuación de estado para obtener los datos volumétricos necesarios, si no están disponibles directamente. Una revisión reciente de métodos de correlación (aplicados principalmente a CO_2) puede encontrarse en el trabajo de Heidaryan y col. [10].

ii) Conductividad térmica

La conductividad térmica es un proceso vinculado al transporte molecular de energía, y por lo tanto se relaciona con la densidad, la viscosidad y la capacidad calorífica del fluido. Es un parámetro importante de diseño: operar en condiciones de alta conductividad permite una mayor homogeneización de la temperatura, mejorando el control sobre la densidad del solvente y la solubilidad.

En el caso de los gases en condiciones de baja densidad, la conductividad térmica es baja y aumenta linealmente con la presión, a una temperatura dada, tendencia que continúa de modo menos marcado a mayores presiones (hasta 10 bar), con aumentos de aprox. 1% por cada aumento de 1 bar. Asimismo, a presión baja la conductividad aumenta con la temperatura, mientras a que presiones altas disminuye. En la región supercrítica, la conductividad térmica aumenta con la densidad (ver Figura 2.15).

Se han publicado diversos enfoques para correlacionar y predecir la conductividad térmica de fluidos. Una revisión reciente de métodos de correlación (aplicados principalmente a CO_2) puede encontrarse en Jarrahian y Heidaryan [11].

iii) Coeficientes de difusión

La difusión de solutos a través de fluidos supercríticos depende tanto de la energía cinética de las moléculas de soluto como de la resistencia que ofrece el solvente a su movimiento (y por lo tanto de su viscosidad y densidad). Estos efectos pueden evaluarse a través de la dependencia de los coeficientes de difusión con la temperatura y la presión.

La temperatura tiene un efecto positivo sobre la difusión, al incrementar la velocidad de las partículas. La relación normalmente observada es lineal. La presión, en cambio, tiene un efecto opuesto, ya que incrementa la densidad del fluido y su viscosidad. La Figura 2.12(a) muestra tales efectos para el coeficiente de difusión binario (D_{12}) de β-pineno en CO_2 en condiciones de dilución infinita [12]. La Figura 2.12(b), por otra parte, muestra la tendencia del coeficiente de difusión binario de una cetona terpénica (*l*-mentona) en CO_2 supercrítico [13]. La comparación con el β-pineno sugiere que la presencia del grupo carbonilo (polar) no modifica sensiblemente los valores del coeficiente de difusión.

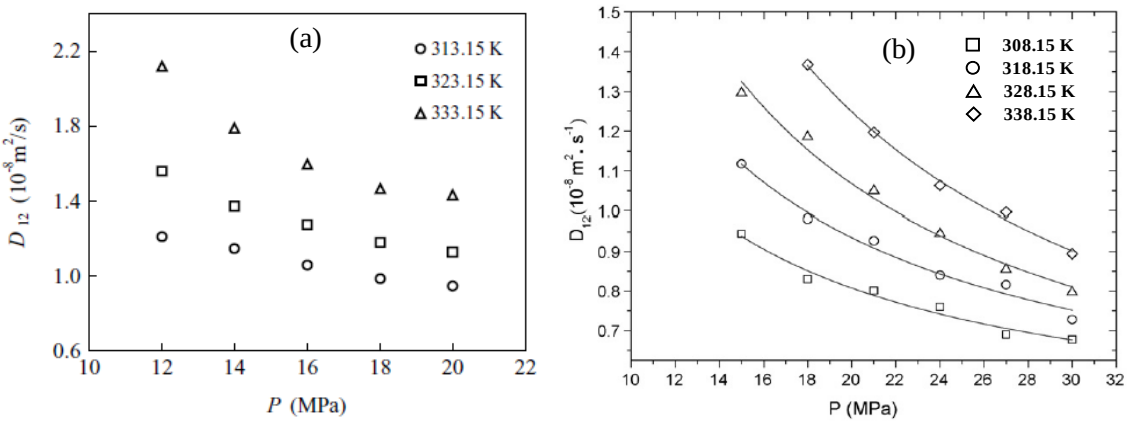


Figura 2.12. Coeficiente de difusión binario (D_{12}) de terpenos en CO_2 supercrítico.
(a) β-pineno [12], (b) *l*-mentona [13].

En las cercanías del punto crítico, los coeficientes de difusión disminuyen abruptamente, como consecuencia del gran aumento de densidad y viscosidad antes mencionado, como puede observarse en la Figura 2.13. Allí se ve el comportamiento de la densidad, la viscosidad y el producto (difusividad × densidad) para el CO_2 puro [2].

Una completa revisión de modelos predictivos, así como de los métodos experimentales para la determinación de coeficientes de difusión y referencias bibliográficas, puede encontrarse en el trabajo reportado por Medina [14].

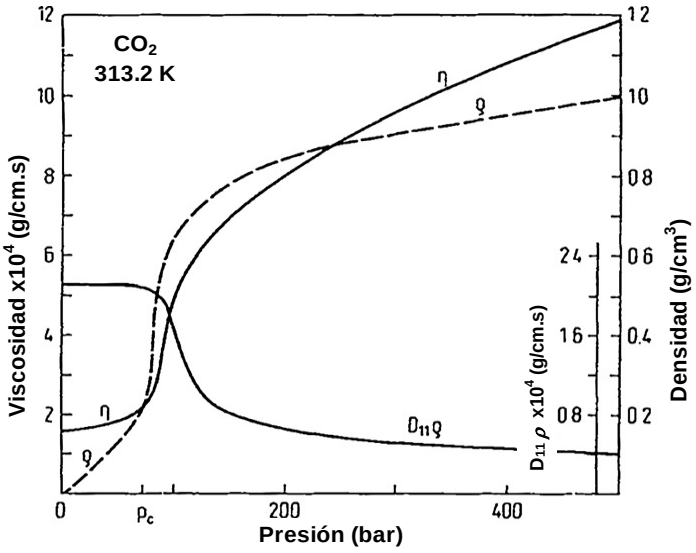


Figura 2.13. Densidad (ρ), viscosidad (η) y producto difusividad x densidad ($D_{11}\ \rho$) para CO_2 [2]

iv) Tensión superficial

La tensión superficial es un fenómeno que aparece en toda interfase gas-líquido (o, en general, entre dos fases fluidas de distinta densidad). Las moléculas situadas en la interfase experimentan una atracción mucho mayor del lado del líquido, originando una tensión que tiende a contraer la superficie de contacto a la mínima área posible. La estabilidad de las interfases depende de la tensión superficial, así como otras propiedades de interés en procesos supercrítico: la capacidad de dispersión de una fase en otra, la capacidad del solvente de penetrar una matriz porosa, etc. Si bien no constituye en sí misma una propiedad de transporte, se la incluye aquí por su influencia en la transferencia de masa entre fases.

En general, la tensión superficial asociada a una interfase depende de la diferencia de densidad entre las fases. Así, para un *fluido puro*, puede estimarse o correlacionarse mediante la siguiente ecuación empírica, propuesta por Macleod [4]:

$$\sigma^{1/4} = [P](\rho_L - \rho_V)$$

en donde [*P*] es un coeficiente denominado "parachor" y los subíndices *L* y *V* indican la fase líquida y vapor respectivamamente.

Para *sistemas multicomponente* puede aplicarse una ecuación análoga, que tiene en cuenta además la composición de cada fase (para cada componente *"i"*):

$$\sigma_m^{1/4} = \sum_i [P_i](\rho_{Lm} x_i - \rho_{Vm} y_i)$$

en donde el subíndice *m* indica que se trata de una mezcla.

Los coeficientes de "parachor" pueden usarse como parámetros ajustables para correlacionar datos experimentales o deducirse a partir de correlaciones empíricas, semi-empíricas, a contribución grupal, etc.

En el caso de sistemas con equilibrio *líquido-fluido supercrítico*, la tensión superficial presenta gran dependencia de las condiciones de presión y temperatura. La tensión superficial disminuye a medida que aumenta la presión, debido a tres fenómenos simultáneos que reducen la diferencia de densidad entre las fases: la mayor disolución de fluido supercrítico en la fase líquida, el aumento de densidad de la fase supercrítica por compresión y el incremento de la concentración de solutos en la fase supercrítica. Al aproximarse al punto crítico de la mezcla, las densidades de ambas fases se vuelven similares, y la tensión superficial tiende a cero. Puede verse un ejemplo en la Figura 2.14, para el sistema CO_2 + escualeno.

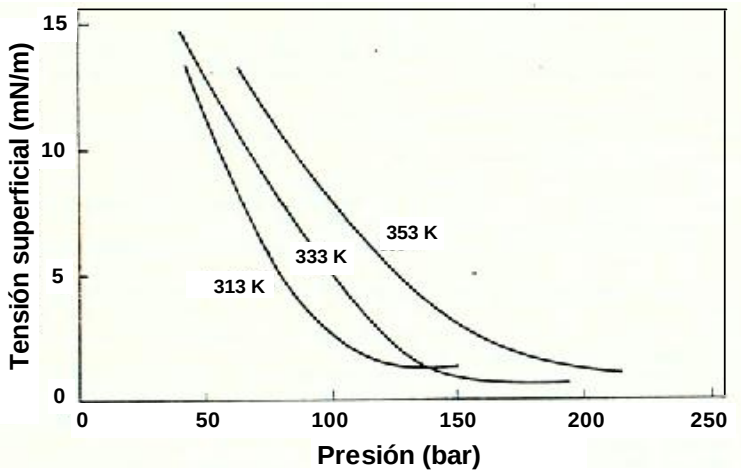


Figura 2.14. Tensión superficial del sistema CO_2 + escualeno. Adaptado de [4].

2.2.3. Propiedades en la proximidad del punto crítico

El punto crítico fue definido de manera *macroscópica* en el inicio de este capítulo. Dedicaremos ahora algunas palabras a una breve descripción *microscópica* de este fenómeno, para comprender las grandes desviaciones que sufren algunas propiedades en

su proximidad y las fallas de los modelos clásicos para representar adecuadamente tales desviaciones.

Las propiedades termodinámicas en el seno de un fluido homogéneo (sea líquido, gas o fluido supercrítico) están determinadas por el promedio estadístico de las interacciones entre la gran cantidad de moléculas que lo constituyen. Localmente, las propiedades del fluido pueden presentar desviaciones con respecto a los valores medios (*fluctuaciones*), cuya distribución puede ser descripta mediante la física estadística. La mayoría de las propiedades de transporte y termoquímicas están relacionadas a la distribución estadística de fluctuaciones. Ahora bien, estas fluctuaciones son de muy corto alcance. Tal es el comportamiento de la densidad: si bien a escala molecular la densidad del fluido puede variar, tales variaciones pierden importancia a medida que se supera la escala de las interacciones intermoleculares, pudiendo finalmente considerarse que el fluido presenta una densidad homogénea en todo su volumen. Y sucede lo mismo con las demás propiedades asociadas a la densidad (y a la composición, en sistemas complejos). De allí que los modelos termodinámicos clásicos son considerados *"modelos de campo medio"*, pues se basan en la suposición de que las interacciones intermoleculares actúan globalmente como un campo medio, independiente de la distribución molecular [16].

Al aproximarse al punto crítico, sin embargo, el comportamiento microscópico del fluido comienza a cambiar. Se forman pequeños dominios de alta y baja densidad (que formarán gotas y burbujas al pasar al estado bifásico) o *clusters* de moléculas de fluido, cuyo alcance ya no es de escala molecular. Las fluctuaciones de corto alcance son reemplazadas por fluctuaciones de largo alcance, y las propiedades macroscópicas ya no son gobernadas por el comportamiento local de las moléculas, sino más bien por una suerte de comportamiento "colectivo" que se establece a través de interacciones de largo alcance [17].

La divergencia de numerosas propiedades en el punto crítico es consecuencia de esta divergencia de las fluctuaciones. Como se ha visto, la variación de la densidad, la capacidad calorífica, la viscosidad y la conductividad térmica es muy grande (o infinita) en el punto crítico, lo cual en términos prácticos quiere decir que presenta valores muy altos en sus inmediaciones. El volumen molar parcial a dilución infinita –gobernado por la compresibilidad– tiende al infinito negativo. Los coeficientes de difusión tienden a cero.

Así como la compresibilidad es infinita, la viscosidad y la conductividad térmica presentan picos en el punto crítico, como puede verse en la Figura 2.15. Este fenómeno se

denomina *"critical enhancement"* y suele incorporarse a los modelos termodinámicos como un término adicional, cuya importancia relativa aumenta con la proximidad al punto crítico. En el caso de la conductividad térmica, puede verse que el efecto del *critical enhancement* es alto, mientras que para la viscosidad es menos importante y acotado a un rango muy estrecho de temperatura.

Los fenómenos críticos pueden sentirse en algunos casos lejos del punto crítico. Usualmente, puede considerarse que las divergencias críticas son significativas en el rango de temperaturas de 1.0–1.3 T_c. Incluso si la mayoría de los procesos industriales evitan deliberadamente la proximidad al punto crítico, las cifras muestran que siempre es necesario tener en cuenta las divergencias críticas [16].

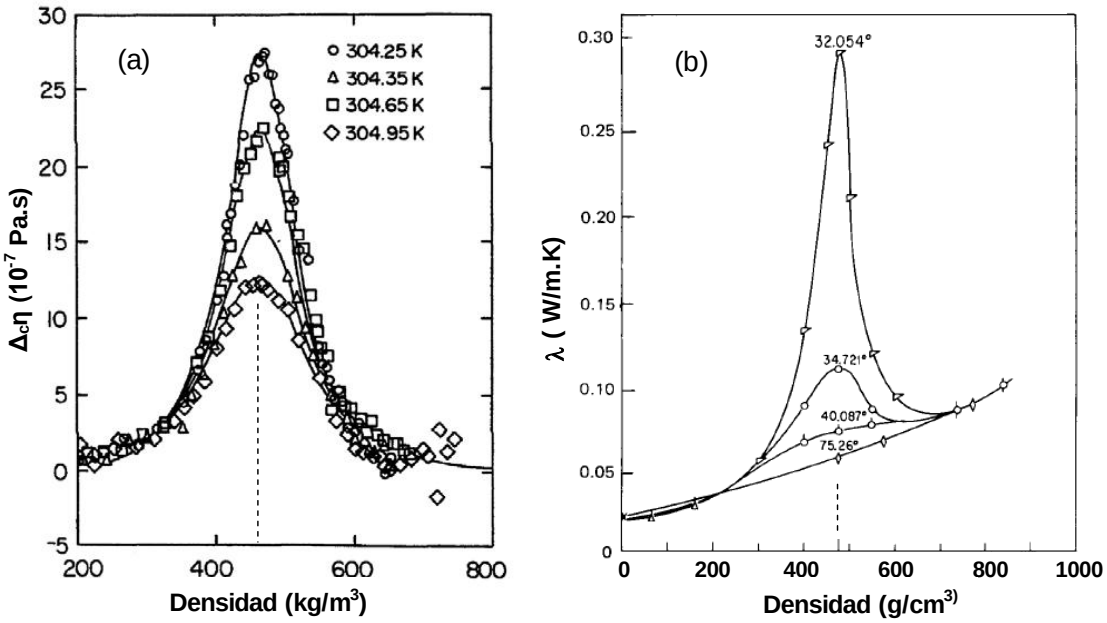


Figura 2.15. *Critical enhancement* (a) de la viscosidad [2] y (b) de la conductividad térmica [6] de CO_2 puro en la cercanía del punto crítico.

Las ecuaciones de estado clásicas predicen desviaciones de las propiedades en la región crítica, pero no de manera correcta. Esta singularidad del punto crítico ha requerido nuevos enfoques matemáticos para su correcta descripción, como la *Teoría de Renormalización de Grupos* [18].

2.3. Solubilidad y solvatación en fluidos supercríticos

2.3.1. Aspectos generales

Como se ha visto, los fluidos supercríticos se caracterizan por tener una alta densidad (como los líquidos) junto a una alta difusividad y baja viscosidad (como los gases), características que les otorgan una muy buena capacidad solvente y de transferencia de masa a través de una interfase. Como además poseen alta compresibilidad, su poder solvente puede ajustarse dentro de un rango muy amplio.

Prácticamente desde su descubrimiento, se observó que los fluidos supercríticos tenían una gran capacidad de disolver solutos de baja volatilidad, superior en varios órdenes de magnitud a la solubilidad teórica en un gas ideal (determinada sólo por la presión de vapor de los solutos). Este incremento es expresado cuantitativamente a través del *factor de mejora o "enhancement"* (E), que relaciona la solubilidad observada y la ideal:

$$E = \frac{y_2 P}{P_2^{sat}}$$

en donde y_2 es la solubilidad en la fase supercrítica y P_2^{sat} la presión de vapor del soluto puro a la misma temperatura.

El comportamiento de la solubilidad en fluidos supercríticos depende fuertemente de las condiciones de presión y temperatura. En general, aumenta exponencialmente con la *presión* (a una temperatura dada), debido al aumento en la densidad del fluido, y por lo tanto de su poder solvente.

La dependencia con la *temperatura* es algo más compleja, ya que se superponen dos efectos: por un lado, la temperatura reduce la densidad (y el poder solvente) del fluido; por otro lado, incrementa la presión de vapor de los solutos, favoreciendo su disolución. El efecto predominante determinará si la solubilidad aumenta o se reduce con la temperatura (a una presión dada). La combinación de todos estos efectos da origen al fenómeno conocido como *"crossover"* o inversión de la solubilidad: existe un valor de presión a partir del cual la dependencia de la solubilidad con la temperatura se invierte. Gráficamente, esto se manifiesta como un entrecruzamiento de las isotermas de solubilidad en función de la presión.

La Figura 2.16 muestra la solubilidad de alcanfor (un terpeno sólido) en CO_2 determinada experimentalmente y calculada mediante la ecuación de estado de Peng-Robinson [19]. Allí pueden observarse los distintos fenómenos mencionados. A bajas presiones, en las que la densidad del fluido es baja, la solubilidad sigue el comportamiento propio de gas ideal, es decir, disminuye con la presión. Sin embargo, luego de pasar por un mínimo, a partir de aprox. 3 MPa se produce un gran aumento de la solubilidad, sobre todo en la región crítica del fluido, observándose la relación exponencial mencionada. Se observa también que a bajas y altas presiones (por debajo de 8 MPa y por encima de 12 MPa, aproximadamente) la solubilidad aumenta con la temperatura, indicando que predomina su influencia sobre la presión de vapor del soluto. En la región intermedia se observa una inversión de este comportamiento, debido a que prevalece el efecto de disminución de la densidad del fluido con la temperatura.

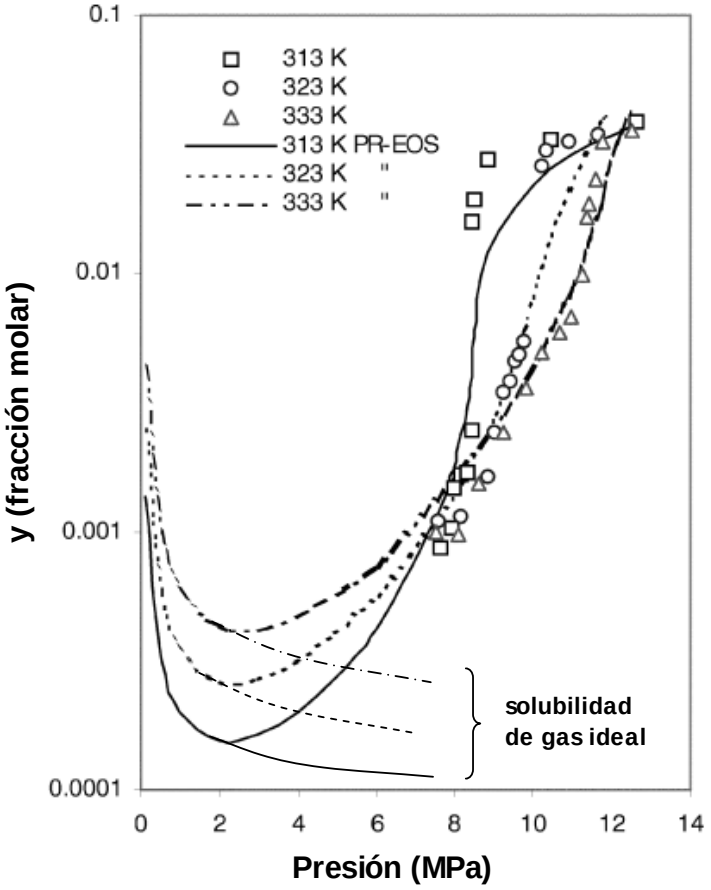


Figura 2.16. Solubilidad de alcanfor en CO_2. Adaptado de [19].

El fenómeno de *crossover* puede ser aprovechado para la separación de dos solutos en un único paso. Para ello se requiere que ambos compuestos tengan distintos puntos de

crossover, como puede observarse esquemáticamente en la Figura 2.17. El método consiste en reducir la temperatura de T_2 a T_1 a una presión intermedia entre los puntos de inversión, con lo que debería precipitar el soluto B puro, dado que la solubilidad de A aumenta. Luego se incremente la temperatura de T_1 a T_2 y se precipita A puro [20].

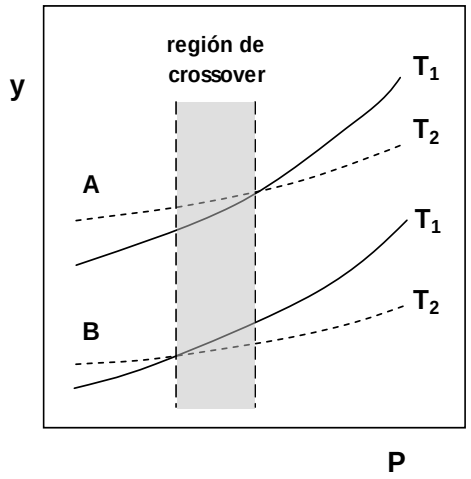


Figura 2.17. Comportamiento de la solubilidad de dos compuestos que exhiben región de *crossover*. Adaptado de [1].

Por otra parte, cuando los solutos son *líquidos* de baja volatilidad, se agrega el efecto de la disolución del propio fluido supercrítico en la fase líquida. Esto puede modificar significativamente las propiedades de dicha fase y afectar las solubilidades.

La solubilidad también depende de la mayor o menor *afinidad química* entre el fluido supercrítico y los solutos. La solubilidad en fluidos apolares o levemente polares (como es el caso del CO_2) en general disminuye con el peso molecular de los solutos y con la presencia de grupos funcionales polares, a iguales condiciones de presión y temperatura, como puede observarse en las curvas de solubilidad que se muestran en la Figura 2.18 correspondientes a varios productos naturales de interés (*p*-quinona, ácido eicosapentaenoico o EPA, ácido oleico y cafeína).

En casos en que la solubilidad es demasiado baja, puede agregarse al fluido supercrítico una cierta cantidad de un compuesto adicional para modificar sus propiedades e incrementar su afinidad por los solutos. Estos compuestos se denominan comúnmente "cosolventes" o "*entrainers*" y tienen por lo general temperaturas críticas más altas que el fluido usado como solvente.

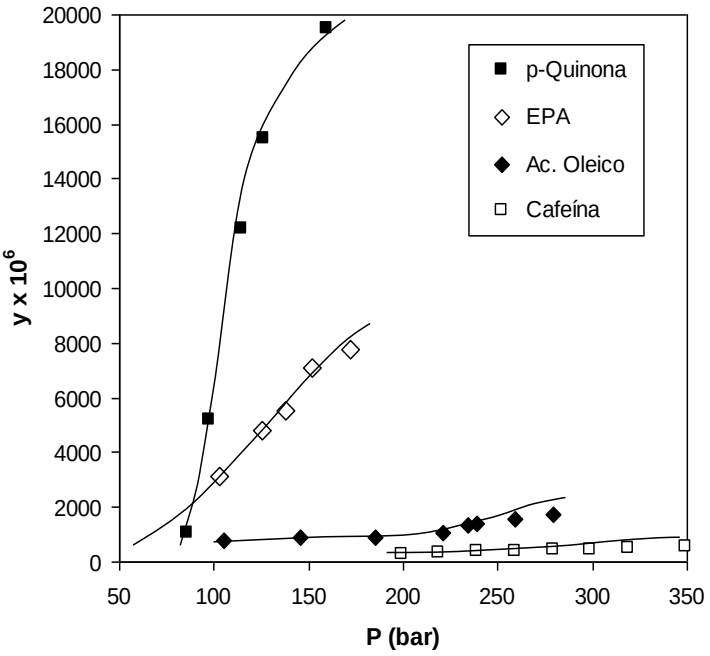


Figura 2.18. Isotermas de solubilidad de algunos compuestos naturales de interés a T=313 K. (Datos tomados de Gupta y Shim [7]).

Los cosolventes *polares* más utilizados son el agua y los alcoholes livianos, que permiten incrementar drásticamente la solubilidad de compuestos polares y/o de alto peso molecular. Otras veces es conveniente utilizar cosolventes *apolares* (como propano u otros hidrocarburos), que mejoran la solubilidad de lípidos y otros componentes apolares de alto peso molecular. El uso de cosolventes también modifica la dependencia del poder solvente del fluido con respecto a la temperatura y la presión, permitiendo por ejemplo la separación y recuperación del solvente con cambios menores en las condiciones.

La Figura 2.19 muestra la solubilidad de fenantreno en CO_2 puro y en mezclas con propano. Puede observarse que la solubilidad aumenta en más de un orden de magnitud a medida que la mezcla se enriquece en propano y se vuelve más afín a este soluto aromático. La Figura 2.20, por otra parte, muestra la influencia de distintos cosolventes en la solubilidad del ácido benzoico en CO_2. Como es esperable, a medida que aumenta la polaridad del cosolvente y la posibilidad de establecer interacciones específicas con el soluto (como puente de hidrógeno), la solubilidad de éste se incrementa significativamente.

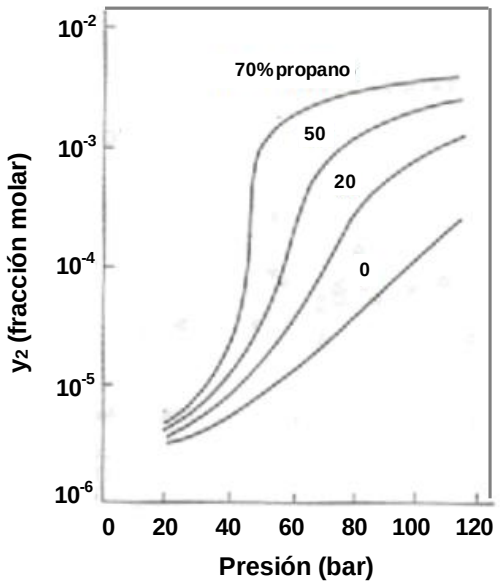


Figura 2.19. Influencia del propano en la solubilidad de fenantreno en CO_2 [4].

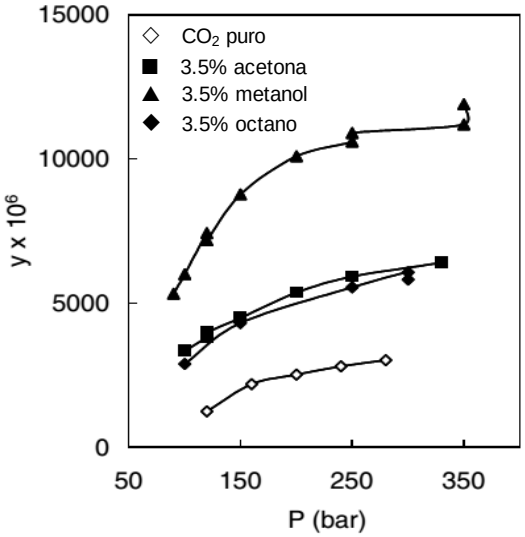


Figura 2.20. Influencia de distintos cosolventes en la solubilidad de ácido benzoico en CO_2 [7].

2.3.2. Volumen molar parcial y poder solvente

Desde un punto de vista termodinámico, el **volumen molar parcial** es una importante propiedad asociada al fenómeno de la solvatación, y permite investigar las interacciones entre soluto y solvente. Se define como la derivada del volumen de un sistema fluido con respecto al número de moles de un componente *"i"* a presión, temperatura y número de moles de los demás componentes constantes:

$$\overline{V_i} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_i} \right)_{P,T,n_j,\ldots}$$

Puede interpretarse como la variación de volumen que se produce al agregar al sistema una cantidad infinitesimal del componente *"i"*. La derivada será positiva si el volumen aumenta y negativa si disminuye, lo cual dependerá de la fuerza relativa de las diferentes interacciones entre moléculas. En el caso de un sistema binario (soluto-solvente), si las interacciones soluto-solvente son más fuertes que las solvente-solvente, el volumen final del sistema será menor que la adición de los respectivos volúmenes, y viceversa.

En el caso del procesamiento supercrítico de productos naturales, en donde los solutos suelen encontrarse en bajas concentraciones, es particularmente interesante el *volumen molar parcial a dilución infinita* (V_i^{∞}) que puede entenderse como la variación de volumen del fluido puro al agregar una cantidad infinitesimal de soluto. En condiciones cercanas al punto crítico, en donde la compresibilidad del fluido todavía es muy alta, los valores de V_i^{∞} tienden a ser muy negativos, por formación de *clusters* o grandes agrupamientos de moléculas de solvente alrededor de las moléculas de soluto (solvatación). A presiones (y densidades) mayores, en donde predominan las fuerzas repulsivas, V_i^{∞} suele tomar valores ligeramente positivos. Un desarrollo más detallado del fenómeno de solvatación en fluidos supercríticos, su análisis espectroscópico y tratamiento matemático puede encontrarse en Johnston y col. [21].

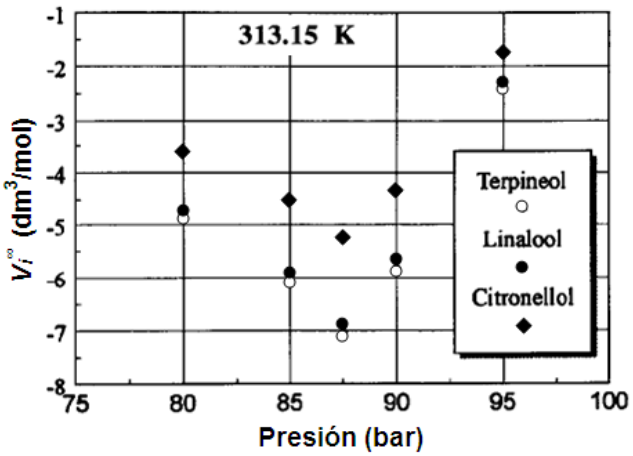


Figura 2.21. Volumen molar parcial a dilución infinita (V_i^{∞}) de algunos terpenos en CO_2 supercrítico [22].

La Figura 2.21 muestra como ejemplo el volumen molar parcial a dilución infinita de varios terpenos diluidos en CO_2 supercrítico (a 313 K y 80–95 bar). Se observa que existe un mínimo en torno a los 87 bar, para esta temperatura.

2.3.3. Modelos semi-empíricos de solubilidad

El cálculo de la solubilidad en fluidos supercríticos forma parte o se desprende del modelado general del equilibrio de fases, y como tal puede obtenerse a partir de una ecuación de estado, como se verá más adelante.

Sin embargo, es útil disponer de expresiones matemáticas simples que permitan correlacionar los datos experimentales de solubilidad con las propiedades del fluido o las condiciones de operación. Entre las expresiones semi-empíricas más conocidas se encuentran los ***modelos basados en la densidad*** (*density-based models*). Estos modelos introducen los efectos combinados de la densidad del fluido puro y la temperatura en el cálculo de la solubilidad de solutos sólidos o líquidos de baja volatilidad, según distintas expresiones funcionales. Se consideran semi-empíricos porque contienen una serie de parámetros que deben ser ajustados a partir de datos experimentales, aunque algunos de ellos tienen significado físico preciso. No tienen capacidad predictiva, pero permiten interpolar datos de manera confiable dentro de su rango de validez.

El modelo más conocido es el propuesto por **Chrastil** [24]. Se basa en la suposición de que una molécula de soluto A se asocia con *k* moléculas del solvente B para formar un complejo de solvatación AB_k (en equilibrio con A y B). La solubilidad se expresa como:

$$\ln S = k \ln \rho_S + \frac{a}{T} + b$$

en donde *S* es la solubilidad (kg/m^3), ρ_S es la densidad del fluido puro en esas condiciones de presión y temperatura (kg/m^3), *k* es el número de asociación, *a* es una constante definida como (ΔH^{vap} + ΔH^{solv})/R y *b* es otra constante relacionada con los pesos moleculares de soluto y solvente. ΔH^{vap} y ΔH^{solv} son las entalpías de vaporización y solvatación del soluto, respectivamente. En la práctica, los parámetros *k*, *a* y *b* se obtienen por regresión lineal múltiple de los datos experimentales. De acuerdo a este modelo, un gráfico *log-log* de la solubilidad en función de la densidad del solvente puro en condiciones isotérmicas debería dar una línea recta.

El modelo de Chrastil tiene algunas limitaciones: no es aplicable en un rango amplio de temperaturas y cuando la concentración de solutos es alta (100–200 kg/m^3).

Varios autores han propuesto modelos alternativos, basados en mayor o menor grado en modificaciones de la ecuación de Chrastil, por ejemplo Méndez-Santiago y Teja [25] y Bartle y col. [26], entre otros.

2.4. Aplicaciones de los fluidos supercríticos

A continuación se da una breve descripción de los principales campos de aplicación de los fluidos supercríticos. Puede encontrarse información más detallada y abundantes ejemplos en las publicaciones referidas en cada caso.

2.4.1. Extracción

Los procesos de extracción supercrítica (*SFE*, por sus siglas en inglés) utilizan un fluido supercrítico (o mezcla fluida supercrítica) como solvente para extraer solutos a partir de una matriz insoluble. Normalmente el contacto es semicontinuo, con flujo de la corriente fluida a través del lecho constituido por la matriz. Luego de la etapa de extracción, la corriente fluida pasa a otro recipiente en el que se produce la separación de los solutos. Esto puede lograrse por distintos medios: modificación de la presión y/o la temperatura, absorción en otro solvente, adsorción en un lecho de material adsorbente, etc. [4].
El rendimiento de la extracción (es decir, la cantidad de soluto que puede extraerse con una determinada cantidad de solvente) depende de las condiciones de presión y temperatura, por su influencia sobre el poder solvente del fluido y la presión de vapor de los solutos, como se dijo anteriormente. Por otra parte, los efectos de transferencia de masa tienen gran influencia en los aspectos cinéticos del proceso, por lo que parámetros tales como el caudal de solvente, tamaño de partícula y pretratamiento de la matriz son también fundamentales para el control del proceso. El uso de cosolventes es otra manera de incrementar el rendimiento y/o la selectividad de la extracción. Diversos autores han reportado extensas revisiones sobre la extracción supercrítica de productos naturales en general [27][28][29][30], así como de aceites esenciales y terpenos en particular [31][32].

2.4.2. Fraccionamiento

En estos procesos, el fluido supercrítico se utiliza como agente de separación de mezclas. El fluido se pone en contacto con la mezcla a separar (en forma continua o semicontinua) en condiciones de presión y temperatura tales que permitan la formación de dos fases.

Los componentes de la mezcla se distribuyen de manera diferente entre ambas fases: los compuestos más volátiles tenderán a pasar a la fase supercrítica, mientras que los menos volátiles quedarán en la fase líquida.

El fraccionamiento supercrítico combina las ventajas tanto de la destilación como de la extracción líquida, ya que separa los componentes tanto por sus diferencias de presión de vapor como por interacciones específicas, por lo que se ha propuesto el nombre de *"destracción"* para este fenómeno [33]. Este proceso se tratará con más detalle en los capítulos siguientes.

2.4.3. Cromatografía

Los fluidos supercríticos también han sido propuestos y estudiados como fase móvil en cromatografía, tanto a nivel preparativo (purificación de muestras) como analítico. En cromatografía gaseosa, la separación entre componentes se basa en sus presiones de vapor, por lo que la temperatura es el principal parámetro controlante. En cromatografía líquida, la fase móvil es una mezcla de solventes de polaridad variable, por lo que la separación se basa fundamentalmente en las interacciones específicas existentes entre la mezcla fluida y los analitos: la composición de la fase móvil es, pues, el prinicipal parámetro controlante de la separación. La cromatografía supercrítica (*SFC*, por sus siglas en inglés), en cambio, aprovecha ambos efectos. La separación es controlada mediante cambios en la presión y la temperatura del fluido, que modifican tanto su densidad y poder solvente como la presión de vapor de los solutos. El uso de cosolventes puede inducir además interacciones específicas que mejoren la separación. Por medio de la cromatografía supercrítica es posible analizar y separar compuestos termolábiles y/o de baja volatilidad, así como investigar y determinar algunas propiedades físico-químicas de sistemas fluidos, como coeficientes de difusión.

Una muy buena revisión de las características, aplicaciones y perspectivas de la cromatografía supercrítica ha sido publicada por Guiochon y Tarafder [2].

2.4.4. Precipitación y formación de partículas

El aprovechamiento de los grandes cambios de solubilidad con la presión para la precipitación de solutos a partir de soluciones supercríticas es un campo de gran interés y buenas perspectivas, en particular para las industrias farmacéuticas.

En líneas generales, estos procesos consisten en una etapa de disolución de la droga o soluto de interés en un fluido supercrítico y su posterior despresurización controlada, para obtener partículas sólidas o líquidas, cápsulas, *composites*, espumas, fibras, etc. Las principales tecnologías que utilizan este fenómeno y sus principios generales se resumen a continuación. Para un tratamiento más detallado, así como una presentación de ejemplos, se recomienda la lectura de las revisiones publicadas por Cocero y col. [34] y Weidner [35].

i) Expansión rápida de soluciones supercríticas (RESS)

Este método consiste en saturar un fluido supercrítico con uno o más solutos y posteriormente expandir la solución de manera rápida a un recipiente a presión más baja, a través de un inyector (*nozzle*) calefaccionado, produciéndose la precipitación de los solutos en forma de pequeñas partículas, fibras o películas (si se dirige la corriente expandida contra una superficie). El tamaño, la morfología y la distribución de las partículas puede modularse según las condiciones de despresurización. Con esta técnica también pueden producirse materiales compuestos o cápsulas disolviendo tanto la sustancia activa como el material de recubrimiento en el solvente supercrítico y co-precipitando ambos. La principal limitación de esta tecnología es la baja solubilidad que presentan la mayoría de los sustratos de interés en fluidos supercríticos, lo que obliga a utilizar presiones demasiado elevadas o cosolventes, cuya posterior separación puede ser problemática.

ii) Precipitación supercrítica por efecto anti-solvente (SAS)

En este proceso, el fluido supercrítico no actúa como solvente, sino como "anti-solvente". El soluto de interés se disuelve en un solvente líquido tradicional. Luego se agrega un fluido supercrítico a la solución. Al producirse la mezcla, y dependiendo de las condiciones de presión, temperatura y transferencia de masa, el fluido supercrítico "extrae" el solvente líquido. La concentración de soluto aumenta, alcanza la saturación,

luego la sobresaturación y finalmente se produce la nucleación y formación de partículas de tamaño micrométrico o nanométrico. La termodinámica de estos procesos es más complicada, ya que involucra al menos tres componentes (soluto, solvente y fluido supercrítico) en tres estados diferentes de agregación. Además, se requieren etapas adicionales para remover el solvente residual de las partículas formadas y para purificar el gas antes de su recirculación.

iii) Partículas a partir de soluciones saturadas de gas (PGSS)

Con esta tecnología pueden tratarse sustancias de baja solubilidad (o incluso insolubles) en fluidos supercríticos. Consiste en disolver el fluido supercrítico en una solución o suspensión del soluto de interés en algún solvente líquido, formando lo que se denomina "solución saturada de gas". Tal solución es luego despresurizada de manera rápida, produciéndose la precipitación del soluto en forma de partículas. La disminución de temperatura ocasionada por la expansión del fluido favorece la precipitación. El fluido supercrítico actúa también como agente de atomización y como reductor de la viscosidad de la solución.

iv) Impregnación con solventes supercríticos (SSI)

En este caso, se disuelve el/los solutos en el fluido supercrítico y luego se pone en contacto el fluido con la matriz sólida a impregnar (que puede ser un polímero, un material poroso, un lecho de partículas, etc.). Las condiciones de presión y temperatura determinarán la distribución de los solutos entre la fase fluida y la matriz (coeficientes de partición). Luego el sistema es despresurizado a velocidad controlada, produciéndose una rápida precipitación de solutos. Por lo tanto, parte de los solutos son adsorbidos y parte son simplemente depositados/precipitados sobre la matriz. En el caso de la impregnación de polímeros, el fluido supercrítico actúa a la vez como solvente y como agente plastificante, favoreciendo la penetración de solutos en la matriz [36].

2.4.5. Reacción

En este caso, el fluido supercrítico actúa como medio de reacción, pudiendo tomar parte o no en ella. En el caso de las reacciones heterogéneas gas-líquido, el agregado de un

solvente supercrítico permite llevar el sistema a condiciones de homogeneidad, con lo cual desaparece la resistencia a la transferencia de masa asociada a la interfase y mejora el contacto entre reactivos y catalizadores, incrementándose la velocidad de reacción [37][38]. En tal sentido, se ha estudiado la hidrogenación catalítica de aceites vegetales [39] y terpenos [40] utilizando CO_2 o propano como solventes supercríticos. Otra aplicación importante es la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales y alcoholes supercríticos. En este caso, el alcohol actúa como reactivo y como solvente a la vez, permitiendo operar en condiciones homogéneas y evitándose el uso de catalizadores [41].

2.5. Conclusiones

Como se ha visto, los fluidos supercríticos pueden actuar como solventes muy adecuados en distintos tipos de problemas de separación y de reacción, ya que combinan una alta densidad (similar a los líquidos) con una baja viscosidad y alta difusividad (como los gases). El CO_2 en particular es el solvente preferido para el procesamiento de productos naturales, debido a que permite operar en condiciones moderadas de temperatura, no es tóxico ni inflamable y se evapora completamente al despresurizar. Esto ha permitido su aplicación en procesos de extracción, fraccionamiento de mezclas, cromatografía, impregnación, formación de partículas y sistemas reactivos.

Una característica fundamental de estos fluidos es la posibilidad de modificar sus propiedades en un amplio rango, desde el comportamiento típico de un líquido al de un gas. Es posible incrementar o reducir su densidad (y las demás propiedades asociadas) simplemente variando las condiciones de presión y/o temperatura. Ello permite a su vez ajustar su capacidad de disolver solutos (poder solvente), propiedad que combina los efectos de la densidad, la presión de vapor de los solutos y la afinidad química entre soluto y solvente.

De acuerdo al tipo de proceso o problema, puede ser necesario operar en condiciones de una única fase (como en la extracción o en sistemas reactivos) o en condiciones heterogéneas (como en el fraccionamiento). También puede ser deseable operar en condiciones de alta o de baja solubilidad (como en las etapas de separación de los solutos disueltos o en procesos de formación de partículas). Todo esto implica conocer el estado

de fases del sistema (y las propiedades de dichas fases) en amplios rangos de presión, temperatura y composición, para poder seleccionar las condiciones más adecuadas al problema en cuestión. Esta idea es el concepto fundamental de la *Ingeniería del Equilibrio de Fases*, tema que se introducirá en el siguiente capítulo aplicado a columnas de fraccionamiento supercrítico.

REFERENCIAS

[1] Brennecke, J.F., Eckert, C.A. *Phase equilibria for supercritical fluid process design (Review).* AIChE Journal 35, 9 (1989) 1409-1427.

[2] Guiochon, G., Tarafder, A.. *Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography (Review)*. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1037-1114.

[3] Rizvi, S.S.H., Benado, A.L., Zollweg, J.A., Daniels, J.A. *Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and modeling methods.* Food Technology 40, 6 (1986) 55-65.

[4] Brunner, G. *Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes.* Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1994.

[5] Bertucco, A., Vetter, G. (Eds.). *High Pressure Process Technology, Fundamentals and Applications.* Elsevier Science B.V, Amsterdam, 2001.

[6] Poling, B.E., Prausnitz, J.M., O'Connell, J.P. *The Properties of Gases and Liquids.* 5th Ed. McGraw-Hill, New York (USA), 2001.

[7] Gupta, R.B., Shim, J.J. *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (USA), 2007.

[8] Budich, M., Brunner, G. *Vapor-liquid equilibrium data and flooding point measurements of the mixture carbon dioxide + orange peel oil.* Fluid Phase Equilibria 158-160 (1999) 759-773.

[9] Dordain, L., Coxam, J.Y., Quint, J.R., Lemmon, E.W., Penoncello, S.G. *Isobaric heat capacities of carbon dioxide and argon between 323 and 423 K and at pressures up to 25 MPa.* Journal of Supercritical Fluids 8 (1995) 228-235.

[10] Heidaryan, E., Hatami, T., Rahimi, M., Moghadasi, J. *Viscosity of pure carbon dioxide at supercritical region: Measurement and correlation approach.* Journal of Supercritical Fluids 56 (2011) 144-151.

[11] Jarrahian, A., Heidaryan, E. *A novel correlation approach to estimate thermal conductivity of pure carbon dioxide in the supercritical region.* Journal of Supercritical Fluids 64 (2012) 39-45.

[12] Silva, C.M., Filho, C.A., Quadri, M.B., Macedo, E.A. *Binary diffusion coefficients of α-pinene and β-pinene in supercritical carbon dioxide.* Journal of Supercritical Fluids 32 (2004) 167-175.

[13] Dong, X., Su, B., Xing, H., Yang, Y., Ren, Q. *Diffusion coefficients of L-menthone and L-carvone in mixtures of carbon dioxide and ethanol.* J. of Supercritical Fluids 55 (2010) 86-95.

[14] Medina, I. *Determination of diffusion coefficients for supercritical fluids (Review)*. Journal of Chromatography A 1250 (2012) 124-140.

[15] Scalabrin, G., Piazza, L. *Analysis of forced convection heat transfer to supercritical carbon dioxide inside tubes using neural networks.* International Journal of Heat and Mass Transfer 46 (2003) 1139-1154.

[16] Carlès, P. *A brief review of the thermophysical properties of supercritical fluids.* Journal of Supercritical Fluids 53 (2010) 2-11.

[17] Llovell Ferret, F.L. *Accurate description of the critical region by a molecular-based equation of state with a crossover treatment* (PhD Thesis). Universitat Autónoma de Barcelona (2006).

[18] Chimowitz, E.H. *Introduction to critical phenomena in fluids.* Oxford University Press. 2005.

[19] Akgun, M., Akgun, N.A., Dincer, S. *Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide.* J. of Supercritical Fluids 15 (1999) 117-125.

[20] Chimowitz, E.H., Pennisi, K.J. *Process synthesis concepts for supercritical gas extraction in the crossover region*. AIChE Journal 32 (1986) 1665.

[21] Johnston, K.P., Kim, S., Combes, J. *Spectroscopic determination of solvent strength and structure in supercritical fluid mixtures: a review*. In: Supercritical Fluid Science and Technology (Eds: K.P. Johnston y J.M.L. Penninger), American Chemical Society, Washington, 1989.

[22] Cortesi, A., Kikic, I., Spicka, B., Magoulas, K., Tassios, D. *Determination of partial molar volumes at infinite dilution of alcohols and terpenes in supercritical carbon dioxide.* Journal of Supercritical Fluids 9 (1996) 141-145.

[23] Hildebrand, J.H., Scott, R.L. *The solubility of non-electrolytes*. Dover Publications, New York, 1964,

[24] Chrastil, J. *Solubility of solids and liquids in supercritical gases*. J. of Physical Chemistry 86 (1982) 3016-3021.

[25] Méndez-Santiago, J., Teja, A. *The solubility of solids in supercritical fluids*. Fluid Phase Equilibria 158-160 (1999) 501-510.

[26] Bartle, K.D., Clifford, A.A., Jafar, S.A., Shilstone, G.F. *Solubilities of solids and liquids of low volatility in supercritical carbon dioxide.* J. of Physical and Chemical Reference Data 20 (1991) 713-756.

[27] Pereira, C.G., Meireles, M.A.A. *Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives*. Food Bioprocess Technology 3 (2010) 340-372.

[28] Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibañez, E. *Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications (Review)*. J. of Chromatography A 1217 (2010) 2495-2511.

[29] Reverchon, E., De Marco, I. *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter (Review).* J. of Supercritical Fluids 38 (2006) 146-166.

[30] Catchpole, O.J., Tallon, S.J., Eltringham, W.E., Grey, J.B., Fenton, K.A., Vagi, E.M., Vyssotski, M.V., MacKenzie, A.N., Ryan, J., Zhu Y. *The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids (Review).* J. of Supercritical Fluids 47 (2009) 591-597.

[31] Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. *Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis (Review).* J. of Chromatography A 1163 (2007) 2-24.

[32] Reverchon, E. *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.* J. of Supercritical Fluids 10 (1997) 1-37.

[33] Zosel, K. *Separation with supercritical gases: Practical applications (Review).* Angewandte Chemie International Edition in English 17 (1978) 702-709.

[34] Cocero, M.J., Martín, A., Mattea, F., Varona, S. *Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications.* Journal of Supercritical Fluids 47 (2009) 546-555.

[35] Weidner, E. *High pressure micronization for food applications (Review)*. Journal of Supercritical Fluids 47 (2009) 556-565.

[36] Kikic, I., Vecchione, F. *Supercritical impregnation of polymers.* Current Opinion in Solid State and Materials Science 7 (2003) 399-405.

[37] Pereda, S., Bottini, S.B., Brignole, E.A. *Supercritical fluids and phase behavior in heterogeneous gas-liquid catalytic reactions.* Applied Catalysis A: General 281 (2005) 129-137.

[38] Nunes da Ponte, M. *Phase-equilibrium-controlled chemical reaction kinetics in high pressure carbon dioxide (Review).* Journal of Supercritical Fluids 47 (2009) 344-350.

[39] Piqueras, C., Bottini, S., Damiani, D. *Sunflower oil hydrogenation on Pd/Al_2O_3 catalysts in single-phase conditions using supercritical propane.* Applied Catalysis A: General 313 (2006) 177-188.

[40] Chouchi, D., Gourgouillon, D., Courel, M., Vital, J., Nunes da Ponte, M. *The influence of phase behavior on reactions at supercritical conditions: The hydrogenation of α-pinene.* Industrial & Engineering Chemistry Research 40 (2001) 2551-2554.

[41] Valle, P., Velez, A., Hegel, P., Mabe, G., Brignole, E.A. *Biodiesel production using supercritical alcohols with a non-edible vegetable oil in a batch reactor*. J. of Supercritical Fluids 54 (2010) 61-70.

3. Fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales e Ingeniería del equilibrio entre fases

3.1. Fraccionamiento con fluidos supercríticos

3.1.1. Aspectos generales

En el capítulo previo se describieron brevemente los distintos procesos que utilizan o pueden utilizar fluidos supercríticos, aprovechando sus propiedades como solvente, anti-solvente, agente de separación o medio de reacción. Entre tales aplicaciones se mencionó el fraccionamiento de mezclas naturales.

Si bien la gran mayoría de los trabajos publicados hasta el presente en el área del procesamiento de productos naturales con fluidos supercríticos se refieren a la extracción a partir de matrices sólidas (hojas, semillas, etc.), en las últimas décadas se ha incrementado su aplicación en procesos de fraccionamiento, ya sea para separar mezclas líquidas en sus componentes o fracciones constituyentes o bien para purificar o mejorar la calidad de extractos obtenidos por técnicas convencionales [1]. Entre los ejemplos más conocidos podemos mencionar el fraccionamiento de aceite de pescado para obtener ácidos grasos insaturados y sus ésteres [2][3]; la purificación de escualeno, tocoferoles, fitosteroles y otros componentes de alto valor agregado a partir de aceites vegetales [4][5]; la concentración de aromas en aceites esenciales de cítricos [6][7]; la extracción de alcoholes a partir de soluciones acuosas [8]; la remoción de solventes y otros contaminantes en aceites comestibles [9], entre otras aplicaciones.

En el contexto de esta tesis, se denomina **fraccionamiento** al proceso por el cual una mezcla líquida de dos o más componentes se separa en dos (o más) productos o fases de distinta composición, enriquecidos en uno u otro de los componentes (o grupos de componentes) de la mezcla. El esquema general de un proceso de fraccionamiento se muestra en la Figura 3.1.

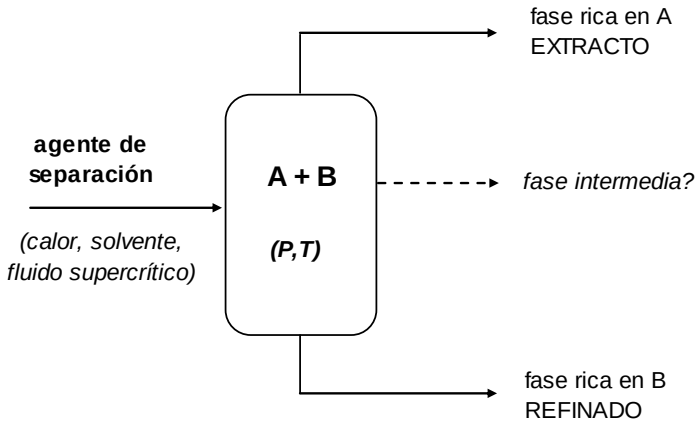


Figura 3.1. Esquema general de un proceso de fraccionamiento

El proceso clásico de fraccionamiento es la ***destilación***, en la cual se genera un vapor rico en los componentes más volátiles de la mezcla y un líquido rico en los componentes menos volátiles. En este proceso, el agente de separación es la energía suministrada al sistema en forma de calor, y los componentes o fracciones se separan en función de su volatilidad (es decir, de su presión de vapor). Muchas veces, la destilación se realiza en condiciones de baja presión (vacío) para poder operar a menor temperatura y evitar la termodegradación de compuestos sensibles.

Otro proceso típico de fraccionamiento es la ***extracción líquido-líquido***, en la cual se agrega al sistema un solvente líquido que forma una nueva fase, extrayendo selectivamente un componente (o grupo de componentes) de la mezcla. En este caso, los componentes se separan en función de la mayor o menor afinidad química por el solvente, determinada fundamentalmente por su polaridad.

Las distintas ***técnicas cromatográficas*** constituyen también procesos de fraccionamiento a nivel molecular, que utilizan efectos de volatilidad (cromatografía de gases) o de afinidad química (cromatografía líquida) para desorber selectivamente los compuestos adsorbidos a la columna.

En el caso del ***fraccionamiento supercrítico***, la separación se logra mediante el agregado de un fluido supercrítico a la mezcla en condiciones tales que se generen dos fases. Normalmente se forma una fase de mayor densidad –constituida por la mezcla líquida y una cantidad variable de solvente supercrítico disuelto en ella– y una fase de menor densidad –constituida fundamentalmente por el fluido supercrítico. Los componentes de la mezcla se distribuyen entre ambas fases de acuerdo a dos mecanismos simultáneos: su mayor o menor afinidad (química) por el fluido supercrítico y su mayor o menor

volatilidad. Esta combinación de los mecanismos propios de la destilación y de la extracción líquida es característica del fraccionamiento supercrítico, por lo que se ha propuesto el nombre de *"destracción"* para este fenómeno [10].

En esta tesis se usará la nomenclatura comúnmente utilizada en la extracción para referirse a las fases en contacto. La fase de menor densidad se denominará "extracto", "fase liviana", "fase vapor" o "fase supercrítica". En este último caso, debe tenerse en cuenta que desde el punto de vista de la mezcla no se trata en realidad de una fase en estado supercrítico (ya que el sistema es bifásico), sino que alude al hecho de que el principal componente de la fase es el solvente, que se encuentra en condiciones supercríticas. Por su parte, la fase más densa se denominará "refinado", "fase pesada" o "fase líquida".

3.1.2. Columnas de fraccionamiento

El fraccionamiento supercrítico de alimentaciones líquidas se realiza normalmente en *columnas continuas de múltiples etapas*, en donde las fases se ponen en contacto a la vez que fluyen en contra-corriente, como en los procesos tradicionales de destilación o extracción. Este tipo de columnas permite reducir la cantidad de solvente necesario, incrementa los rendimientos y permite obtener productos de elevada pureza. Por otra parte, su uso es prácticamente imprescindible cuando se desea separar compuestos cuyas volatilidades son parecidas o que presentan una gran afinidad química [11][12].

La Figura 3.2 muestra el esquema general de un equipo de fraccionamiento supercrítico en contracorriente. Dicho equipo consiste básicamente en:

a) una columna a través de la cual las corrientes fluyen y se ponen en contacto;
b) un separador superior en donde se obtienen el producto de tope (extracto) y una corriente de solvente supercrítico prácticamente puro;
c) un separador inferior para recuperar los productos de fondo (refinado);
d) dispositivos para alimentar la columna, recircular el solvente y realimentar parte del extracto a la columna (reflujo).

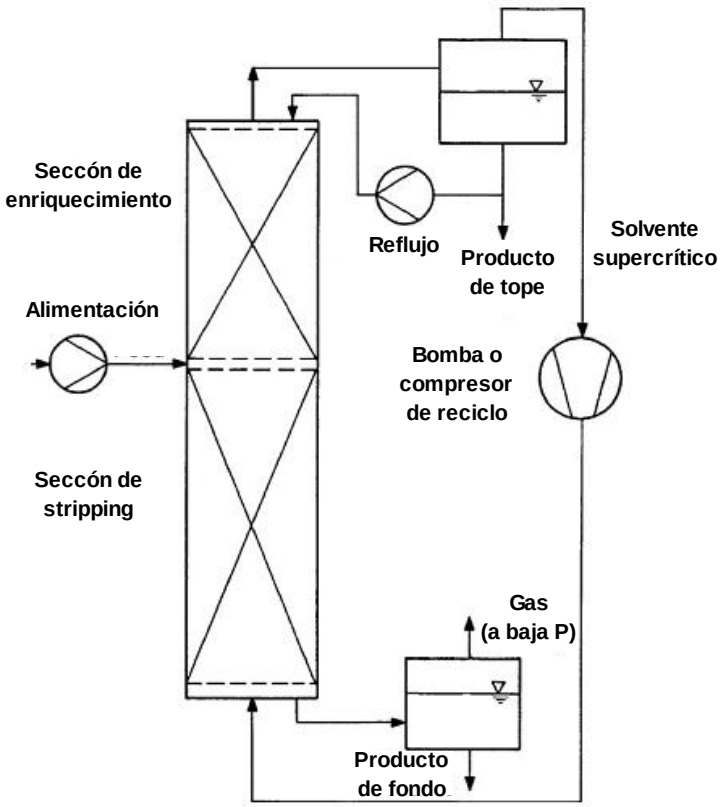


Figura 3.2. Esquema de un equipo de fraccionamiento supercrítico continuo en contracorriente. Adaptado de [11].

Si la alimentación se introduce por el tope, se trata de una columna a ***contracorriente simple***, constituyendo una única cascada de separación. Si en cambio se introduce en alguna etapa intermedia, la columna consistirá en dos secciones o cascadas, separadas por el punto de alimentación de la mezcla a fraccionar: una sección superior de *enriquecimiento* y una sección inferior de *despojo* o "stripping". En la sección de enriquecimiento, los productos de fondo (menos volátiles) son separados de los productos de tope (más volátiles) por la corriente líquida descendente generada por el reflujo y enviados hacia la sección inferior. En la sección de "stripping" los productos de tope son separados de los productos de fondo por la corriente gaseosa ascendente y enviados hacia la sección superior. La columna se opera generalmente de manera isotérmica, aunque es posible utilizar un gradiente térmico longitudinal, generándose de este modo un efecto de reflujo interno de los solutos menos volátiles por reducción de la solubilidad a medida que aumenta la temperatura.

Tanto en el tope como en el fondo, los productos se separan del solvente supercrítico en recipientes separadores, generalmente operados en condiciones de presión y temperatura

diferentes a las de la columna. En el separador de tope, una parte variable del extracto puede realimentarse a la columna. Este *reflujo externo* introduce una variable adicional de operación que permite mejorar el desempeño de la separación. Por su parte, una vez separado del extracto, el solvente supercrítico es recirculado al fondo de la columna mediante un sistema de reacondicionamiento (intercambiadores de calor y compresores o bombas), requiriéndose generalmente una cierta cantidad extra de solvente nuevo (*make-up*) para reponer pérdidas.

También es posible operar columnas de fraccionamiento de manera ***semi-continua*** (o fraccionamiento *"batch"*). Un esquema de este sistema se muestra en la Figura 3.3. En el caso más común, se carga en la parte inferior del equipo (sección de extracción) una cantidad dada de alimentación líquida y una corriente continua de solvente supercrítico fluye a través de ella, saturándose y ascendiendo por una columna de etapas múltiples en donde se pone en contacto con una corriente líquida descendente de reflujo (generado externa o internamente). La composición del líquido varía a lo largo del tiempo, enriqueciéndose en los componentes menos volátiles a medida que la corriente de solvente va removiendo los más volátiles. Por el tope se extrae en forma continua el extracto, cuya composición también varía en el tiempo, hasta alcanzar el nivel deseado de agotamiento de la alimentación.

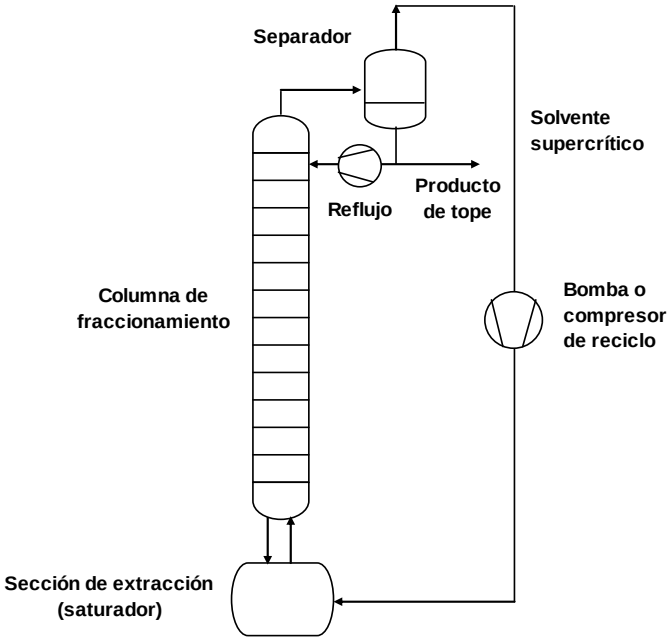


Figura 3.3. Esquema de columna de fraccionamiento semicontinuo.

Tanto los equipos como su operación y tratamiento matemático son semejantes a los de la destilación *batch* [13]. La operación en modo semicontinuo generalmente es menos ventajosa que la continua, pero su uso puede ser preferible en algunos casos, por ejemplo: *i)* cuando la capacidad es demasiado pequeña para permitir una operación continua a una velocidad práctica; *ii)* si se requiere procesar con una única columna distintos productos o alimentaciones con composición variable; *iii)* si las operaciones del proceso aguas arriba también son *batch*; *iv)* si la alimentación contiene materiales viscosos o sólidos (como alquitranes o resinas), que pueden obstruir una columna continua [14].

Por tratarse de un proceso que opera a alta presión, se requieren etapas adicionales para reducir la presión de los productos al valor atmosférico, separar los solutos extraídos y recuperar el fluido supercrítico para su reutilización. Esta operación se lleva a cabo en uno o más recipientes separadores y puede lograrse de distintas maneras:

(a) mediante reducción de la presión
(b) mediante incremento de la temperatura
(c) mediante modificación simultánea de la presión y la temperatura
(d) por adsorción sobre un lecho particulado o poroso
(e) por absorción en un solvente líquido
(f) por adición de un anti-solvente
(g) mediante el uso de membranas

En los tres primeros casos, se busca una reducción drástica de la solubilidad de los productos extraídos en la fase supercrítica, que se separa en dos nuevas fases: una fase líquida (o a veces sólida) constituida básicamente por los solutos condensados, y una fase gaseosa constituida casi totalmente por el fluido supercrítico. El caso (a) implica la despresurización total o parcial de la fase. Se obtiene el producto prácticamente libre de solvente supercrítico, pero éste debe recomprimirse nuevamente al valor de operación con los costos que ello implica. En el caso (b) el fluido no pierde presión, pero debe ser enfriado nuevamente antes de ser recirculado al proceso. El producto debe ser despresurizado al final del proceso. Debe tenerse en cuenta que a veces el incremento de temperatura puede ocasionar un aumento de solubilidad, como se mencionó al describir el fenómeno de *crossover*. El caso (c) combina una reducción parcial de presión con una variación de temperatura suficiente para lograr la separación del fluido. Desde el punto de vista energético, la recuperación de los solutos sin pérdida de presión es lo más

conveniente [12]. En la Figura 3.4 puede verse un esquema de los casos (a) y (b) para la recuperación de solvente y extracto en el tope de una columna de fraccionamiento supercrítico.

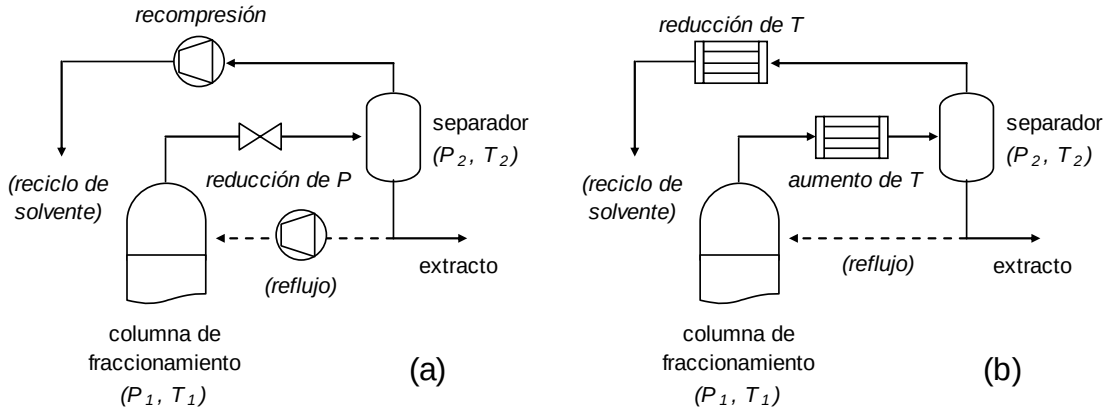


Figura 3.4. Distintas estategias para la separación de los productos y el fluido supercrítico en un proceso de fraccionamiento. (a) Reducción de presión. (b) Aumento de temperatura.

En cuanto a la separación por *adsorción* sobre un lecho poroso, la principal limitación es que luego se requiere una etapa adicional de desorción, generalmente utilizando otro solvente que luego debe ser evaporado, además de la pérdida progresiva de capacidad del lecho por saturación, aspecto poco práctico para procesos continuos. La *absorción* en un solvente líquido presenta limitaciones similares.

El uso de *membranas semipermeables* ha sido propuesto e investigado por varios autores como una alternativa a la separación por modificación de la densidad del fluido supercrítico, demostrando que el requerimiento de energía para la regeneración de CO_2 se reduce notablemente (a menos del 50%) con respecto al ciclo de compresión [15].

3.1.3. Tipos de columnas de fraccionamiento

Las columnas de fraccionamiento de mezclas líquidas con fluidos supercríticos deben procurar un contacto íntimo de las fases en toda su longitud, de modo de incrementar la transferencia de masa y energía necesaria para una separación eficiente. En general, se aplica el mismo tipo de columnas de contacto gas–líquido utilizadas en los procesos de

destilación o absorción, adaptadas para operar en condiciones de alta presión. Estas columnas pueden clasificarse en cuatro grupos principales [16]:

(1) columnas sin elementos internos
(2) columnas de platos
(3) columnas rellenas
(4) columnas con suministro de energía

En la Figura 3.5 puede verse un esquema de estos tipos de columna, con indicación de los puntos de alimentación y sentido de flujo de las fases.

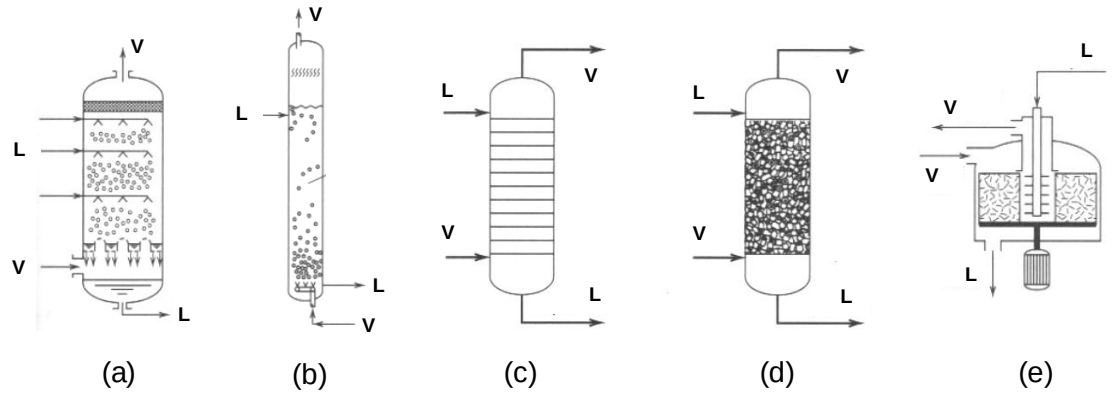


Figura 3.5. Columnas de fraccionamiento. L: fase líquida, V: fase vapor o supercrítica. (a) Columna de spray, (b) columna de burbujeo, (c) columna de platos, (d) columna rellena, (e) equipo de contacto centrífugo

En el caso de las columnas *sin elementos internos*, una de las fases ocupa de modo continuo toda la columna y la otra fase se dispersa en ella, fluyendo en contracorriente. Si la fase continua es la supercrítica, la fase líquida es dispersada en forma de pequeñas gotas, que se descienden desde el tope hacia el fondo (spray). Si la fase continua es la líquida, el fluido supercrítico es dispersado en ella en forma de burbujas que ingresan por el fondo y ascienden por la columna. La columna debe estar provista en sus extremos de dispositivos dispersores que permitan la generación de burbujas o gotas de tamaño pequeño y uniforme, para incrementar el área específica de transferencia de masa y evitar su coalescencia en la columna.

Las *columnas de platos* contienen internamente una serie de pisos o platos en los que las fases se mezclan intensamente y luego se separan, pasando el líquido al plato inferior y el vapor al plato superior. El diseño del plato tiene gran influencia en la eficiencia de la

transferencia de masa, y por lo tanto de la separación. Entre la gran variedad de diseños desarrollados para columnas de destilación y absorción, el caso más simple y efectivo para el fraccionamiento supercrítico es el plato perforado, semejante a un tamiz, que al ser atravesado por la fase supercrítica permite una muy buena distribución en la fase líquida descendente.

Las *columnas rellenas* están llenas total o parcialmente de piezas de relleno, que pueden ser estructurados o disponerse en la columna de manera aleatoria. La fase líquida moja la superficie de estos elementos, formando una delgada película, por sobre la cual fluye la fase continua supercrítica. De este modo, se obtiene una gran área de contacto para la transferencia de masa. Se ha desarrollado una gran variedad de rellenos, con distintos diseños y materiales (metálicos, plásticos, cerámicos, de vidrio, etc.). Algunos ejemplos de rellenos comunes se muestran en la Figura 3.6.

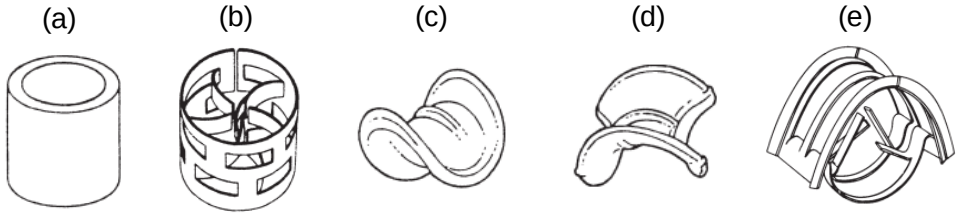


Figura 3.6..Rellenos típicos. (a) Anillo Raschig, (b) anillo Pall,
(c) ensilladura Berl, (d) ensilladura Intalox, (e) elemento metálico de empaque Intalox.

En las columnas de tipo (4), el contacto entre las fases es incrementado mediante el suministro de energía mecánica, por rotación o pulsación. En el primer caso, las columnas están divididas en zonas de *mezclado*, en donde las fases son mezcladas intensamente mediante agitadores axiales, y zonas de *separación*, en donde las fases coalescen y se separan antes de entrar en la siguiente zona de mezclado. En el segundo caso, las columnas (de platos o rellenas) son sometidas a vibración o movimientos oscilatorios, de tal modo que las fases se distribuyen finamente.

Las columnas más utilizadas son las rellenas y las de platos. La elección entre ambas no es simple, pero en muchos casos el uso de un relleno en lugar de platos permite lograr algunos objetivos, tales como:

- incrementar la capacidad de la columna,
- mejorar la pureza o el rendimiento de los productos, al proporcionar un número mayor de etapas teóricas,
- ahorrar energía, permitiendo reducir la relación de reflujo,
- reducir el tiempo de residencia de sustancias que se degradan o polimerizan,
- incrementar la recuperación de producto en rectificaciones *batch*, como resutado del menor *hold-up* de líquido,
- reducir la caída de presión a lo largo de la columna.

Para una descripción más detallada de los aspectos constructivos y operativos de las columnas de alta presión se recomienda la consulta del libro sobre tecnologías de alta presión editado por Bertucco y Vetter [17].

3.1.4. Fraccionamiento de mezclas naturales. Aspectos operativos.

El fraccionamiento de mezclas naturales con fluidos supercríticos tiene algunas características que deben tenerse en cuenta a la hora del diseño y la operación [11][12]:

- El comportamiento del sistema es altamente dependiente de las condiciones de presión y temperatura. Tanto la capacidad extractiva del solvente supercrítico como la selectividad se verán fuertemente afectadas por las condiciones de operación.
- Por lo general, la concentración de solutos en la fase supercrítica es baja. En el caso de los terpenos, la solubilidad suele variar en el rango de 10^{-3} a 10^{-2} (fracción molar), dependiendo de las condiciones de operación. Por este motivo los caudales de solvente supercrítico requeridos suelen ser altos en relación con el caudal de alimentación.
- La disolución de fluido supercrítico en la fase líquida puede ser significativa (como se vio en el Capítulo 2, puede llegar al 30% en peso en el caso de mezclas de CO_2 y aceites esenciales).
- Como consecuencia de los tres aspectos anteriores, una optimización de las condiciones de operación que minimice en lo posible el consumo de solvente maximizando la selectividad se vuelve fundamental para la economía del proceso.

- Las densidades de las fases pueden llegar a ser muy parecidas si se opera cerca del punto crítico de la mezcla. Esto, además de ir en detrimento de la selectividad, dificulta la separación física de las fases.
- Al trabajar con caudales altos, puede ocurrir arrastre (*"entrainment"*) de gotas de la fase líquida en la fase supercrítica, con pérdidas de producto y efectos de retromezclado. Para asegurar una buena separación de las fases es útil colocar demisters, mallas metálicas, deflectores o filtros en la salida de la columna o de los separadores, así como ciclones luego de la etapa de descompresión.
- Pueden existir compuestos termolábiles que imponen un límite superior a la temperatura de operación.

3.1.5. Capacidad, selectividad, recuperación

La eficiencia del proceso de separación –es decir, la capacidad de realizar una separación dada utilizando la menor cantidad posible de solvente supercrítico– puede evaluarse a través de tres parámetros fundamentales: la capacidad, la selectividad y la recuperación.

La ***capacidad*** del solvente es la máxima cantidad de solutos disueltos que puede poseer en una condición dada, expresada normalmente como fracción molar o fracción en peso. Cuando se opera en condiciones de equilibrio, dicha cantidad corresponde a la *solubilidad*. Como se ha mencionado anteriormente, depende tanto de la densidad del solvente como de la presión de vapor de los solutos, y por lo tanto es altamente dependiente de las condiciones de presión y temperatura. Este parámetro es esencial para el cálculo de la cantidad de solvente necesario para el procesamiento de una cantidad dada de alimentación. Puesto que la economía del proceso exige minimizar el consumo de solvente, deben buscarse condiciones de operación de alta capacidad compatibles con el grado de separación deseado.

La ***selectividad***, por otra parte, es la medida del grado de separación lograda por el proceso. Para una separación de una sola etapa ("flash"), se define el *coeficiente de distribución* o *factor-K* de un componente *"i"* (K_i) como la relación entre su concentración en la fase vapor (y_i) y su concentración en la fase líquida (x_i).

$$K_i = \frac{y_i}{x_i}$$

Este coeficiente es una medida de la volatilidad del componente, es decir, su tendencia a pasar a la fase vapor o supercrítica. Valores de K_i mayores a 1 indican que el componente se enriquecerá en la fase vapor, mientras que valores menores a 1 indican que tenderá a permanecer en la fase líquida. El cociente entre los coeficientes de distribución de dos componentes de la mezcla se conoce como *volatilidad relativa* (α_{ij}), y se utiliza comúnmente como indicador de la selectividad:

$$\alpha_{ij} = \frac{K_i}{K_j} = \frac{y_i x_j}{y_j x_i}$$

En estas ecuaciones, *x* e *y* son las composiciones de las fases en equilibrio.

Para que la separación sea posible, α_{ij} debe ser distinto de 1. Mientras mayor sea su valor, más definida será la separación de los componentes entre ambas fases.

Cuando se trata de cascadas o columnas de múltiples etapas, puede definirse una *selectividad global* o *factor de separación* (β_{ij}) del proceso en función de las composiciones de las fases salientes (x^E: extracto, x^R: refinado), que no están en equilibrio entre sí.

$$\beta_{ij} = \frac{x_i^E x_j^R}{x_j^E x_i^R}$$

Estas expresiones de la selectividad pueden también calcularse *en base libre de solvente*. Las concentraciones de los solutos en base libre de solvente se expresarán como X_i e Y_i.

En el caso de sistemas multicomponente –que es lo más frecuente al trabajar con mezclas naturales– se acostumbra definir dos *componentes clave* cuya separación quiere lograrse, tratándose así al sistema como un pseudo-binario, y definiéndose una selectividad entre dichos componentes clave. Se supone que los componentes más volátiles y los más pesados que los componentes clave respectivos se separarán en mayor grado aún que éstos.

En esta tesis se utilizan preferentemente estas definiciones de selectividad. Sin embargo, pueden encontrarse en la literatura otras maneras de cuantificar la eficiencia de una separación, tales como el *factor de concentración*, definido como la relación entre la

concentración de un componente *"i"* en alguna de las fases (x_i) y su concentración en la alimentación (x_i^o):

$$C_i = \frac{x_i}{x_i^o}$$

También se utiliza para procesos de fraccionamiento semicontinuo, en donde la composición de las fases varía con el tiempo. En tal caso, x_i es la concentración de *"i"* en alguna de las fases en un momento dado y x_i^o es la concentración al inicio del proceso (t=0). La relación entre los factores de concentración de dos componentes también puede servir como indicador de la selectividad:

$$R_{ij} = \frac{C_i}{C_j} = \frac{x_i x_j^o}{x_j x_i^o}$$

La selectividad o el factor de separación de un proceso dependen no solamente de las condiciones termodinámicas que determinan el comportamiento de fases, sino también de aspectos operativos y de diseño de la columna (dimensiones, número de etapas teóricas, relación de reflujo, relación solvente/alimentación, etc.).

Finalmente, la ***recuperación*** (Φ_i) se define como la cantidad del componente *"i"* presente en una fase dada (m_i) con respecto a la cantidad presente en la alimentación (m_i^o):

$$\Phi_i = \frac{m_i}{m_i^o}$$

Puede expresarse en base másica o molar. Una separación óptima debe procurar maximizar las recuperaciones, sobre todo cuando los componentes a separar tienen un valor elevado.

3.1.6. Fraccionamiento de sistemas terpénicos. Antecedentes.

Diversos autores han realizado investigaciones sobre el fraccionamiento de aceites esenciales o sistemas terpénicos modelo, con el objetivo de concentrar o purificar los componentes más valiosos y remover los componentes indeseables. Diversos

procedimientos se han estudiado, tales como la clásica destilación al vacío [18] y la extracción líquida con etanol u otros solventes [19][20][21]. Sin embargo, las ventajas del fraccionamiento mediante el uso de fluidos supercríticos han determinado que dicho proceso se convierta en una alternativa atractiva con potencial industrial.

i) Desterpenado de aceites cítricos:

El caso clásico y más estudiado es el ***desterpenado de aceites cítricos***, obtenidos por el prensado en frío de naranja, limón, mandarina, bergamota y otros. Estos aceites suelen tener una muy baja proporción de monoterpenos oxigenados (OT), tales como citral, linalool y decanal, que son los responsables del aroma característico. La remoción de buena parte de los monoterpenos hidrocarbonados (MT), que suelen ser inestables y que no contribuyen al aroma característico, permite obtener productos concentrados enriquecidos en OT, de mayor valor y calidad sensorial.

Gerard [22] y Temelli y col. [23][24] propusieron y estudiaron el desterpenado de aceites cítricos con CO_2 supercrítico durante la década de 1980, basándose en la diferente volatilidad de MT y OT. Estos autores discutieron acerca de las mejores condiciones de operación, en base a resultados experimentales y predicciones sobre el comportamiento de la solubilidad. Desde entonces, dos grandes estrategias han sido exploradas con el objetivo de incrementar la selectividad de la separación, aspecto clave debido a la baja concentración de compuestos oxigenados en estos aceites.

Una de ellas consiste en adsorber el aceite en un lecho particulado (en la mayoría de los casos sílica gel) y luego hacer pasar a través del lecho una corriente de solvente supercrítico (generalmente CO_2). El solvente desorbe selectivamente los MT a baja presión (cercana a la crítica), mientras que los OT son retenidos por el lecho. Una vez removidos los MT, se modifica la densidad de la corriente de CO_2 a través de la presión y/o la temperatura para extraer los OT y componentes superiores. Las investigaciones en este campo se centran en la búsqueda de las mejores condiciones de operación para lograr la desorción selectiva de las distintas fracciones. Utilizando esta metodología, Barth y col. [25] estudiaron la desorción selectiva de aceite de limón por incremento gradual de la presión del CO_2 a temperatura constante (313 K), obteniendo una fracción pura de OT, a la vez libre de MT (removidos a presión y densidad más baja) y de cumarinas y psoralenos (retenidos en la columna). El proceso de desorción fue modelado mediante la sencilla ecuación de Tan y Liu [26], logrando un muy buen ajuste de los datos

experimentales. Posteriormente, Chouchi y col. [27] obtuvieron resultados similares con aceite de bergamota, y Shen y col. [28] con aceite de naranja. También se estudió el equilibrio de adsorción-desorción de terpenos puros o mezclas [29] y su modelado matemático [30]. Reverchon [31] aplicó esta metodología para separar una mezcla de limoneno y linalool en dos etapas, extrayendo primero el limoneno a 75 bar y luego el linalool a 200 bar, e investigando el efecto de distintas variables en la selectividad (caudal de CO_2, relación de carga, temperatura). La Figura 3.7 muestra un ejemplo del tipo de resultados obtenidos por este autor.

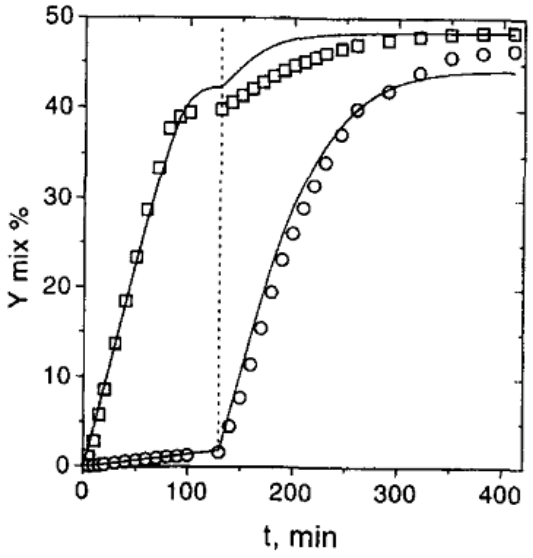


Figura 3.7.
Curvas de desorción de una mezcla de limoneno y linalool (50%) a 313 K, caudal de 0.8 kgCO_2/h y relación de carga de 0.1 kg/kg. Primera etapa a 75 bar, segunda etapa a 200 bar (separadas por línea de puntos). (□) limoneno, (○) linalool, (—) modelo propuesto. Adaptado de [31].

Las principales limitaciones de este enfoque se relacionan con su naturaleza necesariamente discontinua y con la recuperación de la fracción polar, que generalmente es la que interesa. De hecho, si la interacción con la matriz porosa es fuerte, las presiones requeridas para la desorción pueden ser elevadas. Por otra parte, si se opta por recuperar los OT mediante lavado del lecho con etanol u otro solvente, va a ser necesaria una etapa adicional para evaporar dicho solvente.

La otra estrategia, que ha sido más ampliamente investigada y ha dado lugar a una abundante literatura, se basa en el uso de columnas de mútiples etapas en contra-corriente, en sus distintas variantes: continuas y semicontinuas, con y sin relleno, simples y con reflujo externo, isotérmicas y con gradientes de temperatura.

Sato y col. [32] estudiaron el fraccionamiento de mezclas modelo representativas de aceites cítricos (limoneno-linalool-citral) en un equipo semi-continuo con una sección de extracción y una columna rectificadora rellena de 1 m de altura, analizando el efecto de la

presión, la temperatura y el caudal en el rendimiento global y la selectividad. Estos autores concluyeron que la aplicación de un gradiente térmico a lo largo de la columna, con la parte inferior a 313 K y el tope a 333 K, generaba un reflujo interno que mejoraba la selectividad. En un trabajo posterior, Sato y col. [33] analizaron en forma cuantitativa el efecto del reflujo interno en una columna más larga (2.4 m), modelando y simulando el proceso como una destilación batch. Con esta columna, operada sin reflujo, obtuvieron también datos de equilibrio. El mismo fenómeno fue observado por Kondo y col. [34] en el desterpenado de aceite de limón.

La operación semi-continua también fue estudiada por Benvenuti y col. [35] y por Gironi y Maschietti [36] para el fraccionamiento de aceite de limón. Estos autores monitorearon la evolución del proceso completo en un rango de condiciones (315–333 K y 84–105 bar), analizando las concentraciones y recuperaciones en ambas fases, y modelaron el proceso considerando tres etapas: el equilibramiento, la extracción y la descompresión. Modelaron los datos experimentales con la ecuación de estado de Peng-Robinson (PR-EOS) y simularon un proceso continuo.

Sato y col. [37] utilizaron una columna continua rellena operada en contra-corriente para fraccionar una mezcla modelo de limoneno y linalool y un aceite natural de naranja, observando que la selectividad aumenta con la relación solvente-alimentación. Por otra parte, la selectividad obtenida con el aceite natural era menor que utilizando una mezcla sintética, posiblemente porque las ceras del aceite reducían la eficiencia del empaque. Estos autores propusieron un sistema de fraccionamiento con la alimentación de aceite en una etapa intermedia y un sistema de reflujo externo en el tope, obteniendo la fracción de MT como producto de tope, las ceras y otros compuestos pesados en el fondo y los OT en una corriente lateral intermedia.

Por otra parte, Reverchon y col. [38] y Budich y col. [39] avanzaron en el diseño de columnas para desterpenado, investigando el equilibrio de fases y aspectos hidráulicos, de diseño y de escalado, determinando la altura y número de unidades de transferencia (NTU) y el dimensionamiento de columnas en base a la productividad deseada.

Otros autores, finalmente, han propuesto el uso de diferentes solventes, como por ejemplo etano [40]. La menor presión crítica de este compuesto (48.8 bar versus 73.8 bar para el CO_2, con temperaturas críticas muy cercanas) permitiría operar en condiciones más suaves, con mejor economía de solvente.

Debido al bajo contenido de compuestos oxigenados que poseen estos aceites, y a los elevados caudales de CO_2 requeridos para su fraccionamiento, una conclusión general es

que se precisa una optimización de las condiciones de operación, para maximizar la pureza y recuperación de los productos y minimizar el consumo de solvente. Espinosa y col. [41] y Díaz y col. [42] han reportado estudios de optimización del desterpenado de aceites de limón y naranja, utilizando la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS) como modelo termodinámico.

Por último, podemos mencionar el trabajo de Fang y col. [43], quienes compararon la performance del fraccionamiento supercrítico y de la destilación al vacío en el desterpenado de aceite de bergamota. Estos autores propusieron un esquema combinado de dos etapas para obtener una alta recuperación y pureza de OT: una primera etapa de destilación al vacío (que funcionaba mejor para separar la fracción de MT) seguida de un fraccionamiento supercrítico, más eficiente para separar los compuestos pesados (ceras y psoralenos tóxicos).

En conjunto, estas investigaciones han permitido acumular una importante cantidad de información respecto no sólo del comportamiento termodinámico de este tipo de mezclas (equilibrio de fases, solubilidad, selectividad, propiedades volumétricas, etc.), sino también cuestiones de diseño, operativas, hidrodinámicas, energéticas y económicas, de gran utilidad y aplicables también al fraccionamiento de otras mezclas naturales.

ii) Extracción fraccionada de aceites herbales:

A diferencia de los aceites cítricos, se han reportado muy pocos estudios referidos al fraccionamiento de aceites esenciales de origen ***herbal***. En estos casos, el fraccionamiento suele aparecer acoplado al proceso de extracción a partir del material vegetal [1][44], siguiendo dos estrategias principales:

(a) extracción *sucesiva* de las distintas fracciones de componentes mediante incrementos escalonados de la densidad del solvente supercrítico;
(b) extracción *total* en condiciones de alta densidad, seguida de la separación de las diferentes fracciones de componentes en distintos recipientes mediante cambios escalonados de presión y/o temperatura.

De esta manera, si se seleccionan adecuadamente las condiciones en cada etapa de extracción o en cada separador, es posible separar no solamente las fracciones volátiles de interés, sino también numerosos compuestos de alto peso molecular que son co-extraídos

junto con el aceite esencial, tales como ceras, parafinas, diterpenos, triterpenos, pigmentos, etc., cuya presencia en el producto final a menudo es indeseable. Un esquema del proceso de extracción y fraccionamiento escalonado se muestra en la Figura 3.8.

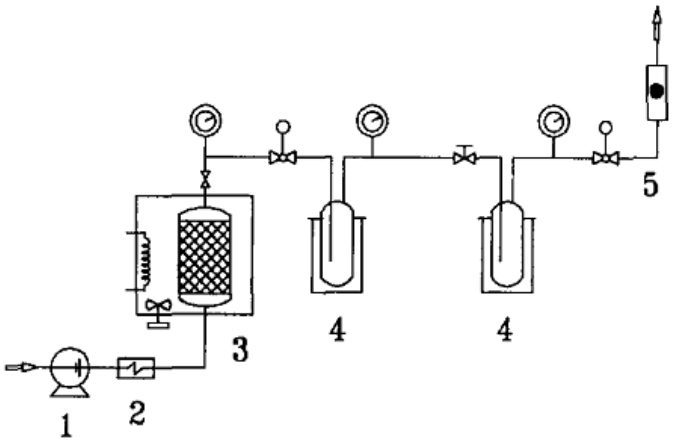


Figura 3.8. Esquema de extracción y fraccionamiento por precipitación escalonada.
1. Bomba o compresor de CO_2, 2. Intercambiador de calor, 3. Columna de extracción,
4. Separadores, 5. Medidor de caudal.

La Figura 3.9 muestra como ejemplo la evolución de la composición del aceite esencial obtenido por extracción de *Salvia officinalis* con CO_2 supercrítico. Si bien el proceso fue realizado a presión y temperatura constantes, los resultados evidencian que las distintas fracciones de componentes son extraídos de manera diferencial, fenómeno que es potenciado cuando se utilizan condiciones variables ajustadas a la selectividad deseada.

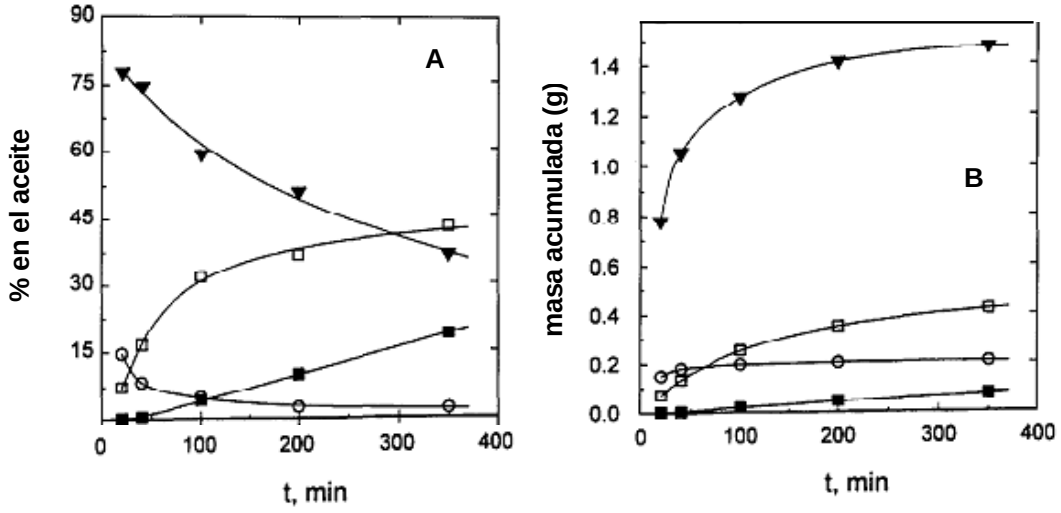


Figura 3.19. Extracción fraccionada de aceite esencial de *Salvia officinalis*.
(A) Evolución de la composición del extracto. (B) Masa acumulada a lo largo del proceso.
(○) MT, (▼) OT, (□) ST, (■) ST oxigenados. Adaptado de [45].

Numerosos autores han aplicado una u otra de estas técnicas de extracción fraccionada a la obtención de extractos volátiles de distintas plantas, apuntando en general a determinar las condiciones óptimas de operación tanto en la columna de extracción como en los sucesivos separadores, así como las cinéticas de extracción de las distintas fracciones y el tiempo óptimo de corte para obtener un producto de determinada composición. Algunos ejemplos se mencionan en la Tabla 3.1. Una recopilación más exhaustiva puede encontrarse en las revisiones citadas [1][44].

Entre los trabajos mencionados, Simandi y col. [47] estudiaron comparativamente las dos estrategias en la extracción y fraccionamiento de aceite esencial y ceras a partir de hojas de orégano (*Origanum vulgare*), utilizando CO_2 supercrítico a 313 K y un rango de presión de 80 a 300 bar. Observaron que el rendimiento de los productos separados era el mismo en ambos casos, pero la extracción total seguida de precipitación escalonada era más efectiva para separar el aceite esencial y las ceras.

García-Risco y col. [53], por su parte, estudiaron simultáneamente la extracción supercrítica de aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) en condiciones de densidad creciente y su posterior fraccionamiento escalonado en dos separadores, con el objetivo de maximizar la separación de timol. Concluyeron que la extracción a 313 K –300 bar y condiciones en el primer separador de 308 K–100 bar permite incrementar la cantidad de timol en el extracto hasta casi el 50%.

Tabla 3.1. Ejemplos de extracción + fraccionamiento de aceites esenciales herbales con CO_2 supercrítico

Autores	***Planta***	***Método***	***Ref.***
Reverchon y col. (1995)	salvia	precipitación escalonada	[45]
Reverchon y col. (1995)	lavanda	precipitación escalonada (3 separadores)	[46]
Simandi y col. (1998)	orégano	ambos	[47]
Simandi y col. (1999)	hinojo	precipitación escalonada (2 separadores)	[48]
Ibáñez y col. (1999)	romero	extracción en 2 etapas	[49]
Daghero y col. (1999)	*T. minuta*	precipitación escalonada (2 separadores)	[50]
Gaspar (2002)	orégano	precipitación escalonada (2 separadores)	[51]
Kotnik y col. (2007)	manzanilla	precipitación escalonada (2 separadores)	[52]
García-Risco y col. (2011)	tomillo	ambos	[53]

La principal ventaja de esta metodología es que permite ajustar la selectividad en un amplio rango, modificando las condiciones de presión y temperatura tanto en la columna de extracción como en los separadores, obteniéndose así extractos y fracciones de composición diversa.

Además, cuando se desea recuperar compuestos de alto peso molecular con algún tipo de actividad biológica, esta técnica permite extraerlos y obtenerlos separadamente de la fracción volátil. Un ejemplo de este último caso es el estudio reportado por Glisic y col. [54] referido a la obtención de diterpenos de actividad antioxidante a partir de *Salvia officinalis*, mediante la extracción y separación de la fracción volátil en condiciones de alta selectividad. La Figura 3.10, por ejemplo, muestra la influencia de la presión de extracción en la selectividad de la fracción de diterpenos con respecto a las otras fracciones extraídas.

No obstante, las principales limitaciones de estos métodos tienen que ver con su naturaleza semicontinua y con los rendimientos de extracción, que generalmente son bajos. De hecho, el rendimiento de extracción de aceites esenciales suele rondar el 1% en peso de material vegetal seco (mientras que el material total extraíble supera generalmente el 10%), lo cual –sumado a la baja densidad que suele tener la materia prima– exige el uso de columnas de gran dimensión y elevados caudales de solvente.

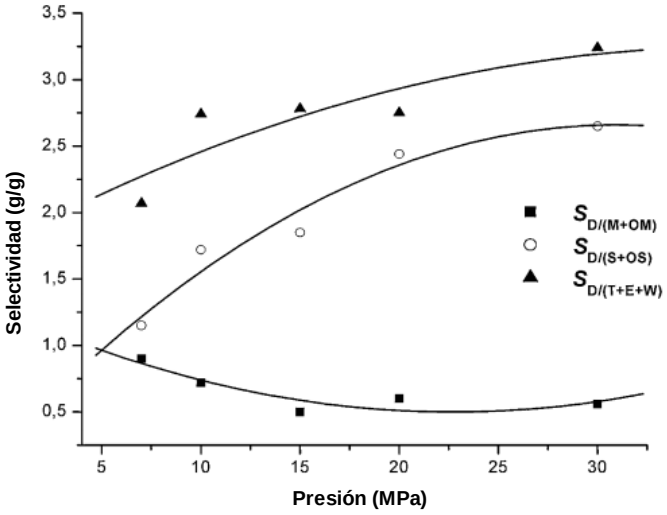


Figura 3.10. Selectividad de la fracción de diterpenos respecto a las otras fracciones en la extracción supercrítica de *S. officinalis*. D: diterpenos, M: monoterpenos hidrocarbonados, OM: monoterpenos oxigenados, S: sesquiterpenos, OS: sesquiterpenos oxigenados, T: triterpenos, E: ésteres, W: ceras. Adaptado de [54].

iii) Fraccionamiento de concretos y oleorresinas:

Frente a esta limitación, el fraccionamiento supercrítico como proceso adicional para la purificación o separación de componentes específicos a partir de un aceite esencial extraído previamente por otros métodos aparece como una alternativa atractiva. Este enfoque combinado –que es el que se utiliza en el caso de los aceites cítricos– ha sido muy poco aplicado en el caso de los aceites de origen herbal.

Un ejemplo es el fraccionamiento de ***concretos***. Como se ha mencionado, un concreto se obtiene por extracción de los componentes volátiles de la planta utilizando un solvente líquido, que luego es evaporado dejando un residuo semi-sólido que contiene la fracción terpénica y una cantidad variable de ceras y sustancias grasas coextraídas. Esta técnica se utiliza cuando se trata de compuestos muy sensibles a la temperatura, generalmente presentes en las flores, y que por lo tanto no pueden ser sometidos a destilación con vapor. Convencionalmente, la fracción volátil se recupera por disolución del concreto en etanol, enfriamiento y filtrado para precipitar las ceras, y concentración por evaporación al vacío del etanol, obteniéndose un producto denominado "absoluto". Sin embargo, este producto aún contiene una cantidad apreciable (hasta un 50%) de ceras y ésteres de ácidos grasos.

Reverchon y col. [55] propusieron la recuperación de la fracción volátil de concretos florales mediante una extracción selectiva con CO_2 supercrítico. En un estudio experimental los autores aplicaron un concreto de jazmín sobre un lecho de partículas de vidrio, a través del cual se hizo pasar una corriente de CO_2 en una secuencia de densidades crecientes (a 80, 85 y 200 bar) a 313 K. Los extractos sucesivos fueron luego fraccionados escalonadamente en dos separadores (273 K–80 bar y 263 K–25 bar), en los que se obtuvo la fracción volátil, ceras y alcoholes de cadena larga. Con distintas variantes, este procedimiento fue aplicado a concretos de rosa [56] y flor de naranjo [57]. La Figura 3.11 muestra resultados típicos obtenidos en el fraccionamiento de concreto de rosa, en los que se observa la composición del extracto obtenido en distintos momentos del proceso. Los autores también modelaron el proceso, asumiendo un esquema de resistencias variables a la transferencia de masa en el fluido y en la película de concreto y calculando perfiles de concentración [58].

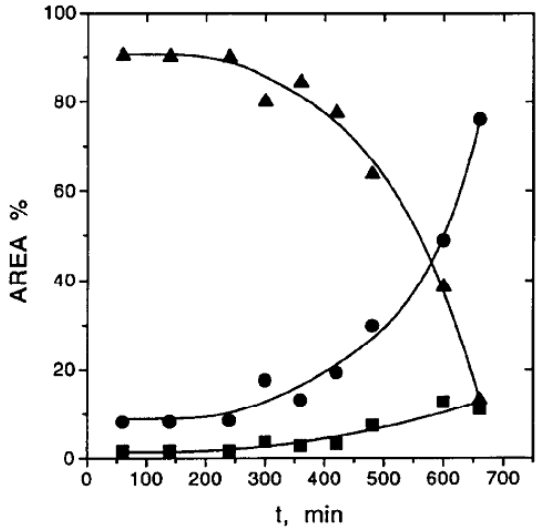


Figura 3.11.
Composición del extracto obtenido en el fraccionamiento de un concreto de rosa con CO_2 supercrítico a T=313 K y P=80 bar. (▲) fracción volátil, (●) ceras, (■) alcoholes de cadena larga. Adaptado de [56].

Un estudio semejante ha sido reportado más recientemente por Glisic y col. [59]. Estos autores realizaron una extracción de hojas de *Salvia officinalis* utilizando una mezcla de agua y etanol como solvente y asistida por ultrasonido. Luego de filtrar y evaporar el solvente, obtuvieron un extracto u *oleorresina* que contenía tanto compuestos volátiles como otros más pesados (diterpenos, ceras, ácidos grasos, ésteres, etc.). Luego depositaron este extracto semi-sólido sobre perlas de vidrio y lo fraccionaron con CO_2 supercrítico. Si bien su interés se enfocaba en la obtención selectiva de diterpenos, el procedimiento constituye un buen ejemplo de combinación de técnicas, en donde la extracción supercrítica es utilizada como una etapa de post-procesamiento para purificar un producto.

iv) Fraccionamiento de aceites obtenidos por destilación:

El fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales ***obtenidos por destilación de arrastre con vapor,*** con el objetivo de modificar su perfil de composición, ha sido aplicado por algunos pocos autores. La destilación de arrastre con vapor tiene la ventaja de producir extractos volátiles minimizando la co-extracción de ceras y otros componentes de alto peso molecular, por lo que el fraccionamiento de estos aceites se ha enfocado a la purificación de fracciones o componentes específicos.

Köse y col. [60] estudiaron experimentalmente el fraccionamiento de aceite de orégano en dos fracciones: MT y no-MT (categoría que incluía compuestos oxigenados, sesquiterpenos y fenólicos), en una columna de 1.5 m de altura, sin relleno, operando en

modo semi-continuo. Ensayaron diferentes presiones y temperaturas en la zona de extracción y en la columna, analizando el estado de fases en ambas secciones, e investigaron el efecto de estas y otras variables (tiempo de extracción, caudal de CO_2, uso de relleno) en la selectividad del fraccionamiento. Observaron que la mejor separación se obtenía operando a una presión de 70 bar y temperaturas de 311 K en la zona de extracción y 328 K en la parte superior de la columna. En estas condiciones el sistema se encuentra en estado bifásico en ambas zonas, pero posee una densidad mayor en la sección inferior (que favorece la solubilidad) y una densidad menor en la sección superior (que favorece la selectividad por generación de un reflujo interno). La Figura 3.12 muestra los resultados de selectividad en estas condiciones, expresada en términos del factor de concentración de cada fracción.

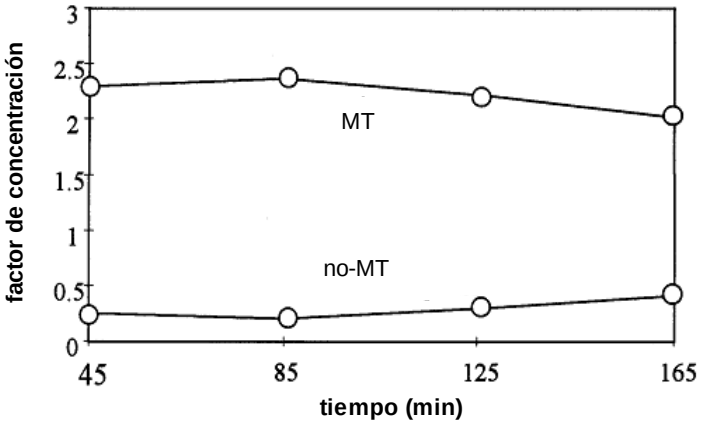


Figura 3.12. Fraccionamiento de aceite de orégano con CO_2 a 70 bar y 311 K (zona de extracción) y 328 K (columna), en términos del factor de concentración. Adaptado de [60].

La utilización de un relleno (ya sea en toda la longitud de la columna o sólo en la mitad) no modificó los resultados. El incremento de caudal de CO_2 afectó negativamente la selectividad por encima de cierto valor, probablemente debido a la mayor dificultad en el control de la temperatura de la parte superior de la columna.

Varona y col. [61], por otra parte, estudiaron el fraccionamiento de aceite de lavanda (*Lavandula hybrida*) con CO_2 supercrítico en una columna continua a contra-corriente simple, de 2 m de altura efectiva y rellena con anillos metálicos. En este caso, el fraccionamiento se orientó a la separación de dos componentes clave de volatilidad muy cercana: linalool y linalil acetato. Los resultados indicaron que la presión influía negativamente en el factor de separación de estos dos componentes, a la vez que mejoraba el rendimiento. Por otra parte, el aumento de la temperatura y del caudal de CO_2 permitía obtener una mejor selectividad, como se observa en la Figura 3.13.

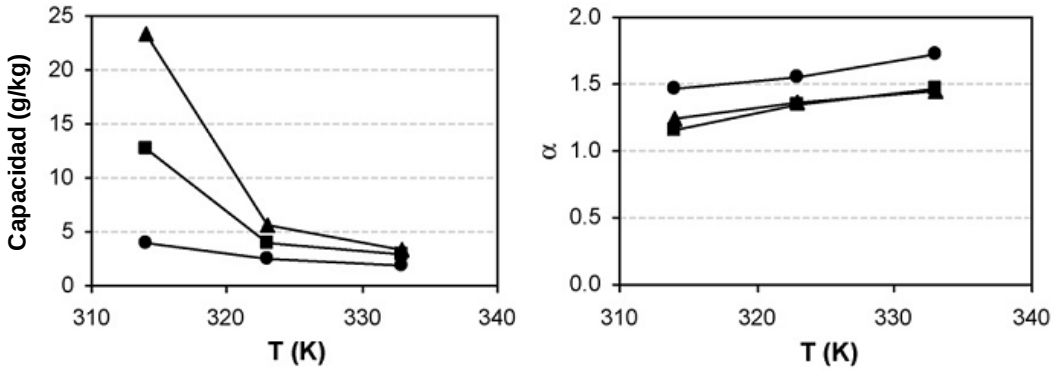


Figura 3.13. Influencia de los parámetros de operación en el fraccionamiento de aceite de lavanda con CO_2 a P=7.5 MPa. Relación solvente/alimentación: (●) 141 kg/kg, (■) 68 kg/kg, (▲) 38 kg/kg. Adaptado de [61].

Los resultados experimentales permitieron a los autores validar un modelo matemático de fraccionamiento continuo en contra-corriente [62], con el cual simularon algunos experimentos que no podían realizar experimentalmente, particularmente la operación con una columna de mayor altura y con reflujo externo. Aún así, debido a los bajos valores de selectividad, la composición del reflujo era muy similar a la de la alimentación, con lo cual la sección de enriquecimiento no contribuía a mejorar la selectividad del proceso, actuando simplemente como una extensión de la sección de stripping. En base a ello, los autores propusieron un procedimiento alternativo para generar el reflujo, tal como se muestra en la Figura 3.14. En un primer separador (S1) se produce una condensación parcial de la corriente de tope (a 1 bar y 353 K) para generar el reflujo, y en un segundo separador (S2) se produce la condensación total (a 1 bar y 273 K) para obtener el extracto y regenerar el CO_2, que se recircula al proceso.

Con este esquema de fraccionamiento obtuvieron un extracto de linalool prácticamente puro (94%), con un 40% de recuperación, a la vez que un refinado con 56% de linalil acetato pero con 95% de recuperación, valores correspondientes a un factor global de separación de 21.

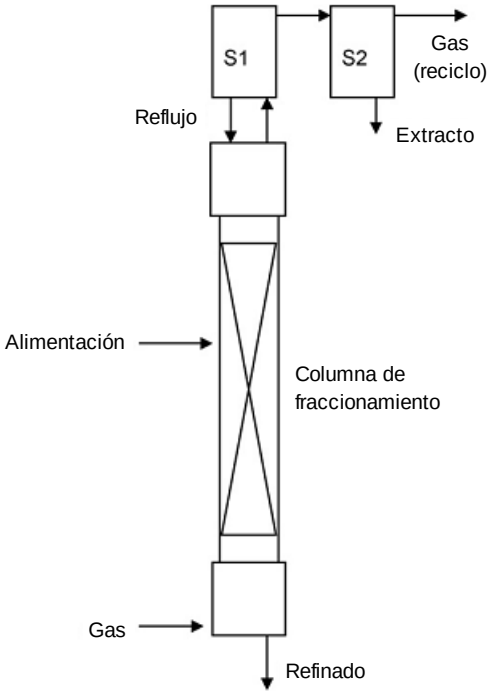


Figura 3.14. Esquema de fraccionamiento con reflujo propuesto por Varona y col. [61].
S1: primer separador para generación de reflujo; S2: segundo separador para generación de extracto.

3.1.7. Conclusiones

La revisión de estos trabajos permite extraer algunas conclusiones generales. Por una parte, demuestran que el fraccionamiento utilizando CO_2 supercrítico –en las distintas configuraciones estudiadas– es una técnica válida para la separación de mezclas (naturales o sintéticas) de terpenos y compuestos derivados, que permite obtener resultados comparables a los procesos tradicionales, como destilación al vacío o extracción líquida, superando a la vez algunas de sus limitaciones. Si bien hasta el momento esta aplicación ha sido estudiada a escala de laboratorio y de planta piloto, su escalado a nivel industrial no presenta complejidades adicionales desde el punto de vista técnico, por cuanto existen ya procesos industriales que aplican la extracción supercrítica. La principal limitante por el momento continúa siendo el alto costo asociado a la operación a alta presión, que sólo puede ser absorbido por el procesamiento de productos de alto valor agregado.

Por otra parte, la volatilidad de los compuestos terpénicos –muy solubles en solventes supercríticos apolares, tales como el CO_2–, sumado a su inestabilidad térmica, limita el

rango de condiciones de operación del proceso (es decir, la región bifásica) a una región relativamente cercana al punto crítico del solvente. En el caso del fraccionamiento con CO_2, vemos que las condiciones experimentales reportadas como eficientes para la separación varían en un rango de presión entre 70 y 150 bar y un rango de temperatura entre 303 y 343 K. Además, como se ha mencionado en el Capítulo 2, en este rango de condiciones las propiedades del CO_2 son muy variables, por lo que es esperable que las propiedades termodinámicas, hidrodinámicas y de transferencia de masa y calor en la columna de fraccionamiento sean también muy variables y fuertemente dependientes de tales condiciones.

3.2. Fraccionamiento supercrítico y equilibrio entre fases

3.2.1. Ingeniería del equilibrio de fases

Los conceptos previamente revisados muestran que el conocimiento del comportamiento de fases del sistema en un rango amplio de condiciones es esencial para el adecuado diseño del proceso y la optimización de las condiciones de operación. En el caso del fraccionamiento con fluidos supercríticos, en que el estado de fases del sistema es modificado en las distintas etapas del proceso al ser sometido a cambios de presión, temperatura y composición, este conocimiento es fundamental.

Esta conclusión, que es generalmente válida para cualquier proceso de separación o reacción, ha dado origen a un marco conceptual conocido como ***"Ingeniería del Equilibrio entre Fases"*** (en inglés: *Phase Equilibrium Engineering*), expresión propuesta por primera vez por Pereda y col [63]. La premisa básica de este campo de estudio es expresada claramente en el siguiente párrafo:

> *"El diseño del escenario de fases que satisface las necesidades de un proceso es lo que denominamos un problema de ingeniería del equilibrio entre fases. Esta disciplina combina los métodos de la termodinámica del equilibrio entre fases con los requerimientos del proceso para obtener el escenario de fases y las propiedades termodinámicas deseadas".* [64]

Por lo tanto, de lo que se trata es de encontrar (o diseñar) el escenario de fases más adecuado para un determinado proceso o problema. Este enfoque propone una metodología sistemática para el análisis y selección de condiciones de operación, y ha sido aplicado a una gran variedad de procesos. En esta búsqueda se utilizan numerosas herramientas, desde mediciones experimentales hasta modelos termodinámicos de carácter predictivo, que permitan describir con confianza el comportamiento de las fases y sus propiedades en escenarios desconocidos a partir de datos conocidos.

A veces, como en el caso de reacciones gas-líquido, es deseable operar en condiciones de homogeneidad (una única fase fluida), para eliminar resistencias a la transferencia de masa. En otros casos, como el fraccionamiento supercrítico, es necesario operar en condiciones heterogéneas (bifásicas) para poder lograr una separación efectiva. Conocer en qué rango de condiciones de presión, temperatura y composición el sistema es homogéneo o heterogéneo y cuáles son las condiciones de cambio de fase es fundamental para un correcto diseño.

En el caso del fraccionamiento de mezclas terpénicas, por ejemplo, varios autores han demostrado experimentalmente la influencia que tiene el estado de fases del sistema en las distintas partes de la columna en la performance del proceso. En particular, el uso de gradientes térmicos puede llevar a que una parte de la columna opere en condiciones bifásicas y otra en condiciones monofásicas, en detrimento de la selectividad global del proceso, como señalaron Köse y col. en el trabajo previamente citado sobre fraccionamiento de aceite esencial de orégano [60].

3.2.2. Diagramas de fases

Los **diagramas de fases** son los "mapas" utilizados en este campo. Los más comúnmente utilizados son los diagramas *presión-composición* (*P-x,y* a temperatura fija), *temperatura-composición* (*T-x,y* a presión fija) y las *envolventes de fase* (proyecciones presión-temperatura). Todos ellos pueden entenderse como cortes o proyecciones del *diagrama global de equilibrio de fases* del sistema, un espacio multi-dimensional que relaciona la presión, la temperatura y la composición de todas las fases presentes para un sistema dado de *"n"* componentes.

La Figura 3.15 muestra algunos ejemplos de diagramas de fases para sistemas binarios, indicando el significado de las distintas regiones y líneas. Si bien el fraccionamiento supercrítico trata con mezclas constituidas por al menos tres componentes, algunas representaciones binarias son útiles cuando se analiza el comportamiento de los solutos en base libre de solvente.

La Figura (a) muestra un diagrama *P-x,y* (a *T* constante) para un sistema *binario* en el que ambos componentes se encuentran por debajo de su temperatura crítica. En la región comprendida entre las curvas coexisten dos fases (líquido y vapor), cuyas composiciones están relacionadas por líneas de unión horizontales (x_i, y_i). Por encima de ambas curvas sólo existe una fase líquida y por debajo sólo una fase vapor. La línea superior se denomina *"curva de puntos de burbuja"* y representa la condición de aparición de la primera burbuja de vapor a esa temperatura. La línea inferior se denomina *"curva de puntos de rocío"* y representa la condición de aparición de la primera gota de líquido.

La Figura (b) muestra un diagrama similar en el cual uno de los componentes se encuentra a temperatura supercrítica. Las curvas de puntos de burbuja y rocío no confluyen en la presión de vapor del componente supercrítico puro, sino que se unen en un máximo denominado *punto crítico de la mezcla*. Este punto representa la máxima presión a la cual puede existir separación de fases. Por encima de dicha presión, el sistema es homogéneo a dicha temperatura para cualquier composición.

Los diagramas *T-x,y* (a *P* constante) son cualitativamente similares, excepto que las regiones de líquido, vapor y las curvas de puntos de burbuja y rocío se encuentran invertidas, como puede verse en la Figura (c).

La Figura (d) muestra un diagrama *T-x,y* en donde existe equilibrio líquido-vapor y líquido-líquido-vapor. El equilibrio trifásico sólo existe para una condición de presión y temperatura.

La Figura (e) muestra un diagrama de equilibrio *x-y*, en donde la línea curva representa la relación entre las composiciones de dos fases en equilibrio a temperatura y presión dadas. Es un tipo de diagrama útil en procesos en los que la composición de las fases varía, ya sea a lo largo de una columna de fraccionamiento, o con el tiempo (en el caso de un proceso semicontinuo).

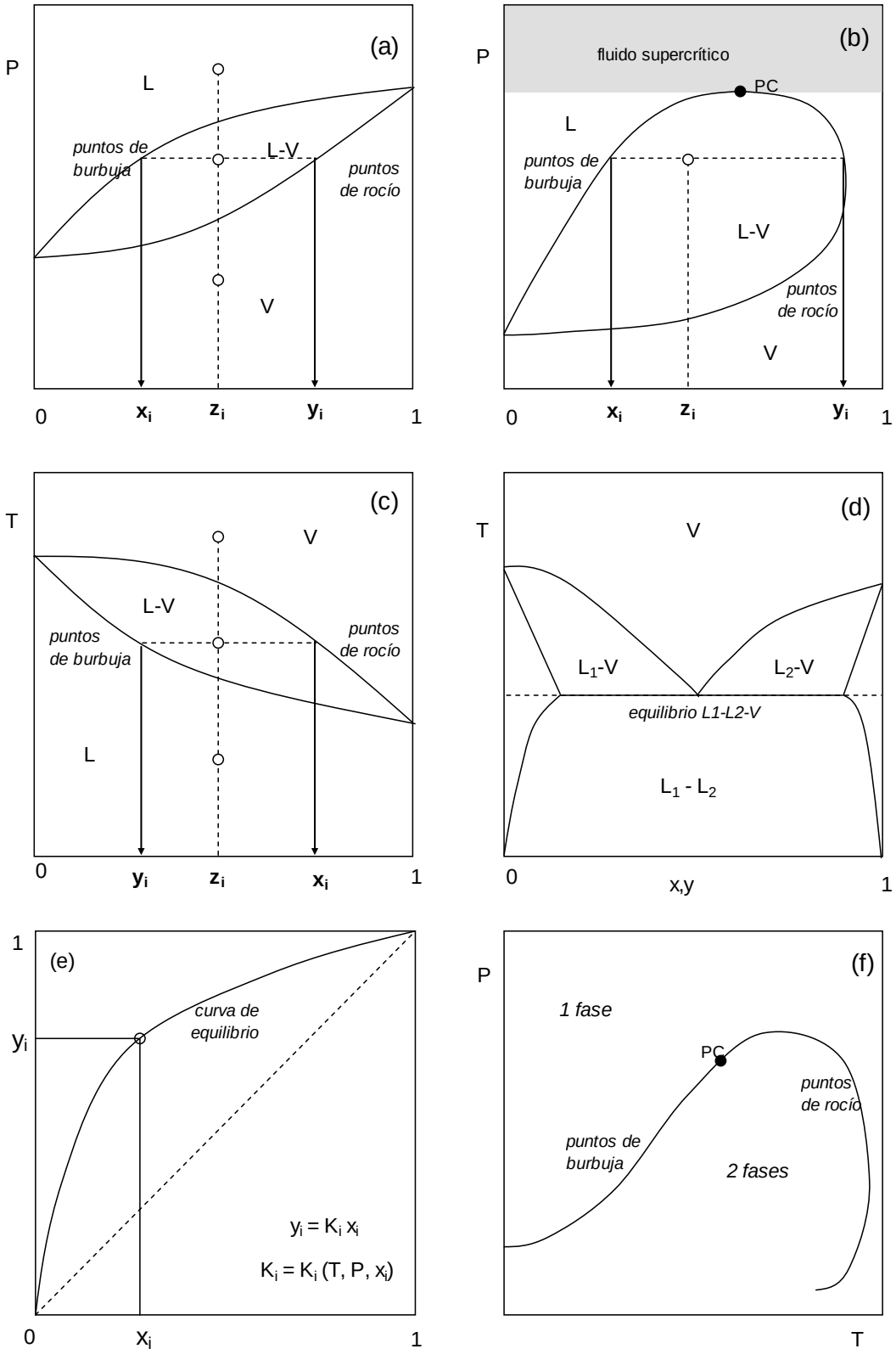


Figura 3.15. Ejemplos de diagramas de fases. L=líquido, V=vapor, PC=punto crítico.

La Figura (f) muestra una *envolvente de fases,* es decir, un diagrama presión-temperatura para una composición global fija. Este diagrama es válido tanto para sistemas binarios

como multicomponente, y muestra las condiciones de transición de fases y el punto crítico de la mezcla. En la región por debajo de la curva el sistema se encuentra en estado heterogéneo. Por encima de la presión máxima de la envolvente, el sistema será homogéneo a cualquier temperatura.

En el caso de sistemas **ternarios**, la Figura 3.16 muestra dos diagramas de fases alternativos (para una condición fija de *P* y *T*). En el diagrama (a) es posible leer la composición de los tres componentes, mientras que en el diagrama (b) sólo se muestra la composición de dos de ellos y la del tercero se deduce por diferencia. En ambas representaciones, por debajo de la curva acampanada coexisten dos fases cuyas composiciones en el equilibrio están vinculadas por *"tie lines"* o líneas de unión. Por fuera de la curva existe una única fase. La curva acampanada indica las condiciones de transición de fases. El comportamiento de los subsistemas binarios puede observarse sobre los lados del triángulo: los componentes A y B presentan miscibilidad en todo el rango de composición, así como los componentes A y C. Sin embargo, los componentes B y C presentan inmiscibilidad parcial en un rango intermedio de composición. El agregado del componente A va reduciendo el área de inmiscibilidad hasta volver al sistema homogéneo. Este tipo de comportamiento, en el que sólo uno de los subsistemas binarios presenta miscibilidad parcial, se denomina **"tipo I".** Cuando dos de los subsistemas binarios presentan miscibilidad parcial, tal comportamiento se denomina **"tipo II".** Por otra parte, cuando existe equilibrio trifásico líquido-líquido-vapor, el comportamiento es de **"tipo III".** El caso más frecuente en el fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales es el de tipo II, en donde las fracciones (o pseudo-componentes) son parcialmente miscibles con el solvente supercrítico, pero totalmente miscibles entre sí.

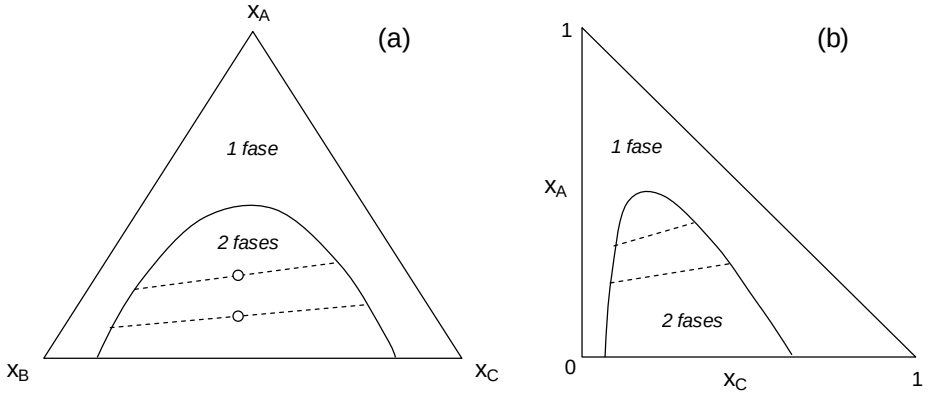


Figura 3.16. Diagramas de equilibrio para un sistema ternario tipo I.
(a) Diagrama triangular equilátero. (b) Diagrama triangular-rectangular.

El cambio en las condiciones de presión y/o temperatura puede inducir un cambio en el comportamiento del sistema de uno a otro tipo, como puede observarse en la Figura 3.17. En esta Figura, A y B pueden ser los componentes de la mezcla a fraccionar y C el solvente supercrítico.

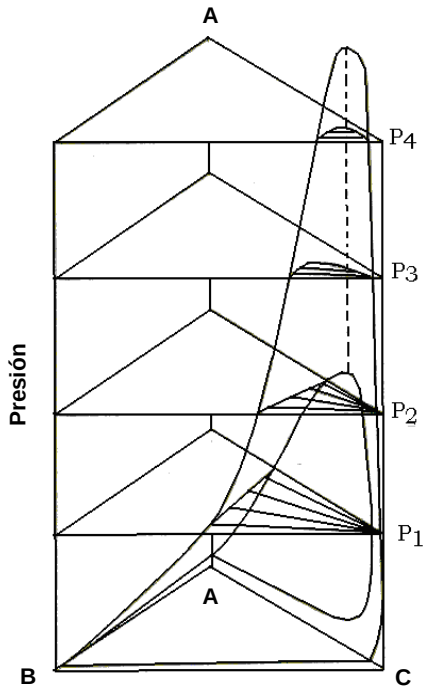


Figura 3.17. Diagrama de equilibrio de fases de un sistema *ternario*.
Modificación del comportamiento por efecto de la presión. Adaptado de [11].

La temperatura es constante, y superior a la temperatura crítica del solvente C. Se observa que a presiones más bajas (P_1 y P_2), el solvente presenta miscibilidad parcial con ambos componentes (comportamiento tipo II). Sin embargo, a medida que P aumenta, el subsistema A-C se vuelve completamente miscible (comportamiento tipo I). A corresponde al compuesto más volátil (por ejemplo, terpenos hidrocarbonados) y B al menos volátil (por ejemplo, terpenos oxigenados). Sobre las caras laterales del paralelepípedo pueden verse las curvas de rocío y burbuja correspondientes a los diagramas *P-x,y* de los respectivos binarios.

3.2.3. Análisis de la separación y ventana operativa

En líneas generales, podría decirse que el análisis de un proceso de separación puede tener dos objetivos básicos: determinar qué grado de separación es posible en una columna dada y en qué rango de condiciones –lo cual constituye un problema de *simulación/operación*– o bien determinar las dimensiones de columna y demás características necesarias para una separación especificada –es decir, un problema de *diseño*. Puede considerarse que la solución del problema se divide en tres partes [12]:

1) La determinación del *número de etapas teóricas* (o unidades de transferencia), lo cual implica un análisis de la separación en términos del equilibrio de fases, independientemente de las características del equipamiento.
2) El *dimensionamiento* del equipo con respecto al desempeño deseado, que implica definir la altura y el diámetro necesarios (los que a su vez se relacionan con la eficiencia de la transferencia de masa, la productividad requerida y los aspectos hidrodinámicos).
3) El diseño del *ciclo de solvente*.

La primera parte implica un análisis termodinámico de la separación en términos del equilibrio de fases, y es independiente de las características del equipamiento. Para ello es fundamental contar con datos de equilibrio de fases, ya sean experimentales o mediante correlaciones adecuadas: extensión de la región bifásica, solubilidades de equilibrio en ambas fases, densidad de las fases, coeficientes de distribución de los componentes individuales (selectividad) y su dependencia con las condiciones de presión, temperatura y composición.

El dimensionamiento del equipo consiste básicamente en determinar la *altura* y el *diámetro* de la columna de separación. La altura se relaciona con la eficiencia de la transferencia de masa, y depende fuertemente del tipo de equipo utilizado (columnas rellenas, de platos, etc.). Por su parte, el diámetro se relaciona con la productividad requerida, y depende más de aspectos hidrodinámicos.

Por otra parte, los elevados caudales normalmente requeridos de solvente supercrítico implican que éste debe ser regenerado y recirculado al proceso, fundamentalmente por cuestiones de economía [7]. Este *reciclo* tiene costos asociados, determinados por el caudal utilizado y el modo de recuperación (variaciones de presión y temperatura, membranas, adsorción, etc.). Desde el punto de vista energético, la recuperación del

solvente a presión constante es el modo más conveniente. No obstante, generalmente es necesario el uso de bombas o compresores para re-presurizarlo. La elección de uno u otro modo depende de la cantidad de energía requerida (calculable en un diagrama *temperatura–entropía*), pero también del costo y disponibilidad de los equipos y los sumideros de calor [11].

Finalmente, al aplicar los conceptos de la ingeniería del equilibrio de fases al diseño de un esquema experimental o al análisis de un proceso de separación con fluidos supercríticos, es conveniente definir de manera preliminar una **"ventana operativa"**, es decir, una región de operación delimitada por valores máximos y mínimos admisibles de ciertas variables [65].

En primer lugar, es preciso asegurar la coexistencia de dos fases en el sistema, y a lo largo de toda la columna. Para ello es de gran utilidad determinar *envolventes de fases* para distintas composiciones globales. Como se ha visto, estas representaciones indican los límites de presión y temperatura de la región heterogénea o bifásica. Dentro de esta región, la ventana operativa puede acotarse aún más en función de otros criterios.

La termolabilidad de numerosos compuestos naturales suele imponer un límite superior al rango de *temperaturas* admisibles de operación, por encima del cual se produce (o se acelera) su degradación. Para el caso de los aceites esenciales, no es recomendable operar por encima de 343 K debido a problemas de oxidación y polimerización de compuestos insaturados. Por su parte, el límite inferior corresponderá en general a la temperatura crítica del solvente (304.1 K para el CO_2).

También es posible definir un rango de *densidad* del solvente. Si la densidad es muy baja, la solubilidad caerá por debajo de lo aceptable, incrementando el consumo de solvente. Pero si es muy alta, la diferencia de densidad entre la fase líquida y la supercrítica puede no ser suficiente para una adecuada separación física entre las fases, como ya se ha mencionado, o puede incluso producirse el inundamiento de la columna. Se ha indicado que se requiere una diferencia mínima de 150 kg/m^3 entre las densidades de las fases para poder asegurar estas condiciones [65].

Estos criterios generales son los que se aplicarán tanto a la selección de las condiciones experimentales como a la simulación y análisis de columnas de fraccionamiento, tema de los siguientes capítulos.

REFERENCIAS

[1] Reverchon, E., De Marco, I. *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter (Review).* J. of Supercritical Fluids 38 (2006) 146-166.

[2] Riha, V., Brunner, G. *Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 17 (2000) 55-64.

[3] Catchpole, O.J., Grey, J.B., Noermark, K.A. *Fractionation of fish oils using supercritical CO_2 and CO_2+ethanol mixtures*. J. of Supercritical Fluids 19 (2000) 25-37.

[4] Vázquez, L., Torres, C.F., Fornari, T., Señoráns, F.J., Reglero, G. *Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction*. J. of Supercritical Fluids 40 (2007) 59-66.

[5] Fornari, T., Vázquez, L., Torres, C.F., Ibáñez, E., Señoráns, F.J., Reglero, G. *Countercurrent supercritical fluid extracion of different lipid-type materials: Experimental and thermodynamic modeling.* J. of Supercritical Fluids 45 (2008) 206-212.

[6] Reverchon, E., Marciano, A., Poletto, M. *Fractionation of a peel oil key mixture by supercritical CO_2 in a continuous tower.* Industrial & Engineering Chemistry Research 36 (1997) 4940-4948.

[7] Díaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A. *Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. Optimal process and solvent cycle design.* J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 49-61.

[8] Brignole, E.A., Andersen, P.M., Fredenslund, A. *Supercritical fluid extraction of alcohols from water.* Industrial & Engineering Chemistry Research 26 (1987) 254-261.

[9] Espinosa, S., Bottini, S.B., Brignole, E.A. *Process analysis and phase equilibria for the removal of chemicals from fatty oils using near-critical solvents*. Industrial & Engineering Chemistry Research 39 (2000) 3024-3033.

[10] Zosel, K. *Separation with Supercritical Gases: Practical Applications.* Angewandte Chemie International Edition, English, 17 (1978) 702.

[11] Brunner, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes*. Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1994.

[12] Brunner, G. *Counter-current separations (Review).* J. of Supercritical Fluids 47 (2009) 574-582.

[13] Demicoli, D., Stichlmair, J. *Separation of ternary mixtures in a batch distillation column with side withdrawal.* Computers and Chemical Engineering 28 (2004) 643-650.

[14] Seader, J.D., Henley, E.H., Hoper, D.K. *Separation Process Principles. Chemical and Biochemical Operations*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Inc., 2011.

[15] Sartorelli, L., Brunner, G. *Separation of extracts from supercritical carbon dioxide by means of membranes*. In: State of the art book on supercritical fluids (Ed.: ainia). Valencia, España, 2004.

[16] Gamse, T. *Supercritical fluid extraction and fractionation of liquids*. In: In: State of the art book on supercritical fluids (Ed.: ainia). Valencia, España, 2004.

[17] Bertucco, A., Vetter, G. (Eds.). *High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications*. Industrial Chemistry Library, Volume 9. Elsevier, Amsterdam, 2001.

[18] Beneti, S.C., Rosset, E., Corazza, M.L., Frizzio, C.D., Di Luccio, M., Vladimir Oliveira, J. *Fractionation of citronella (Cymbopogon winterianus) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation*. J. of Food Engineering 102 (2011) 348-354.

[19] Owusu-Yaw, J., Matthews, R.F., West, P.F. *Alcohol deterpenation of orange oil*. J. of Food Science 51 (1986) 1180-1182.

[20] Koshima, C.C., Capellini, M.C., Geremias, I.M., Carvalho, F.H., Aracava, K.K., Bueno, R.S., Goncalves, C.B., Rodrigues, C.E.C. *Deterpenation of bergamot essential oil using liquid-liquid extraction: Equilibrium data of model systems at 298.2 K*. J. of Chemical and Engineering Data 56 (2011) 2362-2370.

[21] Koshima, C.C., Capellini, M.C., Geremias, I.M., Aracava, K.K., Goncalves, C.B., Rodrigues, C.E.C. *Fractionation of lemon essential oil by solvent extraction: Phase equilibrium for model systems at T=298.2 K*. J. of Chemical Thermodynamics 54 (2012) 316-321.

[22] Gerard, D. *Continuous removal of terpenes from essential oils by countercurrent extraction with compressed carbon dioxide*. Chemical Engineering & Technology 56 (1984) 794–795.

[23] Temelli, F., Chen, C.S., Braddock, R.J. *Supercritical fluid extraction in citrus oil processing*. Food Technology 6 (1988) 145–150.

[24] Temelli, F., O'Connell, J., Chen, C., Braddock, R. *Thermodynamic analysis of supercritical carbon dioxide extraction of terpenes from cold-pressed orange oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research 29 (1990) 618–624.

[25] Barth, D., Chouchi, D., Reverchon, E., Della Porta, G., Perrut, M. *Desorption of lemon oil by supercritical carbon dioxide: deterpenation and psoralens elimination.* J of Supercritical Fluids 7 (1994) 177-183.

[26] Tan, C.S., Liou, D.C. *Modeling of desorption at supercritical conditions*. AIChE Journal 35 (1989) 1029-1031.

[27] Chouchi, D., Barth, D., Reverchon, E., Della Porta, G. *Supercritical CO_2 desorption of bergamot oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research 34 (1995) 4508-4513.

[28] Shen, Z., Mishra, V., Imison, B., Palmer, M., Fairclough, R. *Use of adsorbent and supercritical carbon dioxide to concentrate flavor compounds from orange oil*. J. of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 154-160.

[29] Subra, P., Vega-Bancel, A., Reverchon, E. *Breakthrough curves and adsorption isotherms of terpenes mixtures in supercritical carbon dioxide.* J. of Supercritical Fluids 12 (1998) 43-57.

[30] Reverchon, E., Lamberti, G., Subra, P. *Modelling and simulation of the supercritical adsorption of complex terpene mixtures*. Chemical Engineering Science 53 (1998) 3537-3544.

[31] Reverchon, E. *Supercritical desorption of limonene and linalool from silica gel: experiments and modeling.* Chemical Engineering Science 52 (1997) 1019-1027.

[32] Sato, M., Goto, M., Hirose, T. *Fractional extraction with supercritical carbon dioxide for the removal of terpenes from citrus oils*. Industrial & Engineering Chemistry Research 34 (1995) 3941–3946.

[33] Sato, M., Goto, M., Hirose, T. *Supercritical fluid extraction on semi-batch mode for the removal of terpene in citrus oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research 35 (1996) 1906–1911.

[34] Kondo, M., Akgun, N., Goto, M., Kodama, A., Hirose, T. *Semi-batch operation and countercurrent extraction by supercritical CO_2 for the fractionation of lemon oil*. J. of Supercritical Fluids 23 (2002) 21-27.

[35] Benvenuti, F., Gironi, F., Lamberti, L. *Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process*. J. of Supercritical Fluids 20 (2001) 29–44.

[36] Gironi, F., Maschietti, M. *Supercritical carbon dioxide fractionation of lemon oil by means of a batch process with an external reflux*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 227–234.

[37] Sato, M., Kondo, M., Goto, M., Kodama, A., Hirose, T. *Fractionation of citrus oil by supercritical countercurrent extractor with side-stream withdrawal*. J. of Supercritical Fluids 13 (1998) 331–317.

[38] Reverchon, E., Marciano, A., Poletto, M. *Fractionation of a peel oil key mixture by supercritical CO_2 in a continuous tower*. Industrial & Engineering Chemistry Research 36 (1997) 4940–4948.

[39] Budich, M., Heilig, S., Wesse, T., Leibküchler, V., Brunner, G. *Countercurrent deterpenation of citrus oils with supercritical CO_2.* J. of Supercritical Fluids 14 (1999) 104–114.

[40] Raeissi, S., Diaz, S., Espinosa, S., Peters, C.J., Brignole, E.A. *Ethane as an alternative solvent for supercritical extraction of orange peel oils*. J. of Supercritical Fluids 45 (2008) 306–313.

[41] Espinosa, S. *Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales. Modelado, Análisis y Optimización.* Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (2001).

[42] Diaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A. *Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids: Optimal process and solvent cycle design*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 49–61.

[43] Fang, T., Goto, M., Sasaki, M., Hirose, T. *Combination of supercritical CO_2 and vacuum distillation for the fractionation of bergamot oil.* J. of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 5162-5167.

[44] Reverchon, E. *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.* J. of Supercritical Fluids 10 (1997) 1-37.

[45] Reverchon, E., Taddeo, R., Della Porta, G. *Extraction of sage oil by supercritical CO_2: Influence of some process parameters.* J. of Supercritical Fluids 8 (1995) 302-309.

[46] Reverchon, E., Della Porta, G., Senatore, F. *Supercritical CO_2 extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes.* J. of Agricultural and Food Chemistry 43 (1995) 1654-1658.

[47] Simándi, B., Oszagyán, M., Lemberkovics, E., Kéry, A., Kaszács, J., Thyrion, F., Mátyás, T. *Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin.* Food Research International 31 (1999) 723-728.

[48] Simándi, B., Deák, A., Rónyai, E., Yanxiang, G., Veress, T., Lemberkovics, E., Then, M., Sass-Kiss, A., Vámos-Falusi, Z. *Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of fennel oil.* J. of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999) 1635-1640.

[49] Ibáñez, E., Oca, A., de Murga, G., López-Sebastián, S., Tabera, J., Reglero, G. *Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants.* J. of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999) 1400-1404.

[50] Daghero, J., Mattea, M., Reverchon, E., Della Porta, G., Senatore, F. *Isolation of Tagetes minuta L. oil using supercritical CO_2 extraction.* Acta Horticulturae 503 (1999) 21-25.

[51] Gaspar, F. *Extraction of essential oils and cuticular waxes with compressed CO_2: Effect of extraction pressure and temperature*. Industrial & Engineering Chemistry Reserarch 41 (2002) 2497-2503.

[52] Kotnik, P., Skerget, M., Knez, Z. *Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up.* J. of Supercritical Fluids 43 (2007) 192-198.

[53] García-Risco, M.R., Vicente, G., Reglero, G., Fornari, T. *Fractionation of thyme (Thymus vulgaris L.) by supercritical fluid extraction and chromatography*. J. of Supercritical Fluids 55 (2011) 949-954.

[54] Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D. *Extraction of sage (Salvia officinalis* L.*) by supercritical CO_2: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes*. J. of Supercritical Fluids 52 (2010) 62-70.

[55] Reverchon, E., Della Porta, G., Gorgoglione, D. *Supercritical CO_2 fractionation of jasmine concrete*. J. of Supercritical Fluids 8 (1995) 60-65.

[56] Reverchon, E., Della Porta, G. *Rose concrete fractionation by supercritical CO_2*. J. of Supercritical Fluids 9 (1996) 199-204.

[57] Reverchon, E., Della Porta, G., Lamberti, G. *Modelling of orange flower concrete fractionation by supercritical CO_2*. J. of Supercritical Fluids 14 (1999) 115-121.

[58] Reverchon, E., Poletto, M. *Mathematical modelling of supercritical CO_2 fractionation of flower concretes*. Chemical Engineering Science 51 (1996) 3741-3753.

[59] Glisic, S.B., Ristic, M., Skala, D.U. *The combined extraction of sage (Salvia officinalis L.): Ultrasound followed by supercritical CO_2 extraction*. Ultrasonics Sonochemistry 18 (2011) 318-326.

[60] Köse, O., Akman, U., Hortacsu, O. *Semi-batch deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 18 (2000) 49–63.

[61] Varona, S., Martin, A., Cocero, M.J., Gamse, T. *Supercritical carbon dioxide fractionation of Lavandin essential oil: Experiments and modeling*. J. of Supercritical Fluids 45 (2008) 181–188.

[62] Martín, A., Cocero, M.J. *Mathematical modeling of the fractionation of liquids with supercritical CO_2 in a countercurrent packed column*. J. of Supercritical Fluids 39 (2007) 304-314.

[63] Pereda, S., Bottini, S.B., Brignole, E.A. *Phase equilibrium engineering of supercritical reactors*. AIChE Journal 48 (2002) 2635-2645.

[64] Brignole, E.A., Pereda, S. *Phase Equilibrium Engineering*. Supercritical Fluid Science and Technology, Vol. 3 (Series Editor: E. Kiran). Elsevier, 2013.

[65] Brunner, G. *Industrial process development. Countercurrent multistage gas extraction (SFE) processes*. J. of Supercritical Fluids 13 (1998) 283–301.

SECCIÓN II

FRACCIONAMIENTO SUPERCRÍTICO DE ACEITES ESENCIALES CON ACTIVIDAD BIOCIDA

4. **Materiales, equipos y métodos experimentales**
5. **Modelado termodinámico del equilibrio entre fases**
6. **Resultados experimentales y discusión**
7. **Simulación y análisis de columnas en contra-corriente**
8. **Conclusiones y trabajos a futuro**

4. Materiales, equipos y métodos experimentales

4.1. Medición del equilibrio de fases a alta presión

4.1.1. Aspectos generales

Para obtener un conocimiento más completo del escenario de fases de un sistema, es fundamental contar con información experimental confiable. Cuando se trabaja con sistemas complejos, asimétricos y en condiciones de alta presión, pueden aparecer fenómenos que no son correctamente descriptos por los modelos predictivos. Estos modelos pueden brindar estimaciones preliminares y descripciones cualitativas, pero cuando se requiere una descripción cuantitativa, es necesario medir y ajustar el modelo en base a mediciones.

La determinación experimental de datos de equilibrio de fases a alta presión no es una tarea simple, pues en general no pueden usarse los mismos dispositivos que al medir a baja presión. En la literatura puede hallarse una gran variedad de equipamientos utilizados, en cuanto a principios de funcionamiento, rangos operativos de presión y temperatura, tamaño, materiales, métodos de muestreo, métodos de análisis, etc. La selección del método más adecuado dependerá básicamente del tipo de equilibrio que se desea medir (LV, LLV, SL, SV, SLV, etc.) y del tipo de datos que se desea obtener (composiciones de las fases, condiciones de transición de fases, líneas críticas, solubilidades, etc.) [1][2].

A pesar de la gran variedad de métodos, es posible clasificarlos en base a ciertos criterios generales. Seguimos aquí la generalizada distinción entre métodos *analíticos* y *sintéticos*. Un esquema de esta clasificación se muestra en la Figura 4.1.

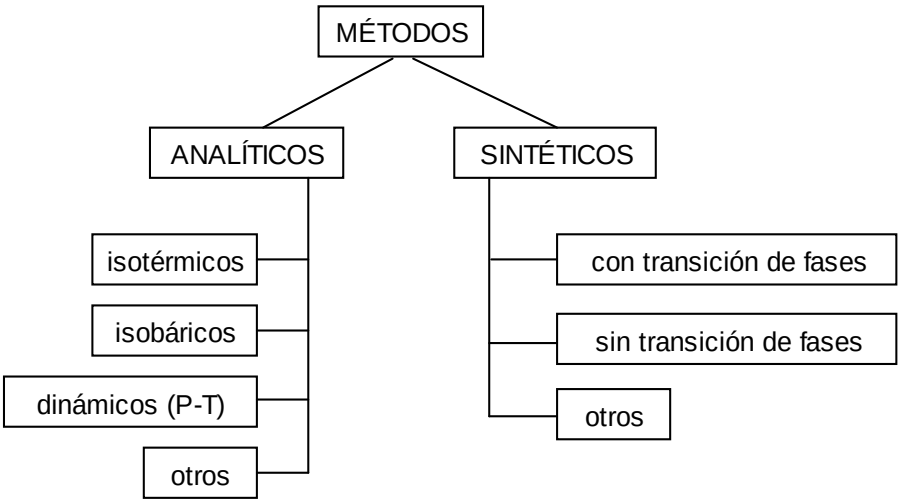


Figura 4.1. Clasificación de los métodos de medición del equilibrio de fases a alta presión

A continuación se describen brevemente los métodos y su aplicación a la medición de equilibrio de fases de sistemas constituidos por fluidos supercríticos y terpenos o aceites esenciales. Pueden encontrarse reportes exhaustivos sobre los distintos métodos, su funcionamiento, su frecuencia y listas de los sistemas estudiados en las revisiones periódicamente publicadas por la revista *Fluid Phase Equilibria* (Fornari y col. [3], Dohrn y Brunner [4], Christov y Dohrn [5], Dohrn y col. [6] y Fonseca y col. [7]), trabajos que cubren las investigaciones de las últimas cuatro décadas.

4.1.2. Métodos analíticos

Estos métodos se basan en la determinación analítica de la composición de las fases en equilibrio. El sistema a estudiar –cuya composición global no necesita ser conocida– se confina o se hace circular a través de un recipiente (*celda de equilibrio*) en donde se lleva a condiciones de presión y temperatura tales que se formen dos o más fases. Luego se determina la composición de cada fase (o de alguna de ellas), ya sea tomando pequeñas muestras o bien midiendo alguna propiedad fisicoquímica dentro de la propia celda (por ejemplo, análisis espectroscópico o gravimétrico). La celda puede contar con una o más ventanas para la observación directa del estado de fases del sistema.

La principal ventaja de estos métodos es que permiten analizar sistemas multicomponentes sin mayores complicaciones. Si se analizan todas las fases presentes, permiten obtener información completa sobre las *tie-lines*.

A su vez estos métodos pueden clasificarse como *isotérmicos*, *isobáricos* o *isotérmico-isobáricos* (según permanezca constante la temperatura, la presión o ambas), o como *estáticos* y *dinámicos* (según si las fases permanecen confinadas en la celda durante el ensayo o fluyen a través de ella).

a) Métodos analíticos isotérmicos

En estos métodos, la temperatura del sistema permanece constante durante la etapa de equilibramiento. La temperatura, el volumen de la celda y la cantidad de material cargado determinarán la presión y la composición de las fases al llegar al equilibrio. Es fundamental asegurarse que el sistema alcance el equilibrio antes de realizar la medición. Para ello, y para reducir el tiempo de equilibramiento, es aconsejable el uso de agitación interna o de recirculación de una o más fases. Antes del muestreo o de la medición *in situ*, es preciso detener la agitación o recirculación y dejar al sistema en reposo, para que las fases se separen según su densidad. De lo contrario, la muestra de una fase puede no ser homogénea y contener gotas, burbujas o partículas de la otra fase. Si se toman muestras de las fases, debe procurarse que el muestreo no perturbe el equilibrio del sistema, lo cual puede lograrse tomando muestras suficientemente pequeñas o aislando la muestra del resto del sistema (entre dos válvulas) antes de su despresurización. Otro problema asociado al muestreo es la posible condensación o precipitación de solutos en las líneas durante la despresurización. Esto puede evitarse o minimizarse calefaccionando las líneas, incrementando la velocidad de salida o reduciendo su tamaño todo lo posible (utilizando líneas capilares).

Una vez medido un punto, se modifica la presión (a temperatura constante) y se repite el procedimiento de equilibramiento y medición. De este modo, se obtienen diagramas *P-x,y* a temperatura constante.

En la Figura 4.2 se muestra un esquema simplificado de una celda de equilibrio que utiliza un método analítico isotérmico. Este método se denomina a veces *estático-analítico*, para diferenciarlo de los métodos dinámicos o de flujo.

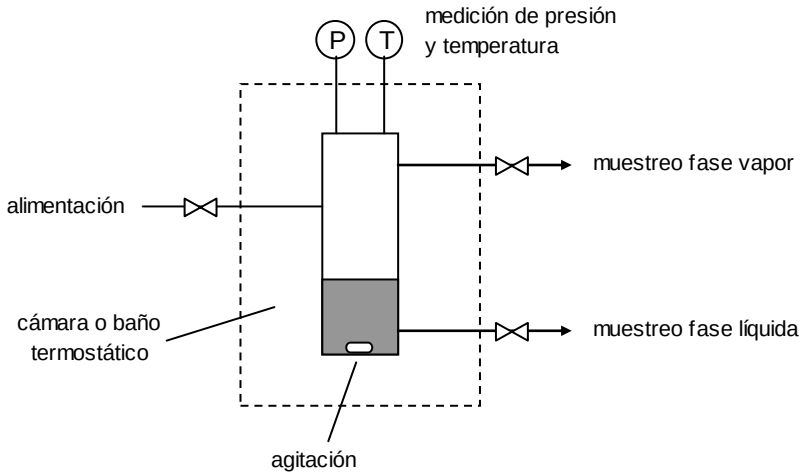


Figura 4.2. Representación esquemática de celda de equilibrio para método *analítico-isotérmico.*

Este método ha sido muy utilizado para medir el equilibrio de fases de sistemas formados por sistemas terpénicos (terpenos puros, mezclas sintéticas de terpenos o aceites esenciales naturales), como se muestra en la Tabla 4.1. La información obtenida permite obtener información sobre los límites de la región bifásica (en sistemas binarios, ternarios y multicomponente, de utilidad tanto para procesos de separación como de reacción), la distribución de componentes entre las fases (y por lo tanto, sus factores de separación) y ciertas propiedades de las fases (como su densidad o grado de expansión).

Tabla 4.1. Medición de equilibrio de fases de sistemas terpénicos + fluidos supercríticos utilizando métodos *analíticos isotérmicos.*

Autores	***Sistema***	***Datos obtenidos***	***Ref.***
Matos y col. (1989)	limoneno y 1,8-cineol + mezcla azeotrópica CO_2-etano	diagramas *P-x,y* líneas críticas (*P-T*)	[8]
Pavlicek y col. (1993)	α-pineno + CO_2	diagramas *P-x,y*.	[9]
Matos y col. (1994)	limoneno y 1,8-cineol + etileno (ternarios)	diagramas ternarios (*P-x,y*). factor de separación.	[10]
Akgun y col. (1999)	limoneno, α-pineno, fenchona, alcanfor + CO_2	diagramas *P-x,y* y *P-y*.	[11]
Budich y col. (1999)	aceite de naranja + CO_2	diagramas *P-x,y*. densidades de fases.	[12]
Benvenuti y col. (2001)	limoneno, citral + CO_2 (binarios y ternarios)	diagramas *P-x,y* binarios y ternarios	[13]
Drescher y col. (2002)	aceite de naranja + CO_2 + etanol	diagramas *P-x,y* binarios y ternarios	[14]

Bogel y col. (2009)	β-mirceno + CO_2 y H_2 (binarios y ternarios)	diagramas *P-x,y* binarios y ternarios. expansión de fase líquida.	[15]
Gironi y col. (2010)	limoneno + CO_2	diagramas *P-x,y*	[16]
Gironi y col. (2011)	citral + CO_2	diagramas *P-x,y*	[17]
Maschietti y col. (2011)	cariofileno, humuleno + CO_2	diagramas *P-x,y*	[18]
Gironi y col. (2012)	aceite de limón + CO_2	diagramas *P-x,y*. composición fraccional de fase vapor (MT, OT, ST).	[19]

b) Métodos analíticos isobáricos

En estos métodos se determina la temperatura de ebullición de una mezcla en condiciones de presión constante. Las fases líquido y vapor son muestreadas y analizadas por separado. Por lo general, se utilizan para medir datos a baja presión, por lo que no se describirán aquí.

c) Métodos analíticos isotérmicos-isobáricos ("dinámicos")

En este grupo se encuentran los métodos a menudo denominados "dinámicos". En ellos, una o más corrientes fluidas son alimentadas a una celda de equilibrio en condiciones fijas de temperatura y presión. La presión es controlada regulando el caudal de salida de alguna de las corrientes. Estos métodos pueden ser *continuos* o *semicontinuos*.

En los métodos ***continuos***, se alimentan todos los componentes a un mezclador (generalmente estático), en donde se alcanzan las condiciones de equilibrio. Esta corriente es alimentada luego a la celda de equilibrio, en donde se separa en fases (por ejemplo, líquido y vapor). Ambas fases son extraídas en forma continua de la celda, despresurizadas, acumuladas y analizadas separadamente. Mediante el control del caudal de salida de la fase superior se ajusta la presión del sistema, mientras que a través del caudal de salida de la fase inferior se ajusta el nivel de la interfase. En estos métodos, el muestreo no perturba el equilibrio del sistema. El corto tiempo de residencia permite realizar mediciones a alta temperatura con mínima descomposición o alteración de los compuestos termolábiles. Sin embargo, sólo pueden utilizarse si el sistema alcanza rápidamente el equilibrio. La Figura 4.3 muestra un esquema de este método experimental.

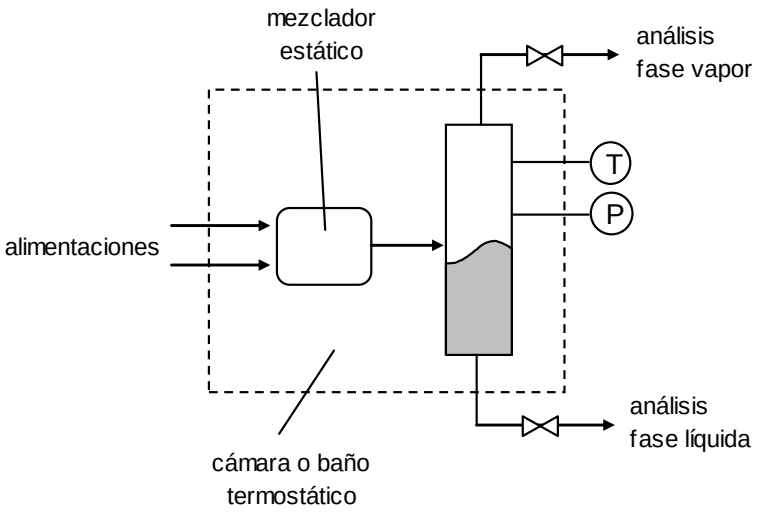


Figura 4.3. Representación esquemática de un equipo dinámico *continuo*

En los métodos ***semicontinuos***, en cambio, sólo existe flujo de una fase, mientras que la otra permanece en la celda de equilibrio. Generalmente, la fase condensada es la que permanece en la celda y la fase vapor (o supercrítica) fluye a través de ella, alcanzando la saturación antes de abandonarla. En tal caso, esta técnica se denomina también *"método de gas saturado"*, y es particularmente útil para determinar de manera rápida la solubilidad de compuestos líquidos o sólidos en fluidos supercríticos. Un esquema de este tipo de equipos se muestra en la Figura 4.4.

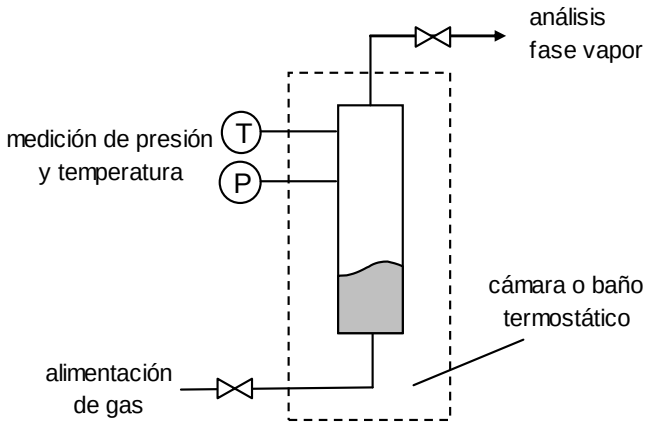


Figura 4.4. Representación esquemática de un equipo dinámico *semicontinuo.*

La Tabla 4.2 muestra una lista de trabajos reportados en la literatura que estudian el equilibrio de fases en sistemas constituidos por terpenos puros, mezclas sintéticas de

terpenos o aceites esenciales naturales y fluidos supercríticos. Se indica el sistema analizado y el tipo de datos obtenidos.

Tabla 4.2. Medición de equilibrio de fases de sistemas terpénicos + fluidos supercríticos utilizando métodos *analíticos dinámicos.*

Autores	***Sistema***	***Datos obtenidos***	***Ref.***
Temelli y col. (1988)	aceite de naranja + CO_2	solubilidad (*P-y*) composición fase vapor concentración de CO_2 en fase líquida	[20]
Di Giacomo y col. (1989)	limoneno, citral + CO_2 (binarios y ternarios)	solubilidad binaria y ternaria (*P-y*) y selectividad.	[21]
Richter y col. (1993)	α-pineno, *cis*-verbenol + CO_2	solubilidad (*P-y*).	[22]
Sovová y col. (1994)	mentol + CO_2	solubilidad (*P-y*).	[23]
Mukhopadhyay y col. (1995)	mentol + CO_2	solubilidad (*P-y*).	[24]
Kim y col. (1999)	carvona, limoneno + CO_2 (binarios y ternarios)	solubilidad binaria y ternaria (*P-y*) y selectividad.	[25]
Berna y col. (2000)	limoneno, linalool + CO_2	solubilidad (*P-y*).	[26]
Gamse y col. (2000)	carvona, limoneno + CO_2 (binarios y ternarios)	diagramas *P-x,y* (muestreo de ambas fases)	[27]
Francisco y col. (2002)	1,8-cineol, limoneno, α-pineno y aceite de eucalipto + CO_2	solubilidad binaria, ternaria y multicomponente (*P-y*).	[28]

4.1.3. Métodos sintéticos

Estos métodos consisten básicamente en preparar o "sintetizar" una mezcla de composición conocida en forma precisa, y luego observar su comportamiento de fases en una celda de equilibrio al ser sometida a cambios de temperatura y presión (o volumen). La principal ventaja de estos métodos es que no se requiere tomar muestras de las fases. Los experimentos pueden involucrar o no una transición de fases.

En los métodos ***con transición de fases***, se ajustan las condiciones de temperatura y presión del sistema de modo de obtener una sola fase. Luego se modifica lentamente la presión (o a veces la temperatura), hasta que se observa la formación de una nueva fase incipiente. La presión puede modificarse fácilmente variando el volumen de la celda. La composición de la fase principal se considera igual a la composición global del sistema, pero la composición de la fase incipiente no se conoce. Por lo tanto, cada experimento

permite obtener un punto de la envolvente de fases *P-T-x*. Cuando se estudia equilibrio LV, se obtienen puntos de burbuja o de rocío; cuando se trata de equilibrio SL, se obtienen puntos de niebla (*cloud points*). La transición de fases puede detectarse visualmente o bien mediante el monitoreo de alguna otra propiedad fisicoquímica del sistema que se modifique sensiblemente con la transición.

En los métodos sintéticos ***sin transición de fases***, se lleva al sistema a condiciones en donde existan dos o más fases. Se mide la presión, la temperatura, el volumen y la densidad de cada fase, y luego se calcula la composición de las fases mediante un balance de masa.

Los métodos sintéticos son muy convenientes para determinar equilibrios binarios y envolventes de fases en sistemas multicomponente. Las mediciones requieren relativamente poco tiempo, y puede investigarse un amplio rango de condiciones utilizando una cantidad baja de muestra. Si se utiliza determinación visual, los componentes de la mezcla deben tener distinto índice de refracción. La Figura 4.5 muestra un esquema simplificado de este tipo de métodos.

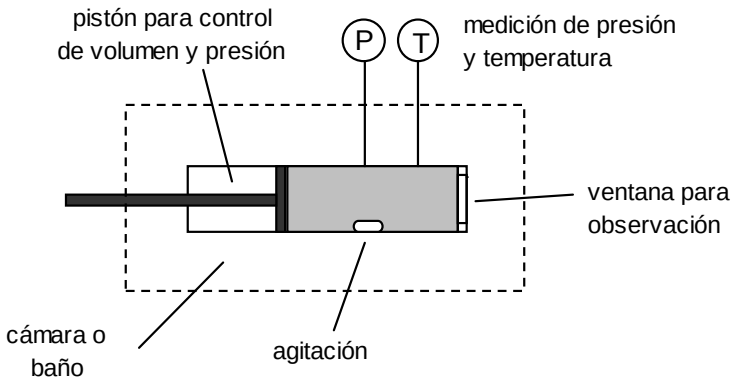


Figura 4.5. Representación esquemática de una celda de volumen variable para método *sintético*.

La Tabla 4.3 muestra una lista de trabajos reportados por distintos autores que han estudiado el equilibrio de fases de sistemas terpénicos y fluidos supercríticos utilizando métodos sintéticos. En algunos casos, se han obtenido datos muy completos sobre el escenario global de fases, observándose equilibrios múltiples (LV, LLV, SV, SL, SLV), como en el caso del sistema CO_2 + mentol [38].

Tabla 4.3. Medición de equilibrio de fases de sistemas terpénicos + fluidos supercríticos utilizando métodos *sintéticos.*

Autores	***Sistema***	***Datos obtenidos***	***Ref.***
Gomes de Acevedo y col. (1989)	limoneno, 1,8-cineol + etileno	diagramas binarios *P-x,y*. puntos críticos L-L (cineol+etileno).	[29]
Tufeu y col. (1993)	limoneno, linalool, citronelol, geraniol, citral, citronelal, linalil acetato + CO_2	líneas críticas P_c-*T*, T_c-*y*, P_c-*y* líneas de ELLV. solubilidad (*P-y*).	[30]
Costa y col. (1996)	α- y β-pineno + etileno	diagramas *P-x,y* diagramas ternarios	[31]
De la Fuente y col. (2000)	aceite de limón + CO_2	puntos de burbuja (*P-x*). volumen molar de fase líquida.	[32]
Raeissi y col. (2002)	limoneno + etano	diagramas *P-x,y*. líneas críticas (*P-T*).	[33]
Franceschi y col. (2004)	aceites de limón y bergamota, linalil acetato + CO_2	diagramas *P-x,y*.	[34]
Souza y col. (2004)	aceite de clavo + CO_2	diagramas *P-x,y* (ELV, ELL, ELLV).	[35]
Raeissi y col. (2005)	limoneno, linalool + etano o CO_2	diagramas *P-x,y*. líneas críticas (*P-T*).	[36]
Carvalho Jr. y col. (2006)	alcanfor + CO_2 y propano (binarios y ternario)	diagramas *P-x,y*.	[37]
Sovová y col. (2007)	mentol + CO_2	solubilidad (*P-y*). líneas LV, LL, LLV, SL, SLL, SLV (*P-T*).	[38]
Michielin y col. (2011)	cariofileno, humuleno + CO_2	diagramas *P-x,y*.	[39]

4.1.4. Selección de un método experimental

No existe un único método que reúna todas las ventajas y que sea aplicable en todos los casos. Más bien debe seleccionarse el método en base a cada problema particular. En la selección debe tenerse en cuenta una serie de aspectos:

- el tipo de datos que se desea obtener
- el tipo de muestra a analizar (líquidos, sólidos, puros o mezclas)
- la cantidad disponible de muestra
- el tipo de equilibrio que se espera observar

– el rango de condiciones de presión y temperatura a estudiar
– cuestiones de seguridad (toxicidad, inflamabilidad, etc.)
– los costos del equipamiento
– el tiempo disponible de ensayo

En general, un método analítico estático con una celda suficientemente grande para evitar caídas de presión cubre la mayoría de las necesidades y proporciona datos de calidad, pero tiene grandes limitaciones de operación en la región crítica y cuando la concentración de solutos es muy baja, además de ser más costoso y requerir más tiempo y habilidad del operador. Cuando se analizan sistemas multicomponente, a menudo lo más recomendable es utilizar en paralelo un método sintético, para determinar las fronteras y densidades de las fases, y un método analítico, para determinar sus composiciones [1].
Por otra parte, los métodos *dinámicos* son muy útiles cuando se desea obtener información de fraccionamiento, ya que permiten operar en condiciones más cercanas a las reales y estudiar –además del equilibrio de fases– efectos asociados al flujo. Las principales **ventajas** de este tipo de métodos son:

- El equipo puede ser construido con partes fácilmente disponibles
- El procedimiento de recolección de muestras es simple
- Puede obtenerse mucha información en poco tiempo
- La medición del consumo de solvente puede lograrse fácilmente midiendo el flujo de gas a la salida.

Asimismo, presentan algunas **limitaciones** que deben tenerse en cuenta durante la operación [2]:

- Limitaciones en la transferencia de masa entre fluido y soluto pueden causar que no se alcance el equilibrio. Para ello debe trabajarse a un caudal (o tiempo de residencia) del fluido suficiente para asegurar su saturación, e incrementarse en lo posible el área de contacto entre ambas fases (por ejemplo, depositando los solutos en un lecho de partículas inertes)
- Los solutos poco volátiles pueden condensar o precipitar en la válvula de salida, causando su obturación o flujo errático, y dando resultados no reproducibles. Si se utiliza CO_2 supercrítico, éste también puede precipitar al ser descomprimido (por

efecto Joule-Thompson). Para evitarlo, puede ser útil calefaccionar la válvula y líneas de expansión.

- Si se opera a caudales altos, puede haber arrastre (*entrainment*) de pequeñas gotas o partículas de soluto, dando resultados de solubilidad aparente mayores a los valores de equilibrio.
- Si se opera a altas presiones, puede ocurrir que la densidad del fluido se vuelva mayor que la del soluto, en cuyo caso el soluto puede flotar y ser expulsado de la columna.
- En modo semicontinuo no es posible tomar muestras de la fase líquida.
- No se detectan transiciones de fases, salvo que se utilice un recipiente transparente o con ventanas.

Si se tienen en cuenta las precauciones mencionadas, los métodos dinámicos permiten obtener datos de calidad, comparables a los obtenidos por un método analítico estático, como puede observarse en la Figura 4.6 para el caso de la solubilidad de α-pineno en CO_2. Allí se comparan los resultados obtenidos por medio de un método dinámico semicontinuo [22] y los obtenidos utilizando un método estático analítico [9] a la misma temperatura.

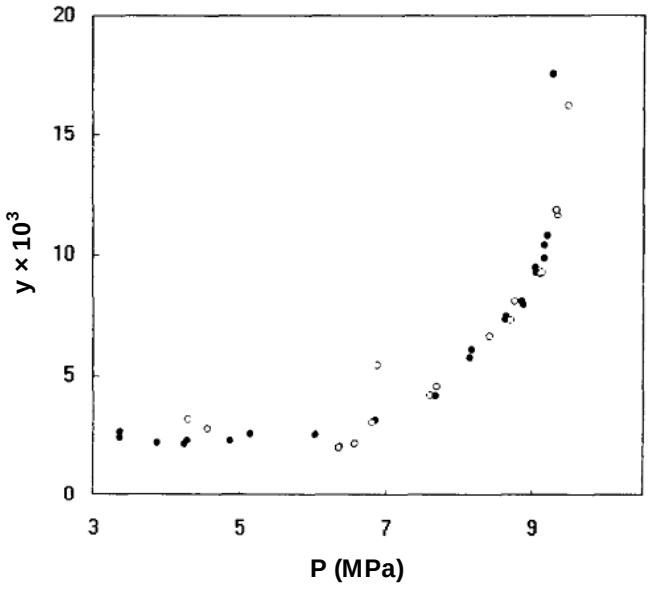


Figura 4.6. Solubilidad de α-pineno en CO_2 a T=50ºC:
(●) método dinámico [22], (○) método estático analítico [9].

Se observa una muy buena concordancia: sólo se obtienen desviaciones importantes en la región crítica de la mezcla, en donde el método dinámico da resultados mayores. Esto se debe a que la diferencia de densidad de las fases se vuelve muy pequeña, y gotas de líquido son arrastradas por la corriente gaseosa, como se ha mencionado.

4.2. Equipo experimental de la tesis

4.2.1. Extractor supercrítico semicontinuo

Las mediciones de equilibrio y fraccionamiento supercrítico que forman parte de esta tesis se realizaron en un equipo *semicontinuo* de alta presión a escala laboratorio, construido en PLAPIQUI como parte de los objetivos de trabajo. Un esquema de este equipo se muestra en la Figura 4.7.

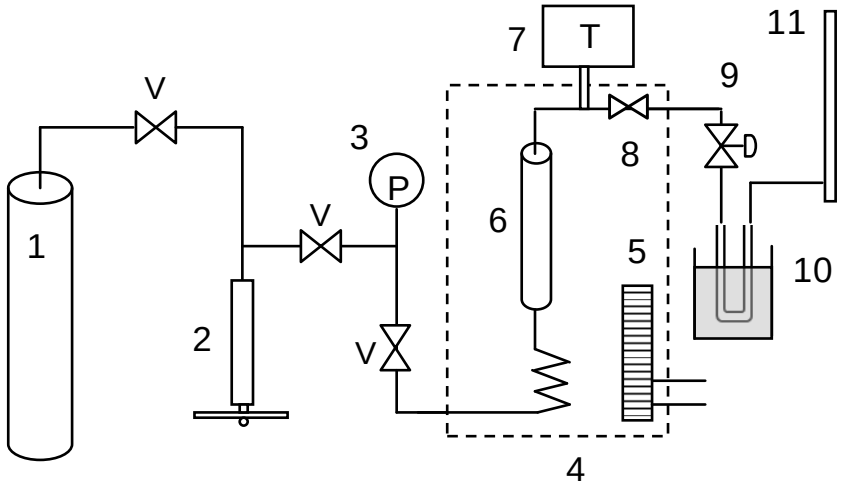


Figura 4.7. Extractor semicontinuo de alta presión.
(1) Tubo de CO_2, (2) generador manual de presión, (3) manómetro, (4) cámara termostática, (5) resistencia calefactora, (6) columna de extracción, (7) controlador de temperatura, (8) válvula BPR, (9) válvula de expansión, (10) recipiente colector refrigerado, (11) caudalímetro de burbuja, (V) válvulas on-off.

El corazón del equipo es la ***celda de extracción,*** en la que se coloca la muestra de aceite a ser fraccionada. Dicha celda consiste en una columna de acero inoxidable de 215 mm de largo y 18 mm de diámetro interno. El espesor de la pared es de 10 mm y tiene dos orificios roscados en los extremos, uno (inferior) del mismo diámetro interno de la

columna y otro (superior) de 12 mm de diámetro. El volumen interno total de la columna es de 50 cm^3. Por la parte inferior se conecta a un serpentín de precalentamiento de 1/8", por el cual se alimenta el solvente desde el generador manual de presión. Por la parte superior se conecta mediante una línea de 1/8" a una una válvula tipo *back pressure regulator* (BPR) y una válvula reguladora de expansión, por medio de la cual se despresuriza la corriente de salida y se controla el caudal. El conjunto serpentín + columna + BPR se encuentra dentro de un compartimiento estanco con control de temperatura, calefaccionado mediante una resistencia de potencia controlada y con agitación mecánica provista por un ventilador y deflectores. La válvula de expansión, por su parte, se mantiene calefaccionada mediante una cinta calefactora para evitar condensación y/o precipitación de solutos y de CO_2. Una fotografía de la celda de extracción se muestra en la Figura 4.8.

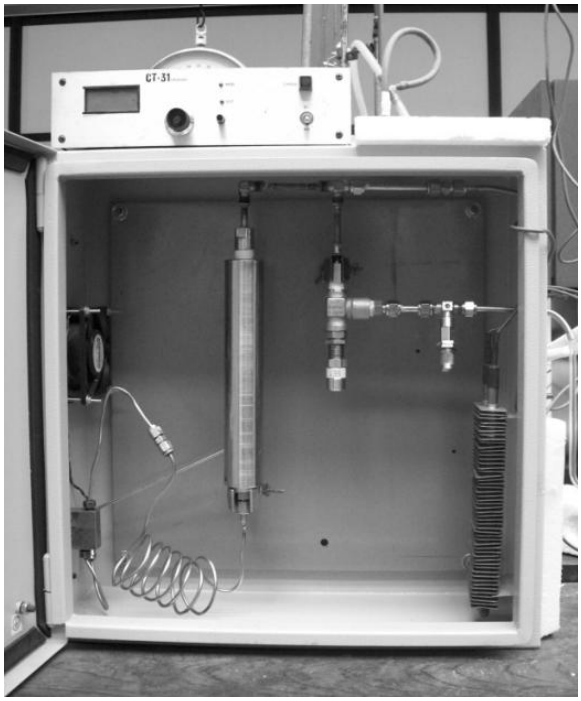


Figura 4.8. Extractor semicontinuo de alta presión (interior). [Nota: la válvula reguladora de expansión fue colocada en el exterior del compartimiento en una modificación posterior].

Aguas arriba se encuentra el ***sistema de alimentación de CO_2***, que consiste en el tubo de almacenamiento y un generador manual de presión (GMP) que permite alimentar el solvente a la celda. El conjunto se comunica mediante líneas de 1/8". El cuerpo del

generador manual de presión se mantiene refrigerado a –15ºC para alimentar CO_2 en estado líquido. Un manómetro conectado a la entrada de la celda permite monitorear la presión del sistema.

Aguas abajo de la válvula de expansión se encuentra conectado el ***recipiente colector***. El colector es un tubo de vidrio en forma de U de 10 cm^3 de capacidad total. Tiene un diámetro de 1/4", excepto en un tramo que presenta una sección de mayor diámetro rellena con lana de bronce y lana de vidrio para incrementar la superficie de contacto con el gas. Puede observase una fotografía en detalle en la Figura 4.9. El colector es mantenido a baja temperatura mediante un baño líquido, de modo que los solutos extraídos en la celda y disueltos en la corriente de salida son condensados y retenidos en el tubo. La corriente gaseosa libre de solutos pasa luego por un caudalímetro de burbuja, que consiste en un tubo de vidrio calibrado a intervalos de 10 cm^3 y con un reservorio de agua jabonosa en la parte inferior para generar burbujas.

Figura 4.9. Extractor semicontinuo de alta presión. Detalle del tubo colector.

4.2.2. Procedimientos experimentales

Con el equipo experimental descripto se realizaron dos tipos de ensayos:

- determinación de isotermas de equilibrio (por método dinámico)
- ensayos de fraccionamiento semicontinuo

En en primer caso, las mediciones se realizaron a temperatura constante y modificando la presión entre cada punto, obteniéndose curvas isotérmicas de solubilidad global y de composición en función de la presión.
En el segundo caso, se mantienen constantes las condiciones de temperatura y presión y se realizan mediciones sucesivas a lo largo del tiempo hasta el nivel deseado de agotamiento de la muestra, obteniéndose curvas de solubilidad global y composición en función del avance del proceso (expresado como tiempo, nivel de extracción o cantidad de CO_2 utilizada).
A continuación se describen más detalladamente los procedimientos de operación, comunes a ambos tipos de ensayo.

i) Procedimiento de carga

Primero se coloca una capa de lana de vidrio en el fondo de la columna, limpia y seca, cuyo objetivo es hacer de soporte a las partículas del lecho y actuar como difusor del CO_2 alimentado. Luego se agrega el relleno de partículas de vidrio (tamaño de partícula 35–60 mesh, y porosidad ε=0.4 determinada experimentalmente) hasta la mitad de la altura de la columna, asegurando su empaquetamiento homogéneo mediante golpeteos y vibraciones. El relleno ha sido previamente lavado y secado en estufa a 180ºC por no menos de 24 horas. Se agrega a continuación y gota a gota 1 ml de aceite, utilizando una pipeta calibrada, y procurando cubrir toda la sección del lecho. Luego se agrega el resto del relleno, dejando un espacio superior libre de aproximadamente 1 cm de altura. Se rellena este espacio con otra capa de lana de vidrio, cuya función es evitar el arrastre de gotas de aceite, y se conecta la columna por ambos extremos a la línea. Se programa la temperatura de operación de la celda y se deja equilibrar.
Se abre el paso de solvente desde el tubo directamente a la celda, con las válvulas de salida cerradas. De este modo, se equilibra la presión de todo el sistema con la del tubo,

que es la correspondiente al CO_2 saturado a la temperatura ambiente (alrededor de 50–60 bar). Esta operación se realiza lentamente, para que evitar que un aumento brusco de presión provoque arrastres de aceite hacia el tope de la celda. Luego se cierra la válvula de entrada a la celda y se carga el GMP, que se mantiene refrigerado para que el solvente cargado permanezca en estado líquido. Se cierra la válvula del tubo y comienza a cargarse más solvente a la columna con el GMP hasta lograr la presión deseada. Se cierra la válvula de entrada y se deja equilibrar. Esta etapa *estática* o de equilibramiento dura no menos de 2 horas, y suele requerir pequeños ajustes adicionales de presión hasta estabilizarla en el valor deseado.

ii) Procedimiento de medición

Una vez equilibrado el sistema en las condiciones de temperatura y presión deseadas, se conecta un extremo del tubo colector a la salida de la válvula de expansión y el otro extremo al caudalímetro de burbuja, mediante mangueras, y luego se sumerge parcialmente en el baño refrigerante (etanol a –50ºC).

Se abre la válvula de expansión poco a poco, midiendo el caudal de salida en el caudalímetro de burbuja y ajustándolo al valor deseado. Para ello se determina con un cronómetro el tiempo que tarda una burbuja en recorrer un volumen dado. Se asume que la temperatura del gas al llegar a la parte superior del caudalímetro es igual a la temperatura ambiente.

Durante la etapa de extracción o *dinámica* se alimenta el CO_2 desde el GMP de modo de mantener la presión constante en la celda. El caudal se mide en forma intermitente con la frecuencia necesaria (por ejemplo, cada minuto), para tener en cuenta posibles oscilaciones. Se utilizan caudales suficientemente bajos para permitir la saturación del CO_2, y por lo tanto poder considerar la composición de la fase como la correspondiente al equilibrio.

La *cantidad de extracto* se determina gravimétricamente, por diferencia de peso del tubo colector antes y después de la extracción, utilizando una balanza analítica Sartorius CP224S (d=0.1 mg). La cantidad de extracto recogido en cada medición es del orden de 50 mg.

La *cantidad de solvente* se determina volumétricamente, integrando el caudal medido sobre el tiempo total de la extracción. Para ello se utiliza el método de Euler, que se considera suficientemente exacto puesto que las variaciones de caudal son lentas. Luego

se convierte a masa el volumen total de CO_2, utilizando la ecuación del gas ideal a la presión y temperatura del ambiente al momento del ensayo. Las variaciones de caudal a lo largo de un ensayo pueden atribuirse a diferentes causas: el carácter intermitente de la alimentación manual de solvente (que puede generar pequeñas variaciones de presión), pequeños cambios de temperatura en el fluido refrigerante, pequeños cambios de temperatura en la válvula de salida debidos al enfriamiento producido por la descompresión, etc.

El extracto es recogido lavando el tubo en U con hexano o acetona (de acuerdo al tipo de aceite) y guardado en un vial para su posterior análisis cromatográfico. Luego el tubo es lavado con solvente (hexano, acetona o alcohol) y secado en estufa a 180ºC por no menos de 24 horas, hasta retornar a su peso original.

iii) Procedimiento de recuperación del refinado

En los ensayos de fraccionamiento semicontinuo es de interés recuperar el aceite residual que queda en la celda (refinado), tanto para analizar su composición como para poder realizar ensayos de bioactividad. Se evaluaron dos métodos diferentes de recuperación: (a) lavado del relleno y (b) extracción por el tope.

En el primer caso, luego de despresurizar completamente la celda se extrajo el relleno y se lavó con hexano o acetona. La solución de lavado obtenida es filtrada y almacenada, repitiéndose el proceso tres veces con solvente nuevo. Los principales inconvenientes de esta metodología son:

- durante la despresurización de la celda hay pérdida de aceite en el extracto;
- durante la apertura y descarga de la columna hay pérdida de aceite por evaporación al ambiente;
- la cantidad de solvente necesaria para lavar el relleno y poder luego separar el líquido por filtrado hace necesaria una posterior concentración por evaporación antes de poder analizar o aplicar la muestra.

Por ello se optó por realizar la extracción por tope. En este caso, luego de la última medición, se incrementa la presión de la celda hasta valores de solubilidad total (hasta 200 bar), con lo cual el refinado es extraido a través de la válvula de expansión. Se

continúa su extracción hasta que no se observan más indicios de condensación en el tubo colector. Entonces se despresuriza la celda como en el caso anterior.

Se comprobó que con este método el residuo de aceite en la columna es mínimo, quedando el relleno prácticamente limpio. La principal desventaja de esta metodología es que se producen frecuentes obturaciones totales o parciales de la válvula de expansión debido a la presencia de cantidades significativas de líquido, lo cual se logró minimizar con una adecuada calefacción de dicha válvula y/o aumentando el caudal.

iv) Procedimiento de descarga y limpieza

Al finalizar las mediciones, se apaga la calefacción y se despresuriza lentamente la columna. Cuando se ha despresurizado completamente el sistema, se abren los extremos superior e inferior de la celda y se extrae de la línea.

Se quitan los extremos de algodón y se retira el relleno. Se lava la celda con acetona y se seca con aire comprimido para eliminar restos de aceite, solvente o humedad. El relleno se lava varias veces con solvente (acetona, hexano o alcohol) y posteriormente se seca en estufa a 180ºC durante 24 horas, para eliminar todo resto de sustancias volátiles antes de su reutilización.

La limpieza del equipo y las líneas se realiza con alcohol y/o acetona, secando posteriormente los restos de solvente con una corriente de aire comprimido.

4.2.3. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras obtenidas en los distintos ensayos se realizó mediante **cromatografía de gases.** Se utilizó un cromatógrafo Varian CX 3400 con detector de ionización de llama (GC–FID) instalado en PLAPIQUI. Las características del equipo y los parámetros del programa utilizado se resumen en la Tabla 4.4.

Los datos fueron procesados mediante el programa informático Galaxie, previa adquisición y digitalización con un módulo Varian MIB 850.

Los perfiles obtenidos para cada muestra fueron comparados con los perfiles obtenidos para los aceites originales (caracterizados por GC–MS, ver Sección 4.3).

Tabla 4.4. Parámetros de operación de GC-FID.

Columna	
Tipo	Capilar Agilent DB5-HT
Longitud	15 m
Diámetro interno	320 μm
Espesor de film	0.10 μm
Parámetros de operación	
Gas carrier	Hidrógeno
Caudal H_2	1 ml/min
Relación de split	100 : 1
T inyector	220ºC
T horno	35ºC (4 min) - 8ºC/min - 240ºC
T detector	270ºC
Dilución	2% en hexane
Inyección	1 μl

Para la cuantificación de los compuestos individuales se asumió que la relación entre el área de cada pico y el área total del cromatograma (sin contar el pico correspondiente al solvente) es igual a la fracción en peso del compuesto correspondiente en el aceite. Esta técnica, que no requiere de estándares internos ni curvas de calibración, permite obtener la relación cuantitativa entre los distintos componentes de la mezcla [40]. Se asume que los factores de respuesta de los distintos componentes terpénicos de la mezcla son semejantes, práctica usual en el análisis de aceites esenciales [41].

4.2.4. Puesta a punto y validación del equipo experimental

A continuación se comentan algunos aspectos de diseño que se plantearon durante la construcción y puesta a punto del equipo, que pueden resultar de interés y utilidad para otros casos similares o para eventuales mejoras.

i) Control de temperatura y presión:

En primer lugar, era importante asegurar que la temperatura de la cámara fuera adecuadamente controlada y que no se generaran gradientes térmicos dentro de la misma. Esto se consiguió con un ventilador y deflectores convenientemente ubicados dentro de la cámara. Se chequeó la homogeneidad de la temperatura colocando una termocupla adicional en la línea más cercana a la resistencia calefactora, verificándose que la

diferencia de medida entre dicha termocupla y la del controlador (ubicada en las proximidades del serpentín de precalentamiento) no superaba nunca los 2ºC.
Por otra parte, dado que no se medía la temperatura del fluido en forma directa sino la del aire circundante de la cámara, era importante tener la certeza de que ambos se encontraran en equilibrio térmico. Para verificar esto se realizaron ensayos midiendo en forma directa la temperatura del flujo en la línea de salida de la celda con una termocupla adicional. Se corroboró que ambas temperaturas coincidían.
También se verificó que no se produjeran diferencias de presión en el sistema, ya que el lecho poroso podía generar caídas de presión a lo largo de la columna. Se colocó un segundo manómetro antes de la válvula de expansión, comparándose su lectura con la del primer manómetro ubicado antes de la columna. Se ensayaron distintos caudales (0.1–1.0 g/min) y la diferencia de lecturas no superó nunca los 2 bar, correspondiente al error inherente a los manómetros utilizados (2% del fondo de escala).

ii) Sistema de condensación del extracto

Luego de ensayar colectores de distinta forma, se optó por utilizar los tubos en U descriptos previamente debido a que presentan varias ventajas operativas:

- ✓ Ofrecen un recorrido suficientemente largo al gas de salida para permitir su condensación.
- ✓ Permiten un buen intercambio térmico con el fluido refrigerante, al tener una alta relación área/volumen.
- ✓ Facilitan la recuperación de solutos, que se acumulan en el fondo.
- ✓ Permiten utilizar una mínima cantidad de solvente para diluir los solutos condensados, recuperarlos y lavar las paredes del tubo.

El agregado de lana de bronce y lana de vidrio en la rama de mayor diámetro proporcionan una mayor superficie de contacto para la condensación del extracto.
La ***temperatura del baño refrigerante*** es otro aspecto importante a considerar. Para asegurar una condensación cuantitativa del extracto y evitar la pérdida de los componentes más volátiles, la temperatura debe ser tal que la presión de vapor del componente más volátil a dicha temperatura sea inferior en varios órdenes de magnitud a la concentración de dicho componente en el flujo de salida. De otro modo, una parte significativa de dicho componente (o todo) no condensará en el tubo colector. Se tomó

como referencia la presión de vapor de limoneno [42], un compuesto de la fracción más volátil, a bajas temperaturas, según se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Presión de vapor de limoneno a baja temperatura [42]

T (ºC)	P^{sat} (bar)
0	3.7×10^{-4}
-10	1.5×10^{-4}
-30	2.2×10^{-5}
-40	7.3×10^{-6}
-50	2.2×10^{-6}

Puesto que la solubilidad de monoterpenos hidrocarbonados en CO_2 supercrítico es del orden de 10^{-3} (en fracción molar, de acuerdo a lo relevado en la literatura, y corroborado en los ensayos de esta tesis), una temperatura del colector de –30ºC implica que habrá una pérdida de volátiles del 2% aproximadamente, asumiendo que se verifica la ley de Raoult:

$$y_2 P = x_2 P_2^{sat}$$

en donde y_2 es la concentración (residual) de soluto en la fase gaseosa, x_2 es la composición del soluto condensado (prácticamente igual a 1), P es la presión del colector (1 bar) y P_2^{sat} la presión de vapor del soluto a la temperatura del colector.

Para trabajar con mayor seguridad y compensar limitaciones en la transferencia térmica se decidió trabajar con un baño refrigerante a –50ºC. Para alcanzar dicha temperatura se utilizó etanol comercial (95% v/v) enfriado mediante un criostato.

iii) Validación del equipo

Se validó el procedimiento experimental reproduciendo el fraccionamiento de aceite esencial de limón con CO_2, un sistema que ya ha sido previamente estudiado y del cual existe suficiente información en literatura para permitir su comparación.

Para ello, se utilizó una muestra de aceite de limón obtenido por prensado en frío, cuya composición (determinada por GC–MS) se indica en la Tabla 4.6.

Se determinó la solubilidad en fase supercrítica y la distribución de los principales componentes del aceite a distintas condiciones de presión y a temperatura constante (40ºC), siguiendo el procedimiento descripto. Los resultados de solubilidad global se muestran en la Figura 4.10, junto con datos obtenidos por otros autores en condiciones

similares (utilizando aceite natural de limón o limoneno puro, principal componente del aceite). En la Figura 4.10(a) se muestran los resultados en función de la presión, mientras que en la Figura 4.10(b) se muestran los mismos datos pero en función de la densidad del solvente puro y en escala logarítmica, observándose la relación lineal característica.

Tabla 4.6. Composición de aceite de limón (n.i. = no identificado)

COMPONENTE	**%**
Monoterpenos hidrocarbonados	
α-pineno	2.28
β-pineno	15.55
β-mirceno	1.58
d-limoneno	68.27
α-terpineno	8.33
terpinoleno	0.36
TOTAL MT	**96.35**
Monoterpenos oxigenados	
β-citral (neral)	0.79
α-citral (geranial)	1.31
cis-geraniol	0.36
TOTAL OT	**2.47**
Sesquiterpenos	
α-cariofileno	0.15
n.i.	0.23
n.i.	0.32
β-bisaboleno	0.48
TOTAL ST	**1.18**

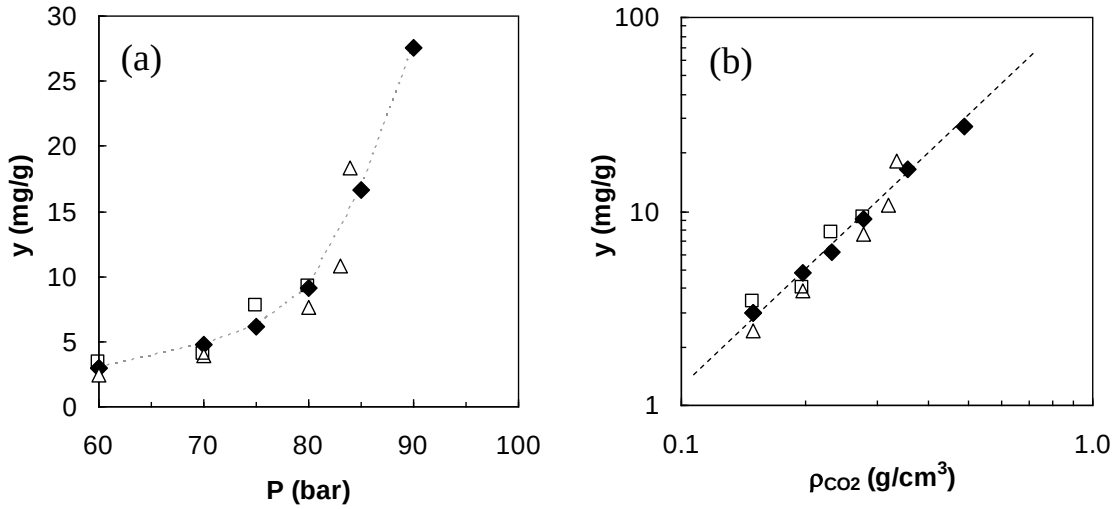


Figura 4.10. Solubilidad global de aceite de limón en CO_2 supercrítico a T=40ºC (a) en función de la presión, (b) en función de la densidad de CO_2 puro. (◆) esta tesis, (□) limoneno, Iwai y col. [43], (△) limoneno, Di Giacomo y col. [21], (---) líneas de tendencia.

La Figura 4.11 muestra los resultados del fraccionamiento, es decir, la distribución de componentes en la fase liviana o supercrítica. Se observa que la fracción de MT aumenta en la fase liviana con respecto a la composición propia del aceite, resultando en un efecto de fraccionamiento efectivo y comparable al reportado por otros autores [44][45].

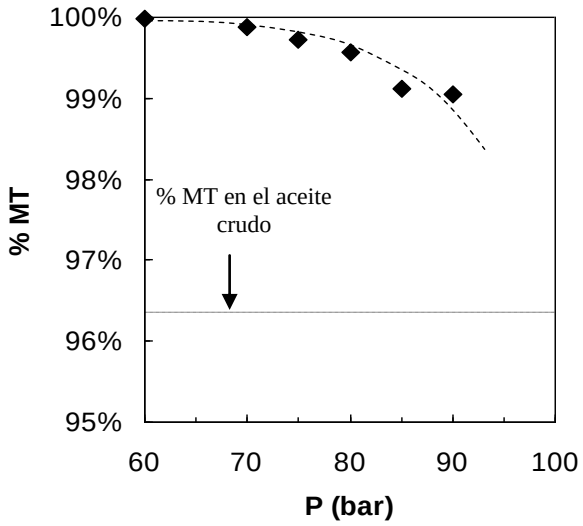


Figura 4.11. Fraccionamiento de aceite de limón. Composición de la fase supercrítica a T=40ºC. (◆) resultados experimentales, (---) línea de tendencia.

4.3. Materiales

4.3.1. Obtención de los aceites esenciales

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron preliminarmente tres aceites esenciales de especies vegetales abundantes en la región como fuente de compuestos y/o fracciones de actividad biocida: *Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* (salvia) y *Mentha piperita* (menta).

El aceite de *T. minuta* fue obtenido por destilación de arrastre con vapor en la Universidad Nacional de Córdoba, a partir de material fresco (hojas, tallos y flores) proveniente de las Sierras de Córdoba (Argentina). Fue suministrado por el Dr. Julio Zygadlo.

Los aceites de salvia y de menta fueron obtenidos por destilación de arrastre con vapor de agua en PLAPIQUI, a partir de material vegetal fresco (hojas y tallos) proveniente de

plantaciones de Sierra de la Ventana (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Su extracción fue realizada en setiembre de 2009 como parte de esta tesis.

El equipo utilizado en dicha extracción es un extractor de arrastre con vapor (Figmay S.R.L., Córdoba, Argentina), construido en vidrio borosilicato y para uso de laboratorio. Está compuesto de: (a) un balón evaporador, (b) una cámara de extracción, (c) un condensador de vapores y (d) un recipiente colector.

El ***balón evaporador o caldera*** es un recipiente alargado, dispuesto horizontalmente en la base del destilador, con capacidad para 12 litros de agua. El agua es calentada eléctricamente mediante una resistencia de cuarzo y llevada a ebullición. Mediante un regulador de potencia puede variarse la velocidad de generación de vapor. Un sistema de circulación de agua fría mantiene el nivel en el evaporador y alimenta el condensador. Puede verse un esquema de esta sección en la Figura 4.11.

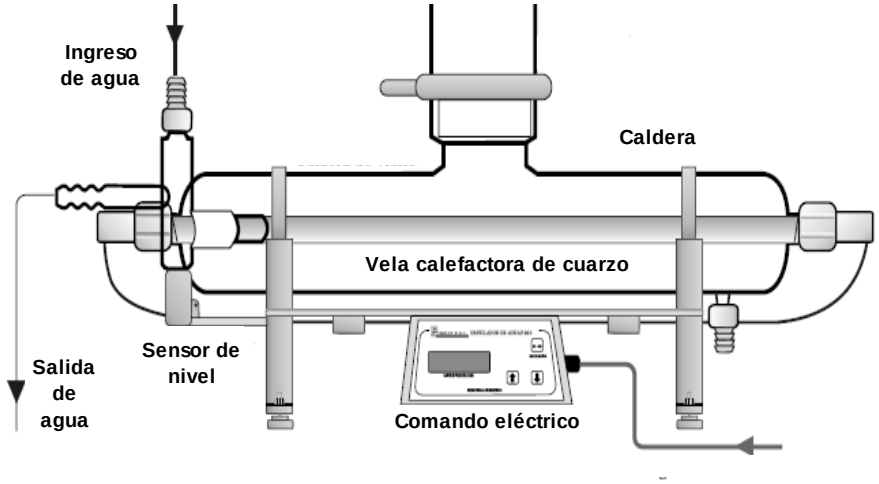


Figura 4.11. Extractor de arrastre con vapor. Caldera.

El vapor asciende inmediatamente a la ***cámara de extracción***, que es una columna vertical que comprende gran parte del volumen del equipo. Por su parte inferior se conecta al balón evaporador y por su parte superior tiene una tapa de vidrio con brida de aluminio para carga y descarga. En dicha cámara se coloca el material vegetal en canastos superpuestos de malla metálica. De acuerdo al grado de disgregación y compactación del vegetal, la capacidad de la columna varía entre 0.5 y 2 kg de material. Los canastos son llenados fuera de la columna y luego se colocan apilados en su interior desde la parte superior. Al pasar por el lecho, el vapor calienta el material vegetal, con lo cual se vaporizan los componentes más volátiles del tejido (aceite esencial). El aceite llega a la

parte superior de la columna en parte como vapor y en parte disuelto en las diminutas gotas de vapor de agua.

Los vapores luego pasan por el ***condensador***. Consiste éste en un tubo descendente en forma de serpentín, rodeado por una camisa por la cual circula agua de refrigeración. Allí se produce la condensación de los vapores de agua y de aceite esencial, que son recolectados en un ***recipiente colector*** a la salida del condensador. En el colector se produce la separación de la fase aceite y de la fase acuosa. De acuerdo a sus densidades relativas, el aceite se acumula en la parte superior o en la inferior. Un sistema de robinetes permite retirar en forma continua el exceso de agua, que se acumula en mayor cantidad. Un esquema de esta sección se muestra en la Figura 4.12.

La operación de extracción puede durar varias horas, dependiendo de la velocidad de generación de vapor, la carga de material a extraer, la cantidad de aceite presente en el material a extraer y el grado de agotamiento que se desee.

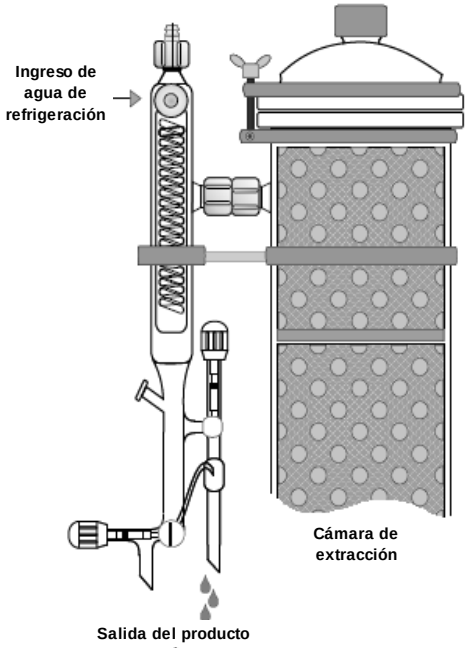
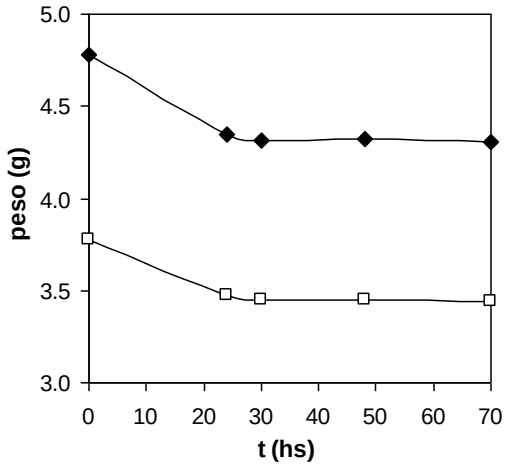


Figura 4.12. Extractor de arrastre con vapor. Condensador y sistema de recolección de producto.

Antes de realizar la extracción de los aceites, se determinó el contenido de volátiles extraíbles a 100ºC presentes en el material vegetal, constituidos principalmente por la fracción terpénica (aceite esencial) y la humedad no ligada propia de los tejidos. Para ello se colocaron muestras finamente divididas de ambas plantas en una estufa a 105ºC y

presión atmosférica, y se monitoreó periódicamente la disminución de su peso hasta obtener un valor constante. La Figura 4.13 muestra los resultados obtenidos.



Especie	% de volátiles
Salvia	8.79
Menta	9.85

Figura 4.13. Evolución del peso en estufa a 105ºC. (□) salvia, (◆) menta.

Para la obtención de los aceites de salvia y menta usados esta tesis, se cargó el destilador con el material vegetal triturado manualmente. En cada caso, se realizó la extracción por un lapso de 3 horas, luego del cual se interrumpió la generación de vapor y se dejó decantar el aceite por un período de 12 horas, suficiente para lograr una buena separación entre la fase oleosa y la fase acuosa en el recipiente colector. Los aceites fueron recogidos en frascos de vidrio color caramelo y almacenados en freezer a –20ºC.

La Tabla 4.7 muestra las cantidades de material vegetal utilizado y los rendimientos de aceite esencial obtenidos en cada caso. La diferencia entre el porcentaje de volátiles y el rendimiento de aceite esencial puede considerarse como una medida del porcentaje de humedad evaporable a 100ºC presente en el material vegetal.

Tabla 4.7. Rendimiento de extracción por especie

Especie	***Material cargado (g)***	***Aceite extraido (g)***	***Rendimiento (% p/p)***
Salvia	800	9.84	1.23
Menta	900	9.07	1.01

4.3.2. Caracterización de los aceites esenciales

La Tabla 4.8 muestra el peso específico y las características de color y aspecto de los aceites usados en esta tesis.

Tabla 4.8. Características de los aceites estudiados.

Característica	***T. minuta***	***S. officinalis***	***M. piperita***
Peso específico (g/cm^3)	0.880 ± 0.001	0.926 ± 0.001	0.950 ± 0.001
Color	amarillo-anaranjado intenso	ligeramente verdoso	incoloro
Aspecto	viscoso turbio en frío	fluido transparente	viscoso transparente

El **peso específico** se determinó pesando un volumen preciso de aceite medido cuidadosamente a 25ºC en una balanza analítica (d=0.001 g).

La **composición** de los tres aceites se determinó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC–MS). Se utilizó un cromatógrafo Perkin–Elmer instalado en PLAPIQUI, provisto de una columna capilar Elite–5MS (longitud: 60 m, diámetro interno: 250 μm, espesor de film: 0.25 μm). El volumen de muestra inyectado fue de 1 μl, diluido al 2% en hexano. Se operó con una relación de split de 100:1, con nitrógeno como gas carrier a un caudal de 1 ml/min. La temperatura del inyector se fijó en 220ºC y la del detector en 270ºC. El programa de temperatura utilizado en el horno fue: 70ºC inicial, rampa de 4ºC/min hasta 240ºC y mantenimiento a 240ºC por 4.5 min.

Los picos fueron identificados utilizando la biblioteca de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST). En caso de no estar disponibles en dicha biblioteca, se realizó la comparación con espectros obtenidos de otras fuentes (Pherobase, MassBank, etc.). Los espectros de algunos compuestos del aceite de *T. minuta*, fueron suministrados por el Dr. Julio Zygadlo.

En las Tablas 4.9(a–c) se muestra la composición de los tres aceites. Se agrupan sus componentes en fracciones. Para el aceite de salvia se identificaron tres grupos: monoterpenos hidrocarbonados (MT), monoterpenos oxigenados (OT) y sesquiterpenos (ST). Para el aceite de *T. minuta* se identificó un grupo de MT y otro de OT. Finalmente,

en el caso del aceite de menta, constituido casi totalmente por compuestos oxigenados, se identificó una fracción de mayor volatilidad (F1) y otra de menor volatilidad (F2).
La Figura 4.14 muestra los perfiles cromatográficos de los aceites con la identificación de los principales picos.
Como puede comprobarse, los aceites utilizados presentan perfiles de composición típicos de su especie, con presencia de los principales componentes característicos (ver Capítulo 1).

4.3.3. Otros materiales

Para los ensayos y mediciones realizadas en esta tesis se utilizó dióxido de carbono industrial extra-seco (humedad especificada menor a 10 ppm v/v) suministrado por Linde Argentina.
En las determinaciones por cromatografía gaseosa (GC–MS y GC–FID) se utilizó nitrógeno e hidrógeno de grado cromatográfico suministrados por Air Liquide, respectivamente.
Para la dilución de las muestras y fracciones de aceite esencial y su análisis cromatográfico se utilizó como solvente *n*-hexano grado cromatográfico suministrado por Aberkon Química.
Para el lavado del material de vidrio, el extractor supercrítico, el relleno de columna y las líneas se utilizó acetona y/o etanol comercial (96% v/v).

Tabla 4.9 (a)
Composición del aceite de *T. minuta*

COMPONENTE	**%**
Monoterpenos hidrocarbonados	
β-pineno	1.33
d-limoneno	7.01
E-ocimeno	25.97
otros (<1%)	0.8
TOTAL MT	**35.11**
Monoterpenos oxigenados	
dihidrotagetona	1.72
E-tagetona	2.25
Z-tagetona	2.33
Z-ocimenona	11.2
E-ocimenona	44.13
otros (<1%)	3.27
TOTAL OT	**64.9**

Tabla 4.9 (b)
Composición del aceite de *M. piperita*

COMPONENTE	**%**
Fracción F1	
β-pineno	1.01
β-terpinil acetato	2.57
1,8-cineol	3.61
mentofurano	1.3
isomentona	11.79
TOTAL F1	**20.27**
Fracción F2	
isomentol	4.18
l-(-)-mentol	26.51
mentil acetato	1.95
isomentil acetato	44.36
mentil acetato	1.68
β-cariofileno	1.05
TOTAL F2	**79.73**

Tabla 4.9 (c)
Composición del aceite de *S. officinalis*

COMPONENTE	**%**
Monoterpenos hidrocarbonados	
α-pineno	8.71
Canfeno	5.54
β-pineno	1.59
Mirceno	1.3
otros (<1%)	0.95
TOTAL MT	**18.09**
Monoterpenos oxigenados	
1,8-cineol	5.27
α-tuyona	36.31
β-tuyona	7.61
Alcanfor	14.66
otros (<1%)	5.47
TOTAL OT	**69.32**
Sesquiterpenos	
α-cariofileno	4.04
β-cariofileno	4.18
Gurjuneno	3.29
otros (<1%)	1.07
TOTAL ST	**12.58**

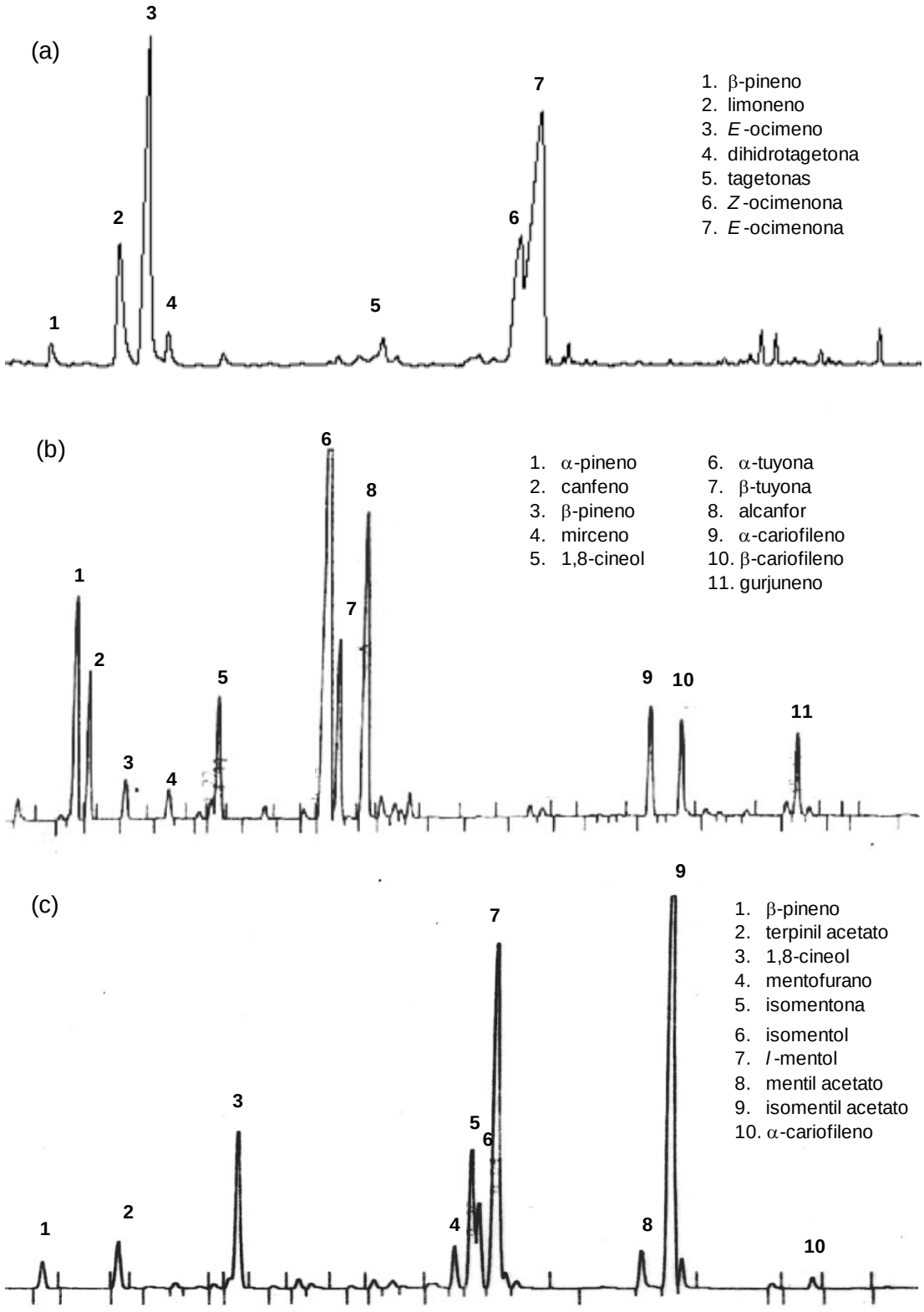


Figura 4.14. Perfiles cromatográficos de los aceites seleccionados y principales picos identificados: (a*) Tagetes minuta*, (b) *Salvia officinalis*, (c) *Mentha piperita*

4.4. Conclusiones

En este capítulo se revisaron los distintos métodos experimentales para medir el equilibrio de fases a alta presión, indicándose sus ventajas y desventajas y los criterios para decidir el método más adecuado para cada situación particular.

En esta tesis, se seleccionó un método *dinámico semicontinuo*, con el que es posible obtener información sobre el proceso de fraccionamiento en condiciones de flujo, además de datos de equilibrio para sistemas multicomponente, con relativa rapidez. Se construyó un equipo a escala de laboratorio, teniendo en cuenta dispositivos similares reportados por otros autores y experiencias del propio grupo, diseñándose y validándose un procedimiento experimental. Se obtuvieron los aceites esenciales mediante destilación de arrastre con vapor y se determinó su composición por cromatografía de gases, identificándose sus principales fracciones de componentes (MT, OT y ST).

Los experimentos de solubilidad global, distribución de componentes y fraccionamiento semicontinuo darán información sobre el equilibrio de fases y permitirán ajustar un modelo termodinámico, que a su vez se utilizará para explorar más profundamente el comportamiento de los sistemas en estudio y buscar las mejores condiciones de operación para su fraccionamiento.

Los detalles del modelado termodinámico de los sistemas CO_2 + aceite esencial se verán en el siguiente capítulo. Se discutirán brevemente los principales enfoques del modelado del equilibrio de fases y los conceptos que han permitido ampliar la descripción a sistemas de mayor asimetría y complejidad. Se proporcionará una descripción básica del modelo seleccionado (la *ecuación de estado a contribución grupal* o GC-EOS), verificándose la correcta descripción del comportamiento de fases de sistemas y subsistemas relacionados. Posteriormente, en el capítulo 6, se presentarán los resultados experimentales de esta tesis, comparativamente con las predicciones del modelo.

REFERENCIAS

[1] Brunner, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes*. Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1994.

[2] Gupta, R.B., Shim, J.J. *Solubility in supercritical carbon dioxide*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007.

[3] Fornari, R.E., Alessi, P., Kikic, I. *High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1978-1987).* Fluid Phase Equilibria 57 (1990) 1-33.

[4] Dohrn, R., Brunner, G. *High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1988-1993).* Fluid Phase Equilibria 106 (1995) 213-282.

[5] Christov, M., Dohrn, R. *High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1994-1999).* Fluid Phase Equilibria 202 (2002) 153-218.

[6] Dohrn, R., Peper, S., Fonseca, J. *High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (2000-2004).* Fluid Phase Equilibria 288 (2010) 1-54.

[7] Fonseca, J., Dohrn, R., Peper, S. *High-pressure fluid-phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (2005-2008).* Fluid Phase Equilibria 300 (2011) 1-69.

[8] Matos, H.A., Gomes de Acevedo, E. *Phase equilibria of natural flavours and supercritical solvents.* Fluid Phase Equilibria 52 (1989) 357-364.

[9] Pavlicek, J., Richter, M. *High pressure vapor-liquid equilibrium in the carbon dioxide + α-pinene system.* Fluid Phase Equilibria 90 (1993) 125-133.

[10] Matos, H.A., Costa, M.A., Gomes de Acevedo, E. *Ternary phase equilibria of ethene + cineol + limonene at 288 and 298 K and pressures to 7 MPa*. J. of Supercritical Fluids 7 (1994) 101-106.

[11] Akgun, M., Akgun, N.A., Dincer, S. *Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide.* J. of Supercritical Fluids 15 (1999) 117-125.

[12] Budich, M., Brunner, G. *Vapor–liquid equilibrium data and flooding point measurements of the mixture carbon dioxide + orange peel oil.* Fluid Phase Equilibria 158–160 (1999) 759–773.

[13] Benvenuti, F., Gironi, F. *High-pressure equilibrium data in systems containing supercritical carbon dioxide, limonene and citral*. J. of Chemistry and Engineering Data 46 (2001) 795-799.

[14] Drescher, M., Seidel, O., Geana, D. *High-pressure vapor-liquid equilibria in the ternary system orange peel oil (limonene) + ethanol + carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 23 (2002) 103-111.

[15] Bogel-Lukasik, E., Szudarska, A., Bogel-Lukasik, R., Nunes da Ponte, M. *Vapour–liquid equilibrium for beta-myrcene and carbon dioxide and/or hydrogen and the volume expansion of beta-myrcene or limonene in CO_2 at 323.15K*. Fluid Phase Equilibria 282 (2009) 25–30.

[16] Gironi, F., Maschietti, M. *High-pressure gas–liquid equilibrium measurements by means of a double-chamber recirculation apparatus. Data on the system carbon dioxide–limonene at 50 and 70ºC*. J. of Supercritical Fluids 55 (2010) 49–55.

[17] Gironi, F., Maschietti, M. *High-pressure gas–liquid equilibrium of the system carbon dioxide–citral at 50 and 70ºC*. J. of Supercritical Fluids 57 (2011) 25–30.

[18] Maschietti, M. *High-pressure gas–liquid equilibrium of the system carbon dioxide–β-caryophyllene at 50 and 70 ºC*. J. of Supercritical Fluids 59 (2011) 8–13.

[19] Gironi, F., Maschietti, M. *Phase equilibrium of the system supercritical carbon dioxide–lemon essential oil: New experimental data and thermodynamic modelling*. J. of Supercritical Fluids 70 (2012) 8–16.

[20] Temelli, F., Chen, C.S., Braddock, R.J. *Supercritical fluid extraction in citrus oil processing.* Food Technology (1988) 145-150.

[21] Di Giacomo, D., Brandani, V., Del Re, G., Mucciante, V. *Solubility of essential oil components in compressed supercritical carbon dioxide.* Fluid Phase Equilibria 52 (1989) 405-411.

[22] Richter, M., Sovová, H. *The solubility of two monoterpenes in supercritical carbon dioxide.* Fluid Phase Equilibria 85 (1993) 285-300.

[23] Sovová, H., Jez, J. *Solubility of menthol in supercritical carbon dioxide.* J. of Chemistry and Engineering Data 39 (1994) 840-841.

[24] Mukhopadhyay, M., De, S.K. *Fluid phase behavior of close molecular weight fine chemicals with supercritical carbon dioxide.* J. of Chemistry and Engineering Data 40 (1995) 909-913.

[25] Kim, K.H., Hong, J. *Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide.* Fluid Phase Equilibria 164 (1999) 107-115.

[26] Berna, A., Cháfer, A., Montón, J.B. *Solubilities of essential oil components of orange in supercritical carbon dioxide.* J. of Chemistry and Engineering Data 45 (2000) 724-727.

[27] Gamse, T., Marr, R. *High-pressure phase equilibria of the binary systems carvone-carbon dioxide and limonene-carbon dioxide at 30, 40 and 50ºC.* Fluid Phase Equilibria 171 (2000) 165-174.

[28] Francisco, J.C., Sivik, B. *Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 23 (2002) 11–19.

[29] Gomes de Acevedo, E., Matos, H.A., Nunes da Ponte, M. *Phase equilibria of ethene + limonene and ethene + cineol from 285 to 308 K and pressures to 8 MPa.* Fluid Phase Equilibria 83 (1993) 193-202.

[30] Tufeu, R., Subra, P., Plateaux, C. *Contribution to the experimental determination of the phase diagrams of some (carbon dioxide + terpene) mixtures.* J. of Chemical Thermodynamics 25 (1993) 1219-1228.

[31] Costa, M.A.M., Matos, H.A.S., Nunes da Ponte, M., Gomes de Acevedo, E.J.S. *Binary and ternary phase behavior of α-pinene, β-pinene and supercritical ethene.* J. of Chemical & Engineering Data 41 (1996) 1104-1110.

[32] De la Fuente, J.C., Bottini, S.B. *High-pressure phase equilibria and thermodynamic modelling for the binary systems CO_2+lemon oil and C_2H_6+lemon oil.* Fluid Phase Equilibria 175 (2000) 45-52.

[33] Raeissi, S., Peters, C.J. *Phase behaviour of the binary system ethane + limonene*. J. of Supercritical Fluids 22 (2002) 93-102.

[34] Franceschi, E., Grings, M.B., Frizzo, C.D., Oliveira, J.V., Dariva, C. *Phase behavior of lemon and bergamot peel oils in supercritical CO_2.* Fluid Phase Equilibria 226 (2004) 1–8.

[35] Souza, A.T., Corazza, M.L., Cardozo-Filho, L., Guirardello, R., Meireles, M.A.A. *Phase equilibrium measurements for the system clove (Eugenia caryophyllus) oil + CO_2.* J. of Chemical & Engineering Data 49 (2004) 352-356.

[36] Raeissi, S., Peters, C.J. *Experimental determination of high-pressure phase equilibria of the ternary system carbon dioxide + limonene + linalool*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 10-17.

[37] Carvalho Jr., R.N., Corazza, M.L., Cardozo-Filho, L., Meireles, M.A.A. *Phase equilibrium for (camphor + CO_2), (camphor + propane), and (camphor + CO_2 + propane).* J. of Chemical & Engineering Data 51 (2006) 997-1000.

[38] Sovová, H., Stateva, R.P., Galushko, A.A. *High-pressure equilibrium of menthol + CO_2.* J. of Supercritical Fluids 41 (2007) 1–9.

[39] Michielin, E.M.Z., Rosso, S.R., Franceschi, E., Borges, G.R., Corazza, M.L., Oliveira, V., Ferreira, S.R.S. *High-pressure phase equilibrium data for systems with carbon dioxide, α-humulene and trans-caryophyllene*. J. of Chemical Thermodynamics 41 (2009) 130–137.

[40] Cicchetti, E., Merle, P., Chaintreau, A. *Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database.* Flavour and Fragrance Journal 23 (2008) 450-459.

[41] Chamorro, E.R., Zambón, S.N., Morales, W.G., Sequeira, A.F., Velasco, G.A. *Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography*. In: Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications, Dr. Bekir Salih (Ed.), InTech, 2012.

[42] Base de datos TERMOINT.

[43] Iwai, Y., Morotomi, T., Koga, Y., Sacamoto, K., Arai, Y. *High-pressure vapor-liquid equilibria for carbon dioxide + limonene*. J. of Chemical & Engineering Data 41 (1996) 951-952.

[44] Benvenuti, F., Gironi, F., Lamberti, L. *Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process*. J. of Supercritical Fluids 20 (2001) 29–44.

[45] Gironi, F., Maschietti, M. *Supercritical carbon dioxide fractionation of lemon oil by means of a batch process with an external reflux*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 227–234.

5. Modelado termodinámico del equilibrio entre fases

> La historia de la ciencia moderna ha demostrado repetidamente que, con frecuencia, se puede conseguir más fácilmente una descripción cuantitativa de la naturaleza idealizando previamente los fenómenos naturales, es decir, estableciendo un modelo simplificado, sea físico o matemático, que describa a grandes rasgos el comportamiento esencial aunque se desprecien detalles (...) El comportamiento de la naturaleza se relaciona con el modelo idealizado con varios términos correctores que pueden ser interpretados físicamente y que, a veces, pueden ser relacionados cuantitativamente con esos detalles de la naturaleza que fueron despreciados en el proceso de idealización.
>
> J.M. PRAUSNITZ, R.N. LICHTENTHALER, E. GOMES DE ACEVEDO
> *Termodinámica molecular de los equilibrios de fases*

5.1. Modelado del equilibrio entre fases a alta presión

5.1.1. Aspectos generales

Se presentarán a continuación y brevemente los aspectos teóricos básicos del equilibrio entre fases, especialmente en las condiciones de alta presión asociadas al fraccionamiento supercrítico.

Un sistema de *N* componentes se encuentra en equilibrio cuando no tiene tendencia a alejarse en forma espontánea de su estado actual. De acuerdo a la segunda ley de la termodinámica, la energía libre de Gibbs del sistema (*G*) será mínima en el equilibrio, es decir:

$$dG_{T,P} = \left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{P,n} dT + \left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_{T,n} dP + \sum_{i=1}^{N} \left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_{j\neq i}} dn_i = 0$$

De acuerdo a las relaciones termodinámicas fundamentales y definiendo el *potencial químico* del componente *"i"* (μ_i) como la energía de Gibbs molar parcial de *"i"* a la temperatura y presión del sistema:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_{P,n} = -S \qquad \left(\frac{\partial G}{\partial P}\right)_{T,n} = V \qquad \left(\frac{\partial G}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_{j\neq i}} = \mu_i$$

la ecuación resultante adquiere la siguiente forma:

$$dG_{T,P} = SdT + VdP + \sum_{i=1}^{N} \mu_i dn_i = 0$$

ecuación que establece restricciones a las variaciones simultáneas de presión, temperatura y composición del sistema. Para un sistema de *N* componentes con π fases en equilibrio, pueden derivarse las siguientes condiciones:

$$P^{\alpha} = P^{\beta} = ... = P^{\pi}$$
$$T^{\alpha} = T^{\beta} = ... = T^{\pi}$$
$$\mu_i^{\alpha} = \mu_i^{\beta} = ... = \mu_i^{\pi} \qquad \text{para } i = 1 \ldots N$$

Es decir: *en un sistema en equilibrio la presión, la temperatura y el potencial químico de cada componente deben ser idénticos en todas las fases presentes.*

A partir de las ecuaciones precedentes, es posible derivar un criterio para saber cuántas variables independientes o grados de libertad (*F*) tiene un sistema. Si el número de componentes es *N* y el número de fases es π (y si no existen otras restricciones, como azeótropos) la denominada ***regla de las fases*** establece que:

$$F = N - \pi + 2$$

El cálculo y predicción del equilibrios de fases implica resolver la ecuación de Gibbs-Duhem. Para ello es preciso relacionar los potenciales químicos de los componentes con propiedades macroscópicas del sistema, más fácilmente mensurables. Esto ha llevado a definir funciones "intermedias", como la *fugacidad* y la *actividad*. Ambas funciones cuantifican el alejamiento del sistema real con respecto a algún estado ideal y de comportamiento conocido, tomado como referencia: el gas ideal (fugacidad) o una solución ideal (actividad).

La ***fugacidad*** de una sustancia o mezcla fluida equivale a una "presión corregida" con respecto al comportamiento de un gas ideal. En el límite de baja densidad, cuando el comportamiento del sistema tiende al de un gas ideal, la fugacidad tiende a la presión (y la fugacidad de cada componente tiende a su presión parcial):

$$f_i \to y_i P \qquad \text{cuando} \qquad P \to 0$$

La fugacidad de una sustancia pura a temperatura constante se relaciona con la energía libre de Gibbs del sistema de acuerdo a la siguiente expresión:

$$dG = RTd \ln f$$

De manera análoga, en una mezcla la fugacidad de un componente *"i"* en una fase α se relaciona con el potencial químico respectivo del siguiente modo:

$$d\mu_i^{\alpha} = RTd \ln \hat{f}_i^{\alpha}$$

El símbolo ˆ indica que se trata de la fugacidad de un componente en una mezcla.
Esta relación permite expresar el criterio de igualdad de potenciales químicos como una igualdad de fugacidades (*criterio de isofugacidad*). Por lo tanto, un sistema de *N* componentes cuyas π fases están a la misma temperatura y presión estará en equilibrio cuando la fugacidad de cada componente sea la misma en todas las fases:

$$\hat{f}_i^{\alpha} = \hat{f}_i^{\beta} = ... = \hat{f}_i^{\pi} \qquad \text{para } i = 1 \ldots N$$

Como se ha visto, en el caso del fraccionamiento supercrítico los componentes del sistema generalmente se distribuyen entre dos fases en equilibrio: una fase líquida (más densa) y una fase vapor o supercrítica (más liviana). El criterio de isofugacidad se expresa entonces como:

$$\hat{f}_i^{V} = \hat{f}_i^{L} \qquad \text{para } i = 1 \ldots N$$

Esta expresión es el punto de partida utilizado para el cálculo de equilibrio de fases en los procesos de separación con fluidos supercríticos. El problema consiste ahora en calcular

las fugacidades de las fases a partir de las variables independientes del sistema (presión, temperatura y composición).
Existen dos grandes métodos para el cálculo de las fugacidades:

- las ecuaciones de estado (*enfoque fi-fi*)
- los modelos de energía de Gibbs de exceso (*enfoque gama-fi*).

a) Ecuaciones de estado (enfoque *fi-fi*):

En este enfoque, las fugacidades en ambas fases se calculan de manera similar, utilizando *coeficientes de fugacidad* (ϕ):

$$\hat{f}_i^V = \phi_i^V y_i P \qquad\qquad \hat{f}_i^L = \phi_i^L x_i P$$

En el equilibrio se cumple:

$$\phi_i^V y_i = \phi_i^L x_i \qquad \text{(criterio de isofugacidad)}$$

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{\phi_i^L}{\phi_i^V} \qquad \text{(coeficiente de distribución)}$$

En estas expresiones, es el coeficiente de fugacidad el que cuantifica la no-idealidad de la fase con respecto al gas ideal. Cuando el sistema es ideal, ϕ_i es igual a 1 y la fugacidad es igual a la presión parcial.
Los coeficientes de fugacidad en ambas fases se computan a partir de una ***ecuación de estado*** (EOS), es decir, una expresión matemática que relaciona las propiedades volumétricas del sistema. Las expresiones de mayor utilidad son las que expresan el volumen en función de la presión y la temperatura o la presión en función del volumen y la temperatura. El coeficiente de fugacidad se calcula a partir de alguna de las siguientes integrales, según la EOS utilizada sea explícita en volumen o en presión:

$$RT \ln \phi_i = \int_0^P \left(\bar{v}_i - \frac{RT}{P} \right) dP \qquad \text{para} \quad V = V(T, P, n_1, n_2 ...)$$

$$RT\ln\phi_i = \int_V^\infty \left[\left(\frac{\partial P}{\partial n_i} \right)_{T,V,n_j} - \frac{RT}{V} \right] dV - RT\ln Z \qquad \text{para} \qquad P = P(T, V, n_1, n_2 ...)$$

v_i es el volumen molar parcial del componente *"i"* en dicha fase y *Z=PV/RT* es el *factor de compresibilidad* de la mezcla.

Se ha desarrollado una gran cantidad de EOS empíricas desde que van der Waals presentara su célebre ecuación en 1873. Esta ecuación dio origen a toda una familia de EOS *cúbicas* (por la dependencia cúbica del volumen), como la de Soave-Redlich-Kwong (SRK), la de Peng-Robinson (PR), etc. No es la intención de esta tesis profundizar en la descripción y discusión de estas ecuaciones, que pueden encontrarse en numerosas revisiones y libros especializados en la materia [1][3].

En general, estas ecuaciones computan las contribuciones a la no-idealidad debidas a efectos *atractivos* y *repulsivos* entre las moléculas del fluido, a través de dos parámetros propios de cada fluido (el parámetro energético *a* y el covolumen *b*, respectivamente). Para un compuesto puro, estos parámetros se calculan a partir de las propiedades críticas del fluido y de algún otro punto de la curva de saturación líquido-vapor (por ejemplo el *factor acéntrico*).

Cuando se extienden estos modelos a mezclas fluidas, se utilizan parámetros de la mezcla calculados a través de algún tipo de promedio ponderado de los parámetros de los componentes puros con respecto a las composiciones ("enfoque de un fluido"). Las *reglas de combinación* permiten calcular parámetros de interacción binaria (a_{ij}) a partir de los parámetros de los componentes puros. Las *reglas de mezclado* permiten calcular los parámetros de la mezcla (a_m y b_m) a partir de los parámetros binarios o de componente puro y las composiciones. Las reglas "clásicas" más utilizadas son las siguientes:

$$a_{ij} = \sqrt{a_i a_j}\,(1 - k_{ij}) \quad \text{(en donde } a_i \text{ y } a_j \text{ varían con T)}$$

$$a_m(T) = \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{N} x_i x_j a_{ij}$$

$$b_m = \sum_{i=1}^{N} x_i b_i$$

en donde k_{ij} es un parámetro ajustable de interacción binaria, que les otorga mayor flexibilidad. Por lo general, los coeficientes de fugacidad calculados por esta vía

dependen más de las reglas de mezclado y los parámetros utilizados que de la forma funcional de la EOS en sí.

b) Modelos de energía de Gibbs de exceso (enfoque *gama-fi*):

En este enfoque las fugacidades de las fases se computan de manera diferente. Para la fase vapor se utiliza un coeficiente de fugacidad, pero para describir la fase líquida se utiliza un *coeficiente de actividad* (γ):

$$\hat{f}_i^V = \phi_i^V y_i P \qquad\qquad \hat{f}_i^L = \gamma_i^L x_i P_i^o$$

en donde P_i^o es la presión en un estado estándar o de referencia. En el equilibrio se verifica:

$$\phi_i^V y_i P = \gamma_i^L x_i P_i^o \qquad \text{(criterio de isofugacidad)}$$

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{\gamma_i^L P_i^o}{\phi_i^V P} \qquad \text{(coeficiente de distribución)}$$

El coeficiente de actividad cuantifica la no-idealidad de la fase líquida con respecto a una "solución ideal", que puede definirse de distintas maneras. Por definición, cuando la fase líquida se comporta como la solución ideal, γ_i es igual a 1. Se considera que una solución es ideal cuando la fugacidad de sus componentes es proporcional a su fracción molar (o alguna otra forma de composición), ya sea en la forma de la ley de Raoult o de la ley de Henry (para soluciones diluidas). En el primer caso, la presión de referencia elegida es la presión de saturación del componente puro a la misma temperatura de la mezcla (P_i^{sat}). En el segundo caso, se utiliza la constante de Henry (H_i), que equivale a una presión de saturación hipotética.

Así como el coeficiente de fugacidad se computa a partir de una EOS, el coeficiente de actividad para la fase líquida se calcula a partir de ***modelos de energía de Gibbs de exceso (G^E)***. Las funciones *de exceso* (como G^E) representan la diferencia entre el valor de una propiedad termodinámica en una mezcla real y respecto a una solución ideal en las mismas condiciones de presión, temperatura y composición. La relación entre G^E y el coeficiente de actividad está dada por las siguientes expresiones:

$$\overline{G}_i^{\,E} = \left(\frac{\partial n_T G^E}{\partial n_i} \right)_{T,n_j} = RT \ln \gamma_i \qquad \text{(para cada componente)}$$

$$G^E = RT \sum_{i=1}^{N} x_i \ln \gamma_i \qquad \text{(para la mezcla)}$$

Se han desarrollado numerosos modelos de G^E, desde la simple ecuación de *Margules* para soluciones binarias, hasta otras expresiones más complejas, como las ecuaciones de *van Laar* y de *Scatchard-Hildebrand*, basadas en la teoría de "soluciones regulares", es decir, aquellas mezclas en que la entropía y el volumen de exceso son iguales a cero. Estos modelos proporcionan una descripción suficientemente aceptable en el caso de mezclas de compuestos apolares. Escapa al alcance de esta tesis presentar y discutir los diferentes modelos particulares, cuya descripción puede encontrarse en los libros de texto especializados ya mencionados [1][3].

Los modelos de G^E, si bien permiten realizar cálculos de equilibrio líquido-vapor a bajas presiones, no son aplicables al equilibrio de fases con fluidos supercríticos, ya que al tratar cada fase de manera diferente, no pueden describir en forma continua las transiciones en la región crítica, a diferencia de las EOS.

5.1.2. Modelado termodinámico de sistemas asimétricos

Las dificultades de las EOS cúbicas con reglas de mezclado clásicas y de los modelos de G^E clásicos para describir con precisión el comportamiento de sistemas muy *asimétricos* – es decir, cuyos componentes presentan grandes diferencias de tamaño y/o fuertes interacciones moleculares– han conducido al desarrollo de modelos o *teorías de soluciones* basados en nuevos conceptos e hipótesis.

Uno de estos conceptos es el de ***composición local***. Los modelos clásicos suponen condiciones de mezclado aleatorio a nivel molecular (es decir, entropía de exceso igual a cero). En soluciones fuertemente asimétricas, esta suposición ya no puede considerarse válida. Es esperable que, debido a diferencias en las interacciones moleculares (por ejemplo, en mezclas de compuestos polares y apolares), la concentración local de los componentes no sea la misma en todos los puntos de la fase. En torno de este concepto (también conocido como *aproximación cuasi-química*) se han desarrollado los *modelos*

de red –que tratan al líquido como una red cuasi-cristalina– y ecuaciones semi-empíricas como las de Wilson [4], NRTL (*"Non Random Two Liquids"*) [5] y UNIQUAC (*"Universal Quasi-Chemical"*) [6].

El concepto de composición local fue también aplicado al desarrollo de *nuevas reglas de mezclado* para el cálculo de los parámetros de las EOS cúbicas. La termodinámica clásica establece la relación entre los coeficientes de fugacidad y la energía de Gibbs de exceso:

$$\frac{G^E(T,P,z)}{RT} = \ln f_m(T,P,z) - \sum_{i=1}^{N} z_i \ln f_i(T,P)$$

en donde f_m y f_i son las fugacidades de la mezcla y del componente *"i"* puro, respectivamente, y z_i es la composición de *"i"* en la mezcla. A partir de esta relación, reemplazando las fugacidades por expresiones derivadas de una EOS e introduciendo algún modelo para G^E, es posible obtener expresiones para los parámetros (es decir, reglas de mezclado), particularmente para el parámetro energético *a*. Se obtienen así los llamados ***modelos mixtos EOS/G^E***. Este enfoque, introducido por Huron y Vidal [7], combina las ventajas de los dos modelos: conserva la descripción continua de las fases proporcionada por las EOS e introduce la gran flexibilidad aportada por los modelos de G^E para la descripción de mezclas no ideales [8].

Otro concepto introducido es el de ***contribución grupal***. Los modelos a contribución grupal se basan en la idea de que las propiedades de un compuesto o mezcla pueden predecirse a partir de las interacciones entre los grupos funcionales constitutivos de sus moléculas. Las mezclas son así tratadas como *soluciones de grupos*, en donde las interacciones molécula–molécula se consideran como sumas ponderadas adecuadamente de las interacciones grupo–grupo. El concepto se ha aplicado con éxito en modelos de coeficiente de actividad para soluciones líquidas [9]. Los modelos a contribución grupal utilizan la gran cantidad de información experimental disponible para obtener valores de parámetros grupales que permitan luego extender la descripción hacia sistemas de los cuales aún no existen datos, por lo que tienen un gran valor predictivo. Por otra parte, permiten la descripción de un gran número posible de mezclas a partir de una cantidad relativamente reducida de parámetros grupales. El modelo de actividad a contribución grupal (y basado en la idea de composición local) más ampliamente utilizado es UNIFAC [10].

Varios modelos EOS/G^E utilizan los parámetros grupales de UNIFAC, como por ejemplo la ecuación de *Huron y Vidal modificada de 2º orden* (MHV2), la de *Soave-Redlich-Kwong predictiva* (PSRK) y la *combinación lineal de reglas de mezclado de Vidal-Michelsen* (LCVM) [3].

Finalmente mencionaremos los ***modelos de esferas rígidas***, surgidos a partir de las limitaciones del término repulsivo de van der Waals –que relaciona de manera simple el volumen libre (V_f) con el covolumen *b*– para describir sistemas en condiciones de alta densidad y empaquetamiento. La incorporación de elementos de la mecánica estadística ha permitido obtener expresiones para el término repulsivo válidas tanto a baja como a alta presión, mejorando la representación del equilibrio con fluidos supercríticos. Numerosos modelos han surgido de la combinación de este tipo de expresiones con el término atractivo de EOS clásicas, como por ejemplo la conocida ecuación de *Carnahan-Starling* (CS) [11].

5.1.3. Selección de un modelo termodinámico

Como puede verse, existe una gran cantidad de modelos termodinámicos, basados en distintos conceptos y aplicados a distintos sistemas. Sin embargo, ningún modelo por sí mismo es apto para describir adecuadamente todo tipo de sistemas en cualquier rango de condiciones. Una etapa fundamental en la ingeniería del equilibrio de fases consiste justamente en decidir cuál es el modelo más adecuado para describir el comportamiento del sistema de interés en las condiciones del proceso [12].

Una pregunta fundamental a responder es la relativa a las *condiciones de presión y temperatura* en las que se va a aplicar el modelo. Esto definirá el uso de EOS o de modelos de G^E. Como ya se mencionó, la principal limitación de los modelos de G^E es que no pueden representar en forma continua las transiciones de fase en la región crítica. Además, al tratar mezclas de componentes subcríticos y supercríticos, la presión de vapor de los componentes supercríticos es hipotética, lo cual constituye otra dificultad. En tales casos, el enfoque *fi-fi* es más adecuado.

Al utilizar una EOS, otra cuestión importante es la referida a las *reglas de mezclado*, es decir, si las reglas clásicas de mezclado son suficientes o si se requieren reglas más complejas basadas en modelos de G^E. Esto dependerá del grado de aleatoriedad de la mezcla y de la asimetría de los componentes, como se vio anteriormente. Si la mezcla

puede considerarse aleatoria, una EOS cúbica con reglas de mezclado clásicas puede ser suficiente para una correcta descripción del sistema. Es el caso de mezclas de compuestos apolares o levemente polares y de bajo/medio peso molecular (< 200).

Cuando se trata de mezclas fuertemente no ideales (por asimetrías de tamaño o interacción molecular), debe considerarse el concepto de composición local, y por lo tanto es necesario utilizar modelos como NRTL, UNIQUAC o UNIFAC (si el sistema está a baja presión) o modelos EOS/G^E (si se trata de equilibrio en condiciones cuasi o supercríticas).

En conclusión, al momento de seleccionar un modelo termodinámico debe tenerse en cuenta la naturaleza química de los componentes del sistema (polaridad, peso molecular), sus fuerzas de interacción (dispersivas, asociativas, electrostáticas, etc.) y el rango de condiciones de presión y temperatura que va a estudiarse.

5.2. Ecuación de Estado a Contribución Grupal (GC-EOS)

5.2.1. Descripción del modelo

En esta tesis se utiliza la *ecuación de estado a contribución grupal* (GC-EOS) para la descripción de los sistemas CO_2 + aceite esencial. Esta ecuación, presentada en 1984 por J. Skjøld-Jorgensen [13], combina cuatro de los conceptos antes mencionados:

i) el término atractivo del modelo de EOS de van der Waals,
ii) el concepto de composición local,
iii) el principio de contribución grupal,
iv) el término repulsivo del modelo de esferas rígidas.

Esto le permite describir sistemas asimétricos y de un gran número de componentes utilizando una cantidad limitada de parámetros, describir en forma continua el comportamiento de fases en la región crítica y supercrítica, y tener una gran capacidad predictiva.

El modelo se basa en el cálculo de la *energía de Helmholtz residual* (A^{res}) del sistema. Dicha energía cuantifica el alejamiento del sistema con respecto al comportamiento de un

gas ideal debido a la contribución de dos efectos: el tamaño finito de las moléculas (efecto *repulsivo o de volumen libre*, A^{rep}) y sus fuerzas de interacción (efecto *atractivo,* A^{atr}). El modelo cuantifica ambas contribuciones por separado:

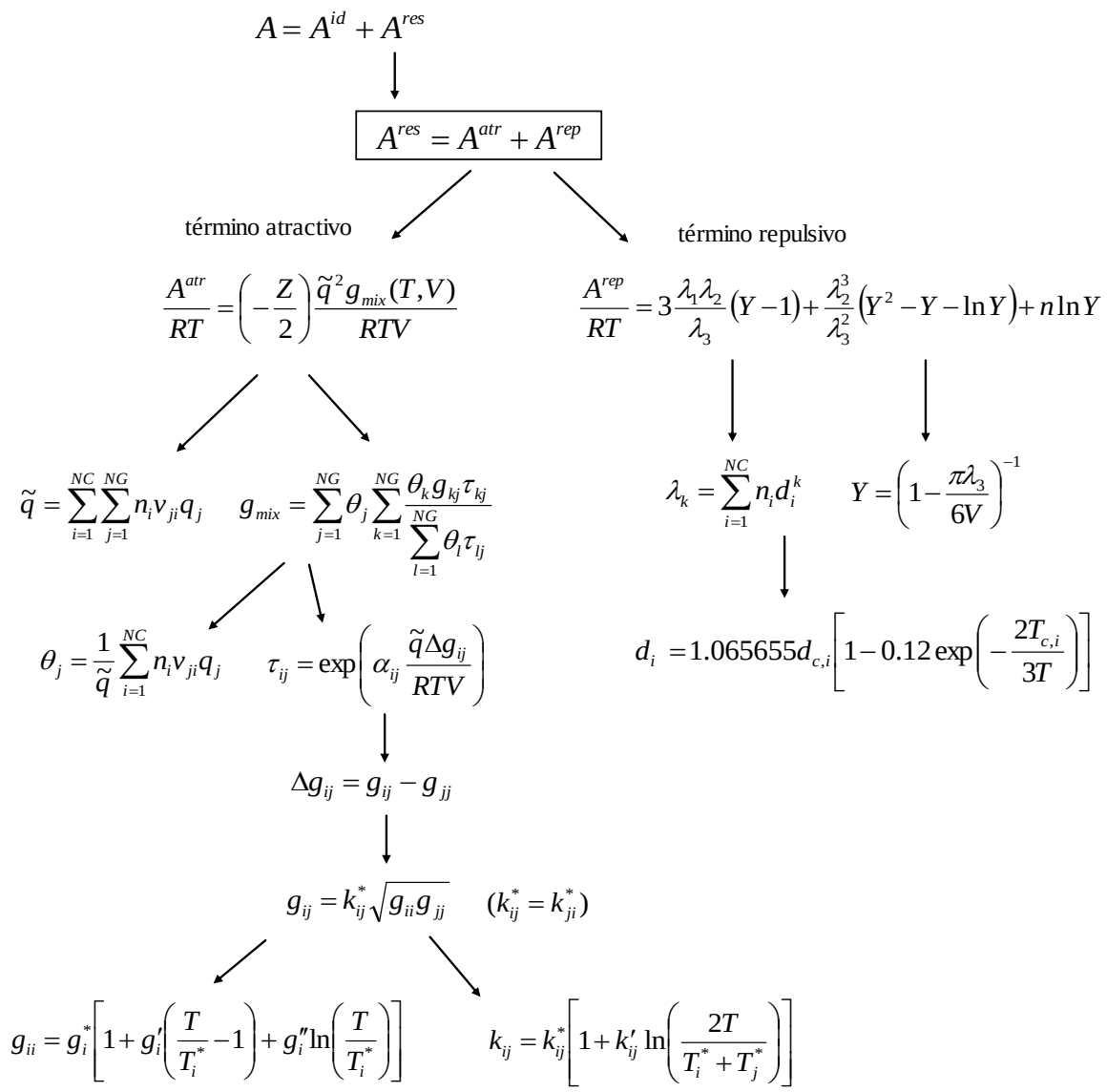
$$A = A^{id} + A^{res}$$
$$A^{res} = A^{atr} + A^{rep}$$

A partir de la derivación de la energía de Helmholtz con respecto a las distintas variables termodinámicas (utilizando las relaciones termodinámicas clásicas) se calcula el comportamiento volumétrico del sistema, por ejemplo:

$$P = -\left(\frac{\partial A}{\partial V}\right)_T$$

Las ecuaciones constitutivas del modelo se muestran en la Figura 5.1, en donde puede verse por separado el esquema de cálculo de las dos contribuciones A^{atr} y A^{rep}.

Existe también una extensión de este modelo a mezclas asociativas (GCA-EOS) [14]. Esta ecuación incorpora un término adicional (A^{asoc}) para computar las interacciones entre grupos asociativos (como por ejemplo puente de hidrógeno), basado en la *teoría estadística de fluidos asociativos* (SAFT) [15].



$\tilde{q}$	número total de segmentos de área
Z	número de coordinación
g_{mix}	energía atractiva característica de la mezcla
NC	número de componentes de la mezcla
NG	número de grupos
n_i	número de moles del componente *i*
ν_{ji}	número de grupos de tipo *j* en la molécula *i*
q_j	número de segmentos de área asignados al grupo *j*
α_{ij}	parámetro de no-aleatoriedad (en general α_{ij} no es igual a α_{ji}).
g_{ij}	energía de atracción entre los grupos *i* y *j*
g_i^*	energía de atracción a la temperatura de referencia T_i^*
k_{ij}^*	parámetro de interacción binaria a una temperatura igual a $(T_i^*+T_j^*)/2$.
T_i^*	temperatura de referencia del grupo *i*

Figura 5.1. Ecuaciones y esquema de cálculo del modelo GC-EOS.

a) Término atractivo de la GC-EOS:

Este término, que computa la no-idealidad debida a las fuerzas atractivas, es el que incluye la información grupal del modelo. Es una expresión de tipo van der Waals con respecto a la dependencia con el volumen, mientras que la dependencia con la composición (reglas de mezclado) se expresa mediante una versión a contribución grupal del modelo NRTL. Se asume que las interacciones tienen lugar a través de segmentos de área asignados a los grupos (q_i), utilizándose los parámetros de área de UNIFAC. La temperatura de referencia utilizada para el cálculo de las energías de interacción es 600 K en el caso de los grupos submoleculares e igual a la temperatura crítica en el caso de los grupos moleculares (moléculas constituidas por un solo grupo).

b) Término repulsivo de la GC-EOS:

El término repulsivo o de volumen libre sigue la expresión desarrollada por Mansoori y col. [16] para extender a mezclas la ecuación de Carnahan-Starling para esferas rígidas no atractivas. A^{rep} es función del *diámetro de esfera rígida* (d_i), parámetro característico de cada componente y dependiente de la temperatura, y no incluye información grupal ni parámetros binarios o de orden superior. d_c es el diámetro de esfera rígida en las condiciones críticas (o *diámetro crítico*) y T_c es la temperatura crítica del componente puro. En general, el diámetro crítico puede calcularse de distintas maneras:

- A partir de las constantes críticas:

$$d_c = \left(\frac{0.08943 R T_c}{P_c} \right)^{1/3}$$

- Ajustando un punto experimental de la curva de presión de vapor (T^{sat}, P^{sat}), lo cual es equivalente a la utilización del factor acéntrico en las ecuaciones cúbicas.

- Para ciertos compuestos de alto peso molecular (como los triglicéridos), cuyas constantes críticas no pueden determinarse experimentalmente y cuyos valores de presión de vapor son inciertos, Bottini y col. propusieron obtener el diámetro crítico experimentalmente a partir de los coeficientes de actividad a dilución infinita del hexano [17] en esos compuestos. A partir de los datos obtenidos, Espinosa propuso la siguiente correlación basada en el volumen de van der Waals (r_{VdW}) [18]:

$$\log(d_c) = 0.4152 + 0.4128\log(r_{VdW})$$

Es importante mencionar que pequeñas variaciones en el diámetro crítico pueden causar grandes desviaciones en la presión de vapor calculada por el modelo, por lo que es fundamental ajustar este parámetro a partir de datos confiables.

5.2.2. Parametrización

Como se ha visto, el término repulsivo de la GC-EOS requiere el ajuste de un sólo parámetro (el diámetro crítico, d_c), que es de carácter molecular. En cambio, el término atractivo requiere el ajuste de una serie de parámetros de carácter grupal: los parámetros de grupo puro g_i^*, g_i' y g_i'', los parámetros simétricos de interacción binaria k_{ij}^* y k_{ij}' y los parámetros asimétricos de no-aleatoriedad α_{ij} y α_{ji}. La parametrización puede seguir distintas estrategias, pero en general el criterio que prevalece es el siguiente:

- para grupos *moleculares*, los parámetros de grupo puro se ajustan a partir de datos del compuesto puro (como presión de vapor) y los parámetros binarios a partir de datos de equilibrio de fases de sistemas binarios.
- para grupos *submoleculares*, se ajustan todos los parámetros simultáneamente a partir de datos de compuesto puro y de equilibrio de fases de sistemas binarios.

En muchos casos, pueden obtenerse reproducciones satisfactorias del equilibrio de fases considerando nulos los parámetros g_i'', k_{ij}' y los α_{ij}. En otros casos, el ajuste de estos parámetros puede dar mayor flexibilidad.

La matriz original de parámetros de la GC-EOS ha sido sucesivamente ampliada y revisada por numerosos autores. En la Figura 5.2 puede observarse el estado actual de la matriz de parámetros, con las sucesivas ampliaciones, en términos de los pares de grupos parametrizados, de acuerdo a la última revisión actualizada presentada por Fornari [19]. Los grupos y parámetros utilizados en esta tesis corresponden a los de dicha revisión, y a ajustes propios en el caso de parámetros aún no disponibles.

Cabe mencionar que los parámetros de la matriz han sido obtenidos en base al ajuste de datos de equilibrio de una gran variedad de sistemas, sobre un amplio rango de temperaturas y presiones, otorgándole al modelo gran versatilidad y capacidad predictiva.

5.2.3. Subrutinas de cálculo

La GC-EOS ha sido implementada como modelo termodinámico en una serie de subrutinas de cálculo, utilizadas en esta tesis para el ajuste de parámetros, el cálculo de diagramas de fases y la simulación de columnas de fraccionamiento. Tales son:

- *PARAEST:* permite realizar el ajuste de uno o más parámetros en base a datos de presión de vapor, equilibrio líquido-vapor, coeficientes de actividad, constantes de Henry y volúmenes de exceso, minimizando una función objetivo. Permite también realizar cálculos predictivos con valores de parámetros introducidos por el usuario.
- *GCTHREE:* permite realizar cálculos de flash multifásico a presión y temperatura constante [20].
- *GCPXY:* se utiliza para obtener tablas de valores de presión vs. composición de las dos fases (x,y) a una temperatura dada, para un sistema binario.
- *GCENVEL:* permite calcular envolventes de fases (P-T) para un sistema de N componentes, para composición global y fracción vaporizada especificadas.
- *GCEXTRAC:* es un simulador robusto de una columna de extracción a contracorriente, para un sistema de N componentes y múltiples etapas. Permite incorporar alimentaciones múltiples, corrientes laterales, reflujo externo y perfiles de temperatura [21].

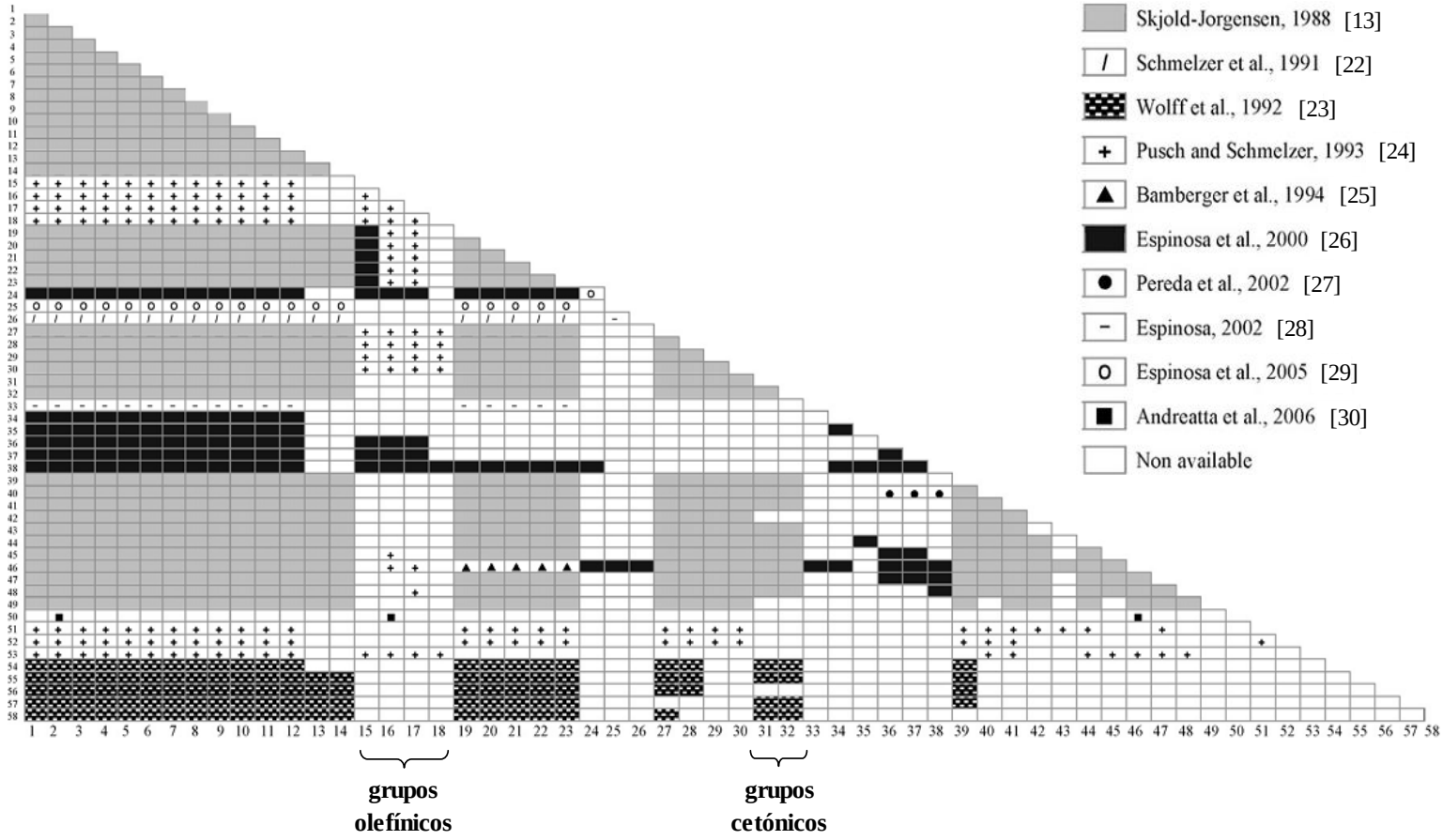


Figura 5.2. Estado actual de la matriz de parámetros de la GC-EOS [19].

5.3. Modelado de sistemas CO_2 + aceite esencial

5.3.1. Pautas generales

La composición de los aceites esenciales utilizados en esta tesis se indicó en el Capítulo 4 (Tabla 4.9). Como puede observarse, se trata de mezclas de una cantidad variada de componentes terpénicos, agrupados en tres fracciones principales, de acuerdo a su estructura química y rango de volatilidad (MT, OT y ST). Debido a este carácter multicomponente, los modelos a contribución grupal como la GC-EOS constituyen una herramienta adecuada y flexible para su tratamiento, ya que con pocos grupos es posible tratar mezclas de una gran cantidad de componentes.

No obstante, con el fin de simplificar el modelado termodinámico, se utilizó el enfoque de ***"pseudo-componentes".*** Se seleccionó un componente clave representativo de cada fracción y se modelaron los aceites como mezclas binarias o ternarias de estos pseudo-componentes. Los sistemas CO_2 + aceite esencial, por lo tanto, se trataron como sistemas pseudo-ternarios o pseudo-cuaternarios.

La diferencia de volatilidad entre las fracciones, debida a diferencias en el peso molecular y a la presencia o ausencia de funciones oxigenadas, así como el alto nivel de isomería entre componentes de cada fracción, justifica este enfoque desde el punto de vista termodinámico. Los componentes clave se seleccionaron en base a su concentración (componentes predominantes) o bien teniendo en cuenta la separación de interés, aunque no sean los compuestos mayoritarios (como el caso del par mentona/mentol, en el aceite de menta).

En la Tabla 5.1 se indican las fracciones identificadas en los aceites estudiados y los compuestos representativos elegidos.

Tabla 5.1. Fracciones y componentes representativos de los aceites estudiados.

Aceite	***Fracción 1***	***Fracción 2***	***Fracción 3***
Salvia officinalis	MT: α-pineno	OT: α-tuyona	ST: β-cariofileno
Tagetes minuta	MT: *E*-ocimeno	OT *Z*-ocimenona	-
Mentha piperita	F1: mentona	F2: *l*-mentol	-

Como ya se ha visto, en el caso del aceite de *S. officinalis* la presencia de las tres fracciones (MT, OT y ST) es significativa. El aceite de *T. minuta* es representado como una mezcla binaria de ocimeno (MT) y ocimenona (OT). En el caso del aceite de *M. piperita*, constituido casi totalmente por OT, se identificaron dos fracciones: una más volátil (F1, representada por mentona) y una menos volátil (F2, representada por *l*-mentol).

Para definir las estructuras grupales de los componentes seleccionados se utilizaron los grupos de la matriz actual de la GC-EOS, sin necesidad de definir grupos nuevos, como puede verse en la Tabla 5.2. No obstante, se plantearon dos cuestiones a resolver:

a) Los parámetros del grupo cetónico fueron ajustados a partir de datos de cetonas acíclicas, pero en los sistemas estudiados en esta tesis es necesario modelar cetonas cíclicas (α-tuyona y mentona), por lo que convenía verificar si los parámetros funcionan correctamente en este tipo de estructuras.
b) Los parámetros de interacción binaria entre grupos cetónicos y olefínicos no están disponibles en la matriz actual, por lo que era necesario ajustarlos.

Tabla 5.2. Estructura grupal de los componentes seleccionados

Grupo	α-pineno	α-tuyona	β-cariofileno	ocimeno	ocimenona	mentona	mentol	CO_2
CH_3	1	3	1	3	3	3	3	-
CH_2	-	-	-	1	-	-	-	-
CH	-	1	-	-	-	1	1	-
CH_3(B)	2	-	2	-	-	-	-	-
$CYCH_2$	2	1	5	-	-	2	3	-
CYCH	2	2	2	-	-	2	2	-
$CH=CH_2$	-	-	-	1	1	-	-	-
$C=CH_2$	-	-	1	-	-	-	-	-
C=CH	1	-	1	2	1	-	-	-
$CH_2C=O$	-	1	-	-	1	1	-	-
CHOH	-	-	-	-	-	-	1	-
CO_2	-	-	-	-	-	-	-	1

Teniendo en cuenta estas cuestiones, el ajuste del modelo implicó los siguientes pasos, de acuerdo al procedimiento sistemático recomendado [18]:

- Verificación de la capacidad predictiva del grupo *cetona* para estructuras *cíclicas*
- Ajuste de parámetros de interacción *cetona-olefinas*
- Reproducción de la presión de vapor de terpenos puros

- Reproducción de ELV de sistemas binarios CO_2 + terpeno
- Reproducción de ELV de sistemas multicomponente CO_2 + aceite esencial

5.3.2. Verificación de los parámetros de grupo cetónico

Para evaluar el funcionamiento de los parámetros del grupo cetónico en la descripción de cetonas cíclicas se analizó su capacidad predictiva en sistemas que contienen *ciclohexanona*. Se eligió este compuesto por ser el más simple que posee un grupo cetona formando parte de un anillo de 6 átomos de carbono, lo que le da una mayor afinidad estructural a los terpenos. Se estudió también el sistema *mentona + n-decano*.

En la Tabla 5.3 se resumen los sistemas estudiados, los rangos de condiciones y el error obtenido en la predicción, con respecto a los valores experimentales. Se indican también las referencias de los trabajos de donde se tomaron los datos. Los resultados pueden verse gráficamente en las Figuras 5.3–5.8. En general, se observa una buena predicción, lo cual confirma que este grupo y sus parámetros originales pueden utilizarse con confianza en la descripción de sistemas con cetonas cíclicas.

Tabla 5.3. Sistemas experimentales utilizados para el ajuste de sistemas con cetonas cíclicas.

Sistema	***Rango de T (K)***	***Rango de P (bar)***	***N***	***Error %***	***Ref.***
P^v ciclohexanona	300.0 – 400.0	0.01 – 0.45	11	5.57	[31]
ELV ciclohexano + ciclohexanona	323.2 348.2	0.10 - 0.35 0.18 - 0.82	13 14	2.55 2.32	[32]
ELV n-heptano + ciclohexanona	298.2	0.01 – 0.06	18	4.04	[33]
ELV tolueno + ciclohexanona	383.6 – 428.0	1.00	10	3.26	[34]
ELV CO_2 + ciclohexanona	290.8 300.9 310.1	1.00 – 80.00	11 15 14	2.15 2.67 3.44	[35]
ELV (-)-mentona + n-decano	364.2 – 392.1	0.0067	13	3.60	[36]

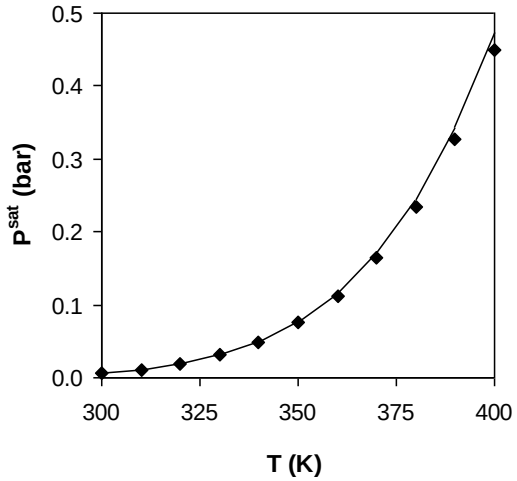


Figura 5.3. Presión de vapor de ciclohexanona.
(◆) datos experimentales [31], (–) predicción GC-EOS.

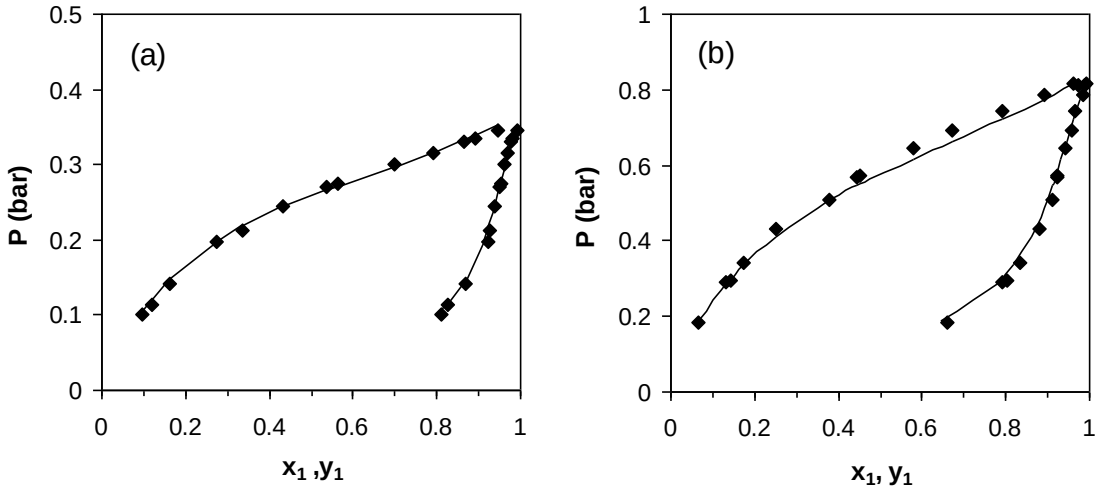


Figura 5.4. ELV ciclohexano(1) + ciclohexanona(2). (a) T=323.15 K, (b) T=348.15 K, (◆) datos experimentales [32], (–) predicción GC-EOS.

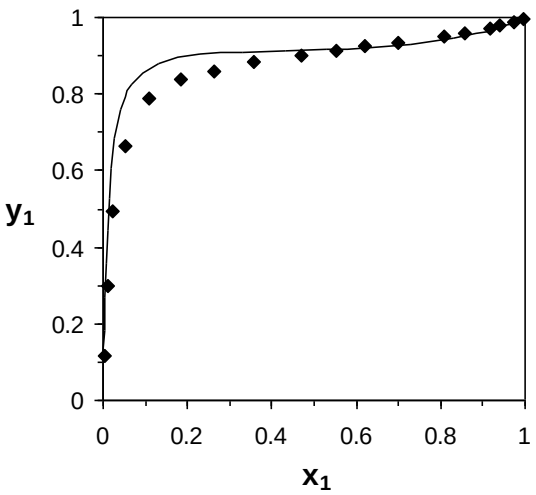


Figura 5.5. ELV n-heptano(1) + ciclohexanona(2), T=298.15 K. (◆) datos experimentales [33], (–) predicción GC-EOS.

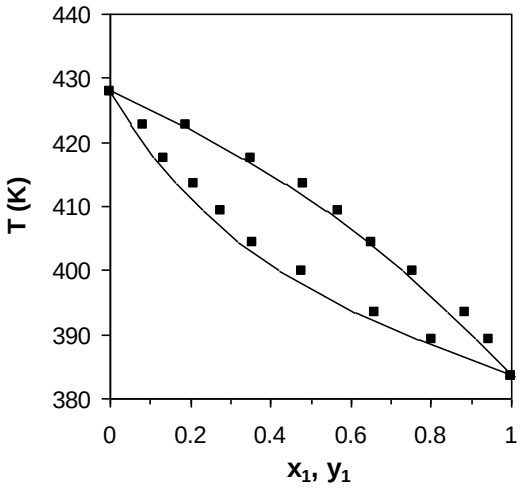


Figura 5.6. ELV tolueno(1) + ciclohexanona(2), P=1 bar. (■) datos experimentales [34], (–) predicción GC-EOS.

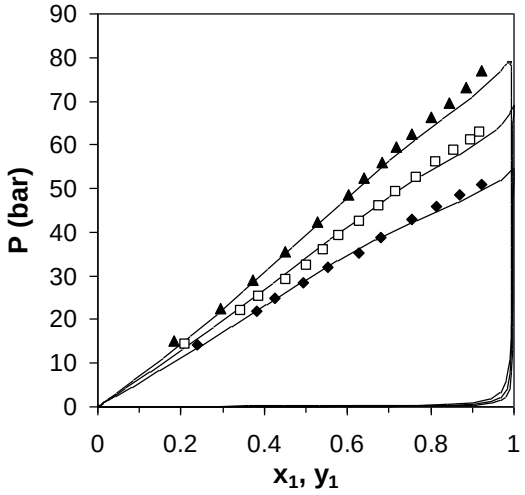


Figura 5.7.
ELV CO_2(1) + ciclohexanona(2),
(◆) 290.8 K, (□) 300.9 K, (▲) 310.1 K,
(–) predicción GC-EOS.

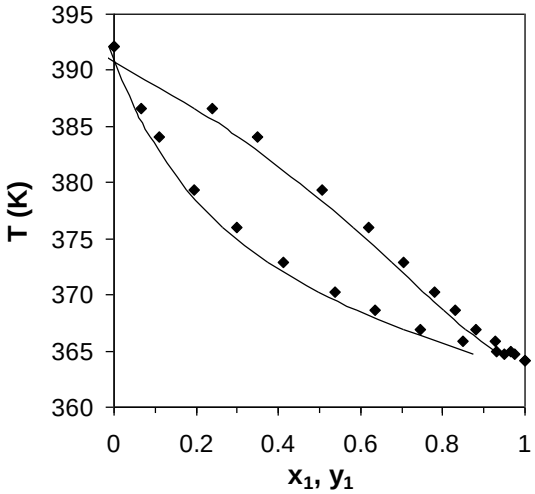


Figura 5.8.
ELV n-decano(1) + (-)-mentona(2),
P=0.067 bar. (◆) datos experimentales,
(–) predicción GC-EOS.

5.3.3. Ajuste de parámetros de interacción cetona/olefinas

Para realizar este ajuste, se correlacionaron simultáneamente presiones de vapor de cetonas insaturadas y datos de equilibrio líquido-vapor de distintos sistemas binarios cetona+olefina utilizando la subrutina PARAEST.

Tabla 5.4. Sistemas experimentales utilizados para el ajuste de parámetros de interacción binaria cetona/olefina

Interacción	k_{ij}	***Sistemas***	***N***	***Error %***	***Ref.***
$CH_3C{=}O$ / $C{=}CH$	0.975	P^{sat} de 4-metil-3-penten-2-ona	23	1.53	[37]
		ELV 2-metil-2-buteno + 2-butanona	13	1.45 – 0.99	[38]
		ELV 2-metil-2-buteno + metil-isopropil-cetona	13	0.60 – 0.85	[39]
$CH_3C{=}O$ / $CH{=}CH_2$	0.928	P^{sat} de 5-hexen-2-ona	21	5.55	[40]
		ELV 1-hexeno + 2-butanona	11	1.26 – 0.57	[41]
$CH_3C{=}O$ / $C{=}CH_2$	1.000	P^{sat} de dihidrocarvona	9	3.30	[42]
		ELV isopreno + metil-isopropil-cetona	13	0.55 – 0.44	[38]

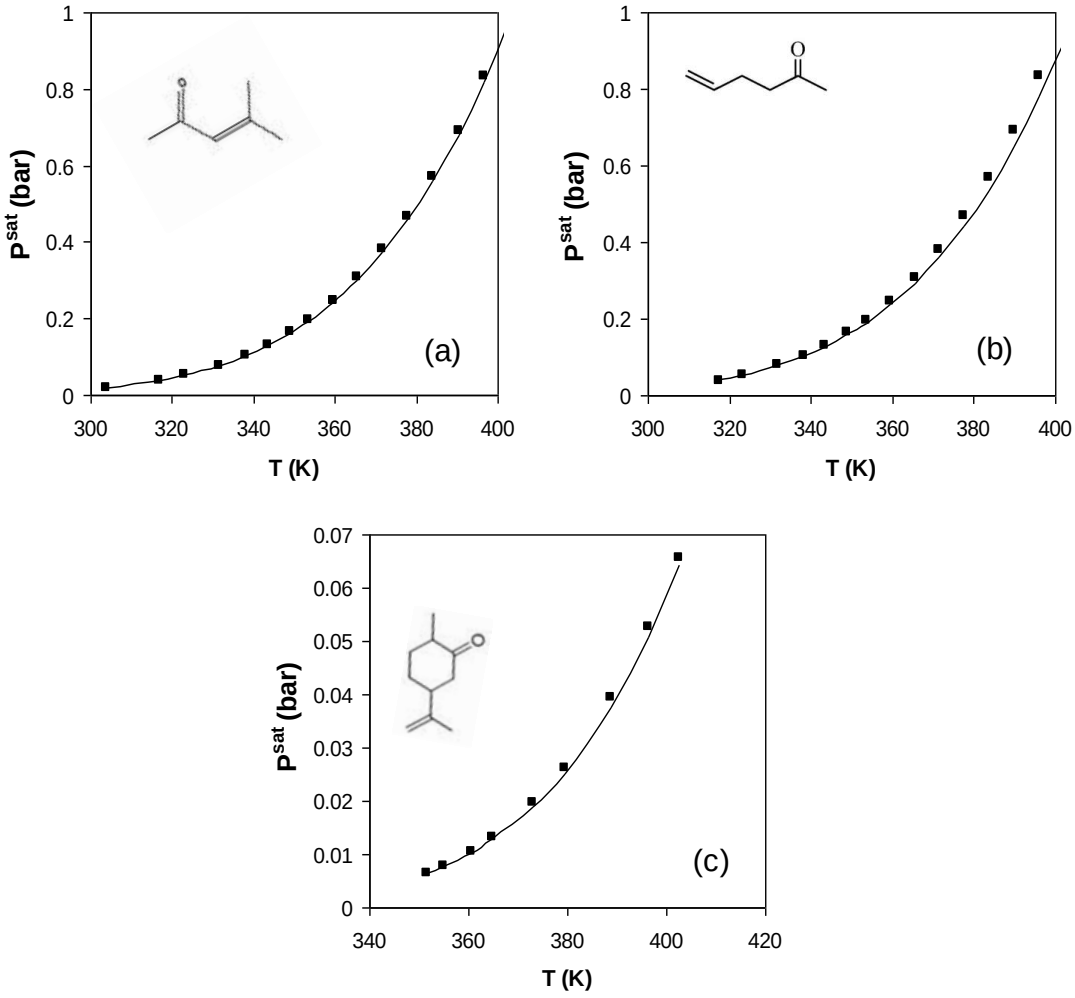


Figura 5.9.
Presión de vapor de cetonas insaturadas. (a) 4-metil-3-penten-2-ona, (b) 5-hexen-2-ona, (c) dihidrocarvona. (b) (■) datos experimentales, (–) predicción GC-EOS.

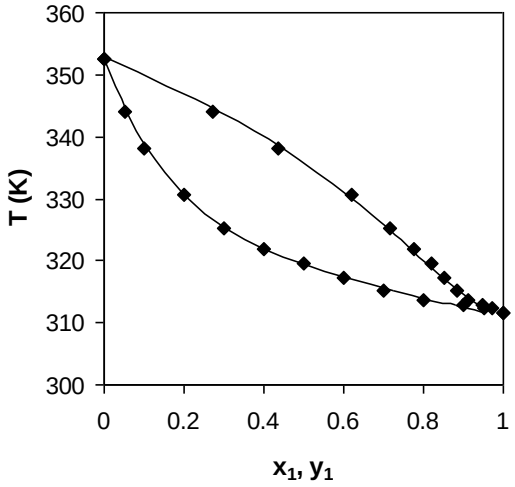


Figura 5.10.
ELV 2-metil-2-buteno(1) + 2-butanona(2), P=1 bar. (◆) datos experimentales, (–) predicciones GC-EOS

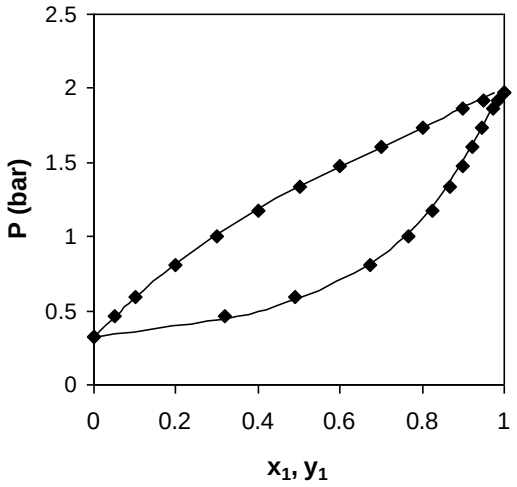


Figura 5.11.
ELV 2-metil-2-buteno(1) + metil-isopropil-cetona (2). T=333.2 K. (◆) datos experimentales, (–) predicciones GC-EOS

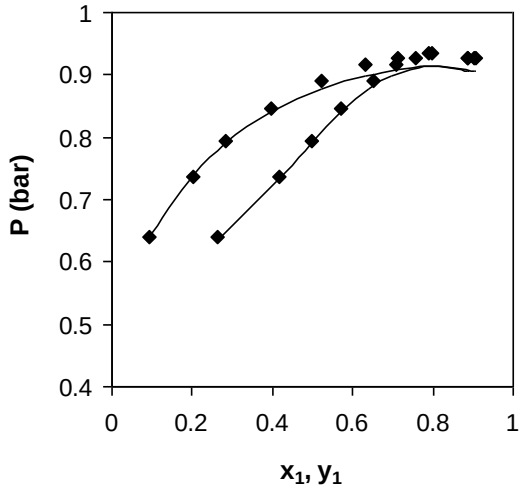


Figura 5.12.
ELV 1-hexeno(1) + 2-butanona(2). T=333.2 K. (◆) datos experimentales, (–) predicciones GC-EOS

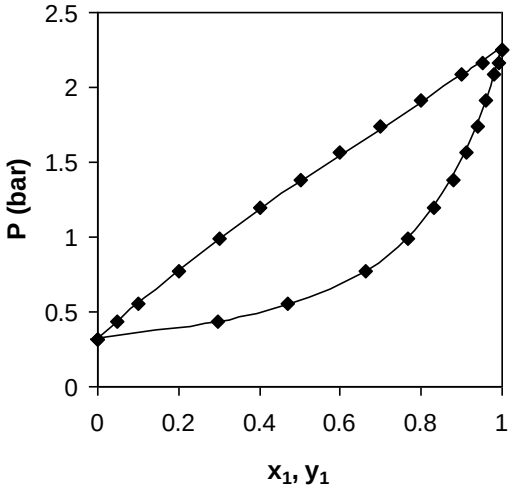


Figura 5.13.
ELV isopreno(1) + metil-isopropil-cetona(2). T=333.2 K. (◆) datos experimentales, (–) predicciones GC-EOS

En la Tabla 5.4 se muestran los sistemas utilizados para cada ajuste, los valores obtenidos para los parámetros, el error del ajuste y las referencias de los datos experimentales utilizados. En las Figuras 5.9–5.13 se muestran los resultados. Cabe mencionar que sólo fue necesario ajustar los parámetros binarios k_{ij} para obtener una buena correlación. Los parámetros obtenidos para el grupo $CH_3C{=}O$ se extrapolaron al grupo $CH_2C{=}O$.

5.3.4. Reproducción de la presión de vapor de terpenos puros

Una vez parametrizada la interacción entre grupos olefínicos y el grupo cetónico, se evaluó la predicción de la presión de vapor de los terpenos representativos seleccionados. Los datos experimentales fueron tomados de bases de datos de la literatura [31][42][43].

En la Tabla 5.5 se indican las propiedades críticas de cada componente. La presión y temperatura críticas fueron tomadas de literatura –en caso de existir datos– o estimadas mediante el método a contribución grupal de Joback [44]. Los diámetros críticos fueron calculados a partir del ajuste de un punto de la curva de presión de vapor, preferentemente dentro del rango de temperaturas de los datos experimentales. Para *E*-ocimeno y *Z*-ocimenona sólo se encontró información del punto normal de ebullición y algún punto de ebullición a baja presión en la literatura abierta.

Las estructuras grupales fueron indicadas en la Tabla 5.2. En las Tablas 5.6–5.8 se indican los parámetros de grupo puro, los parámetros de interacción binaria y los parámetros de no-aleatoriedad utilizados en los cálculos, respectivamente.

A diferencia de las demás cetonas, en el caso de la *Z*-ocimenona el grupo cetónico no corresponde a $CH_3C{=}O$ ni a $CH_2C{=}O$, puesto que se encuentra unido a grupos olefínicos, como puede verse en su estructura química (mostrada en el Capítulo 1). Para no tener que definir un grupo nuevo, se mantuvieron los parámetros originales del grupo cetónico y sólo se corrigió el parámetro *q*.

Tabla 5.5. Propiedades críticas y de saturación de los componentes seleccionados

Componente	T_c **(K)**	P_c **(atm)**	d_c **(cm/mol)**
α-pineno	644.0[a]	27.6[a]	5.3167
mentona	686.6[b]	26.0[b]	5.8165
E-ocimeno	643.3[b]	24.5[b]	5.8985
α-tuyona	680.5[b]	28.8[b]	5.4496
l-mentol	685.0[a]	20.0[a]	5.9772
Z-ocimenona	640.8[b]	26.0[b]	5.3948
β-cariofileno	746.3[b]	20.1[b]	6.5205
CO_2	304.2[a]	72.8[a]	3.1289

[a] Tomado de literatura [31]
[b] Estimado por el método de Joback [44]

Tabla 5.6. Parámetros de grupo puro utilizados

Grupo	T^* **(K)**	q	g^*	g'	g''
CH_3	600	0.848	316910	-0.9274	0
CH_2	600	0.540	356080	-0.8755	0
CH	600	0.228	356080	-0.8755	0
CH_3(B)	600	0.789	316910	-0.9274	0
$CYCH_2$	600	0.540	466550	-0.6062	0
CYCH	600	0.228	466550	-0.6062	0
$CH{=}CH_2$	600	1.176	337980	-0.6764	0
$C{=}CH_2$	600	0.988	323440	-0.6328	0
C=CH	600	0.676	546780	-1.0966	0
$CH_2C{=}O$	600	1.18[a]	888410	-0.7018	0
CHOH	512.6	0.908	1207500	-0.6441	0
CO_2	304.2	1.261	531890	-0.5780	0

[a] q=0.88 para Z-ocimenona

Tabla 5.7. Parámetros de interacción binaria (k_{ij} sobre la diagonal, k'_{ij} bajo la diagonal).
n.a. = no aplicado en los cálculos

Grupo	**CH_3**	**CH_2**	**CH**	**CH_3(B)**	**$CYCH_2$**	**CYCH**	**$CH{=}CH_2$**	**$C{=}CH_2$**	**C=CH**	**$CH_2C{=}O$**	**CHOH**	**CO_2**
CH_3	1	1	1	1	1	1	0.977	1	0.977	0.834	0.715	0.898
CH_2	0	1	1	1	1	1	0.977	n.a	0.977	0.834	n.a	0.898
CH	0	0	1	1	1	1	n.a	1	0.977	0.834	0.682	0.898
CH_3(B)	0	0	0	1	1	1	n.a	1	0.977	0.834	n.a.	0.928
$CYCH_2$	0	0	0	0	1	1	n.a	1.04	1	0.870	0.722	0.928
CYCH	0	0	0	0	0	1	n.a	1.04	1	0.870	0.722	0.928
$CH{=}CH_2$	0	0	n.a	n.a	n.a	n.a	1	n.a	1.094	n.a	n.a	0.948
$C{=}CH_2$	0	n.a.	0	0	0	0	n.a	1	1.094	1	n.a	1.057
C=CH	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.975	n.a	1
$CH_2C{=}O$	0.084	0.084	0.084	0.084	0.097	0.097	n.a	0	0	1	0.953	1.025
CHOH	0	n.a.	0	n.a.	0	0	n.a	n.a	n.a	0	1	0.985
CO_2	0	0	0	0	0.210	0.21	0	0	0	0.108	0	1

Tabla 5.8. Parámetros de no-aleatoriedad (α_{ij} sobre la diagonal, α_{ji} bajo la diagonal).
n.a. = no aplicado en los cálculos

Group	**CH_3**	**CH_2**	**CH**	**CH_3(B)**	**$CYCH_2$**	**CYCH**	**$CH{=}CH_2$**	**$C{=}CH_2$**	**C=CH**	**$CH_2C{=}O$**	**CHOH**	**CO_2**
CH_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.854	1.471	4.683
CH_2	0	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0.854	n.a.	4.683
CH	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0.854	1.471	4.683
CH_3(B)	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0.854	n.a.	4.683
$CYCH_2$	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0.854	1.471	0
CYCH	0	0	0	0	0	0	n.a.	0	0	0.854	1.417	0
$CH{=}CH_2$	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0	n.a.	0	n.a.	n.a.	0
$C{=}CH_2$	0	n.a.	0	0	0	0	n.a.	0	0	0	n.a.	0
C=CH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.a.	0
$CH_2C{=}O$	5.146	5.146	5.146	5.146	5.146	5.146	n.a.	0	0	0	0	0.17
CHOH	10.22	n.a.	10.22	n.a.	10.22	10.22	n.a.	n.a.	n.a.	0	0	-0.39
CO_2	4.683	4.683	4.683	4.683	0	0	0	0	0	0.17	0.468	0

En las Figuras 5.14–5.16 se muestran las curvas de presión de vapor experimentales y predichas por el modelo para los terpenos representativos de cada aceite. Se muestran los rangos de temperatura más cercanos a las condiciones de los ensayos experimentales. Se observa una buena concordancia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

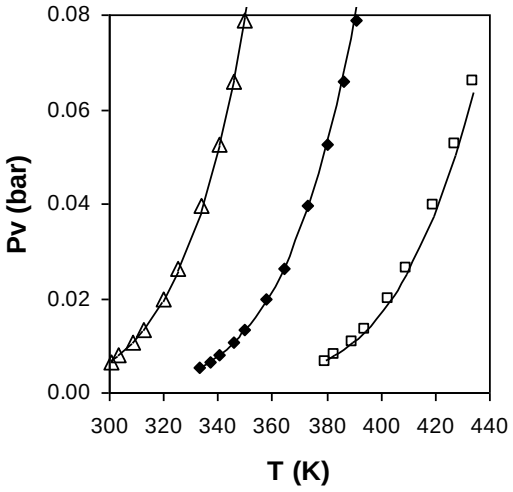


Figura 5.14. Presión de vapor de compuestos seleccionados de aceite de salvia. (△) α-pineno, (◆) α-tuyona, (□) β-cariofileno, (–) predicción GC-EOS.

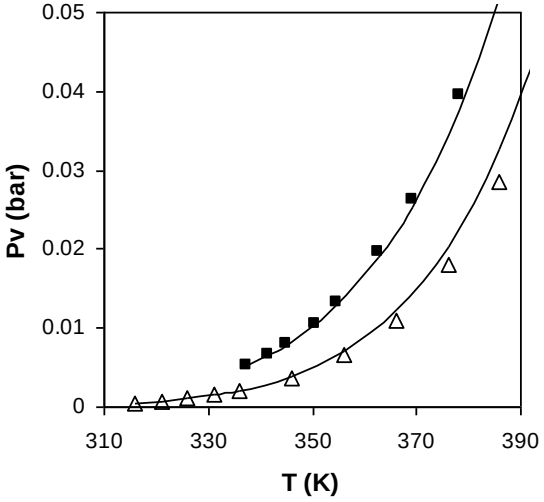


Figura 5.15. Presión de vapor de compuestos seleccionados de aceite de menta: (■) mentona, (△) mentol, (–) predicción GC-EOS.

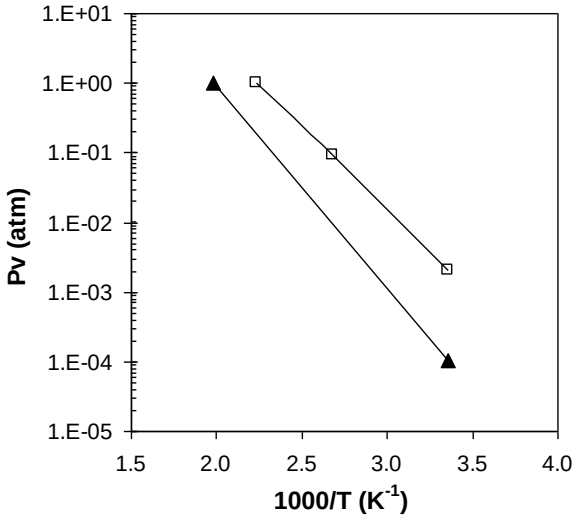


Figura 5.16. Presión de vapor de compuestos seleccionados de aceite de *Tagetes minuta* (escala logarítmica). (□) *E*-ocimeno, (▲) *Z*-ocimenona, (–) predicción GC-EOS.

5.3.5. Reproducción de ELV de sistemas binarios CO_2+terpeno

Luego de verificar la correcta reproducción de las curvas de presión de vapor (sobre todo en el rango de condiciones adecuadas para el fraccionamiento), se realizaron cálculos predictivos del comportamiento de los diferentes subsistemas binarios, constituidos por los componentes clave seleccionados y CO_2. Estos cálculos se

compararon con datos experimentales reportados en la literatura, en forma de isotermas de solubilidad en fase vapor/supercrítica, diagramas binarios *P-x,y* y/o coeficientes de distribución.

Con respecto a los componentes clave del aceite de *S. officinalis*, la Figura 5.17 muestra un diagrama *P-x,y* de **CO_2 + α-pineno,** componente representativo de la fracción de MT, para tres temperaturas (313, 323 y 333 K), según datos reportados por Akgün y col. [46] y las correspondientes predicciones de la GC-EOS. El gráfico de la derecha muestra en detalle la composición de la fase vapor o supercrítica.

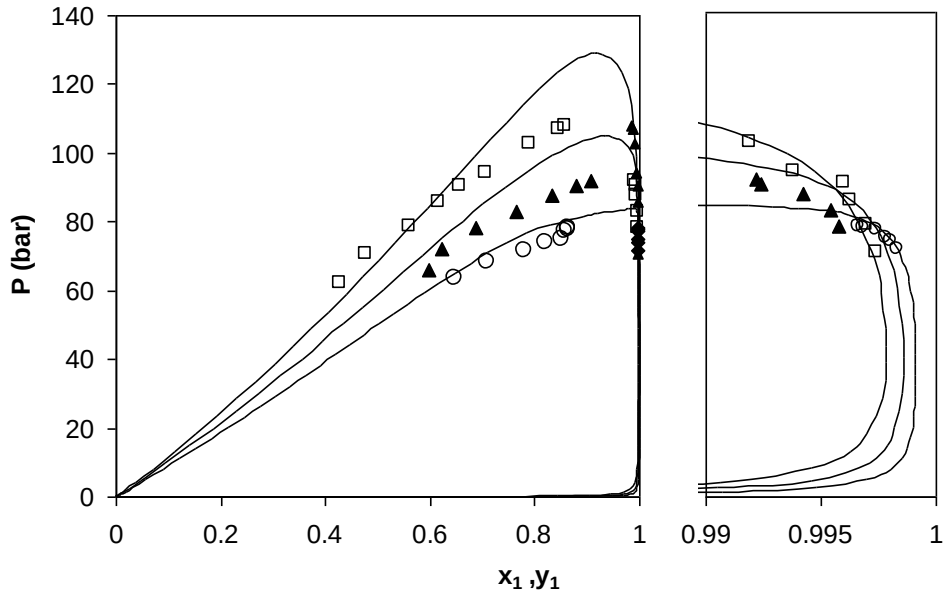


Figura 5.17. Diagrama *P-x,y* de CO_2 (1) + α-pineno (2). Datos experimentales [46]: (○) T=313 K, (▲) T=323 K, (□) T=333 K. (—) predicciones GC-EOS.

La Figura 5.18 muestra los mismos datos en forma de coeficiente de distribución de α-pineno en función de la presión y la Figura 5.19 muestra las curvas de solubilidad para las tres temperaturas, incluyendo también datos obtenidos por Richter y Sovová por un método dinámico [45], junto con las predicciones de la GC-EOS. Se observa una buena concordancia entre los datos y los valores calculados, aunque en la región crítica del sistema las desviaciones son significativas.

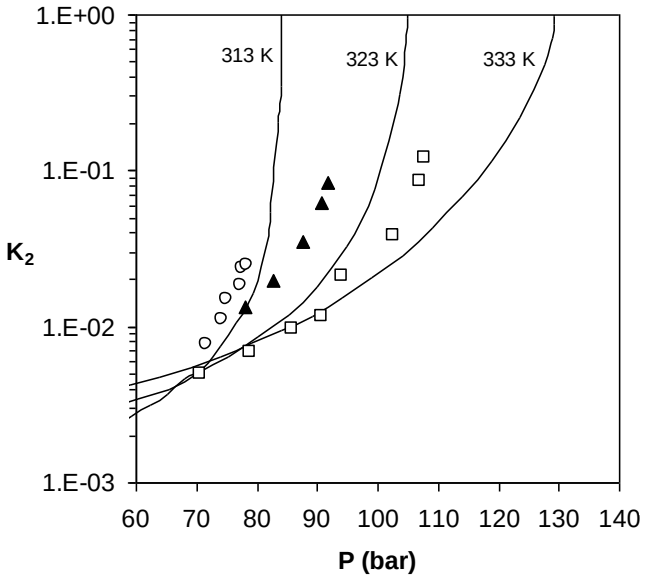


Figura 5.18. Coeficiente de distribución (K_2) de de α-pineno en CO_2 supercrítico. Calculado a partir de datos experimentales [46]: (○) T=313 K, (▲) T=323 K, (□) T=333 K. (—) Predicción GC-EOS.

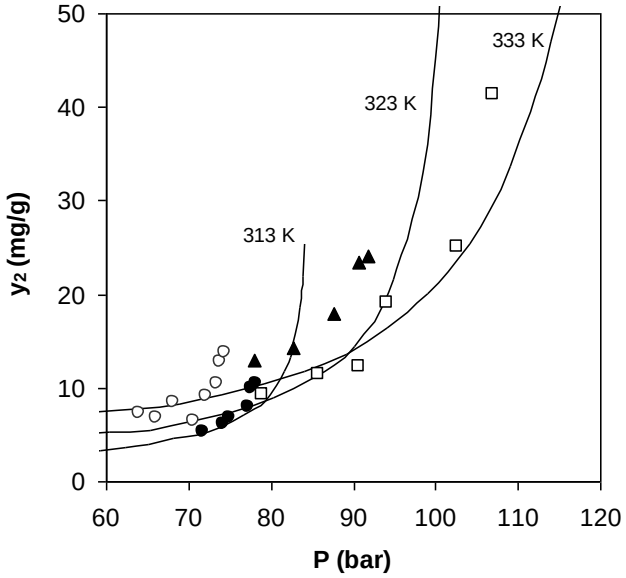


Figura 5.19. Solubilidad de α-pineno en CO_2. Datos experimentales: (○) T=313 K [46], (●) T=313 K [45], (▲) T=323 K [46], (□) T=333 K [46]. (—) Predicciones GC-EOS.

La Figura 5.20 muestra datos de solubilidad de **α-tuyona,** componente representativo de la fracción de OT, en CO_2 cuasi y supercrítico, según datos de Stahl y Quirin [47]. Son los únicos datos que se hallaron en la literatura para este sistema. Se observa una buena concordancia entre los datos y los valores calculados por el modelo.

En cuanto a **β-cariofileno**, componente representativo de la fracción de ST, las Figuras 5.21 y 5.22 muestran datos de equilibrio binario a 323 K reportados por Maschietti [48], en forma de diagrama *P-x,y* y coeficiente de distribución. En este caso también se observa una buena correlación entre los datos y las predicciones de la GC-EOS.

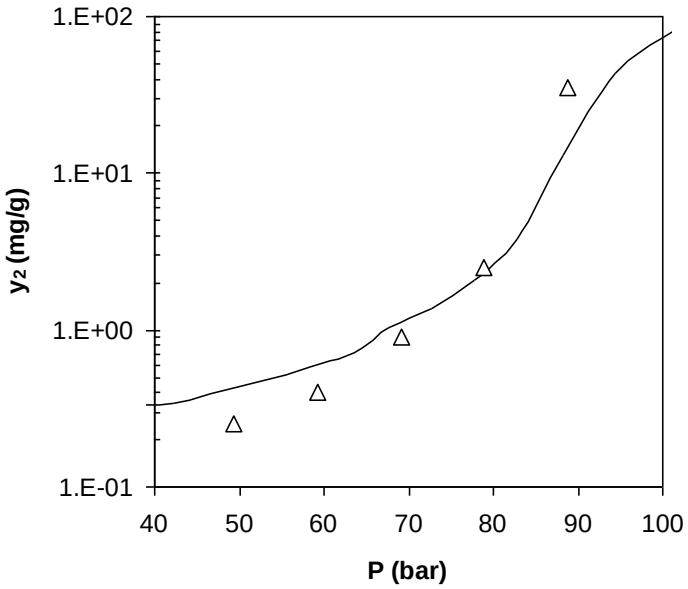


Figura 5.20.
Solubilidad de α-tuyona en CO_2 a T=313 K. (△) Datos experimentales [47], (—) predicción GC-EOS.

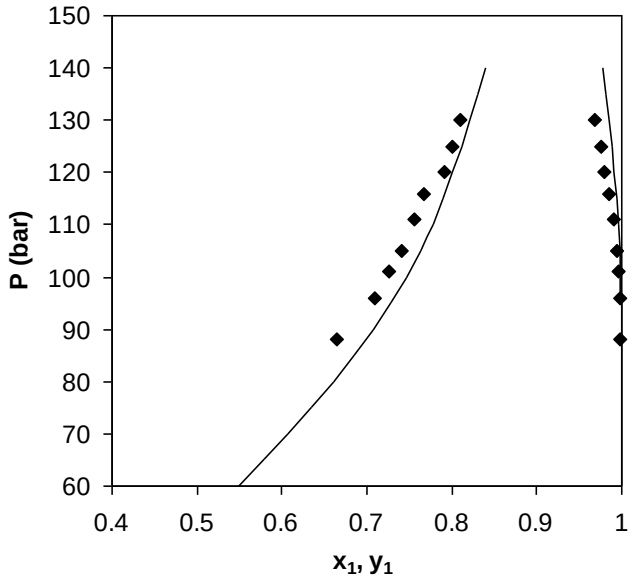


Figura 5.21.
Diagrama P-x,y de CO_2 (1) + β-cariofileno (2) a T=323 K. (◆) Datos experimentales [48], (—) predicción GC-EOS.

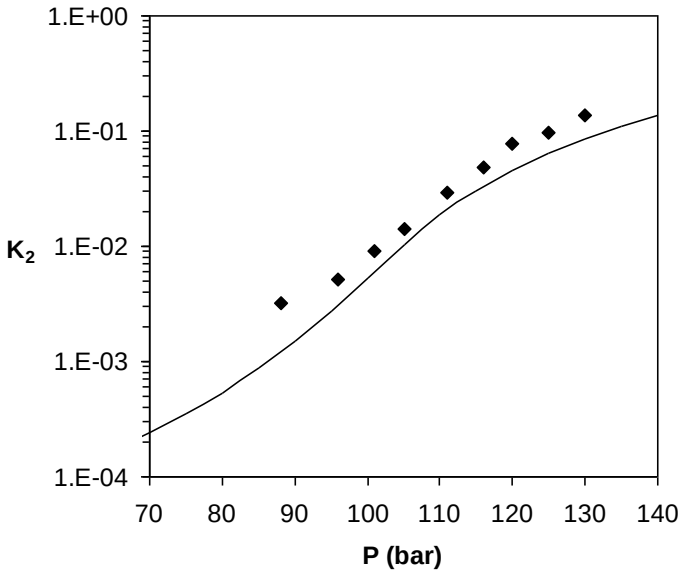


Figura 5.22. Coeficiente de distribución (K_2) de de β-cariofileno en CO_2 supercrítico (T=313 K). (◆) Datos experimentales [48], (—) predicción GC-EOS.

Con respecto a los componentes seleccionados del aceite de *M. piperita*, sólo se encontró en la literatura información binaria para el ***l*-mentol**. El sistema CO_2 + *l*-mentol ha sido estudiado por Sovová y Jez [49] y por Sovová y col. [50], utilizando tanto un método dinámico para determinar la solubilidad como un método sintético para explorar el equilibrio de fases. Debe tenerse en cuenta que el punto de fusión del *l*-mentol es de 316.5 K (menos de 13 K por encima de la T_c del CO_2), dando lugar a equilibrios sólido-líquido-vapor (SLV), líquido-líquido-vapor (L_1L_2V) y sólido-líquido-líquido (SL_1L_2) en la región crítica del CO_2. La Figura 5.23 muestra isotermas de solubilidad de *l*-mentol en CO_2 a 313 K (sólido) y 323 K (líquido). Se observa una buena concordancia con las predicciones de la GC-EOS a presiones por debajo de 95 bar, región que correspondería al equilibrio LV según los autores mencionados. A presiones superiores, en donde aparece equilibrio L_1L_2V, las desviaciones son significativas.

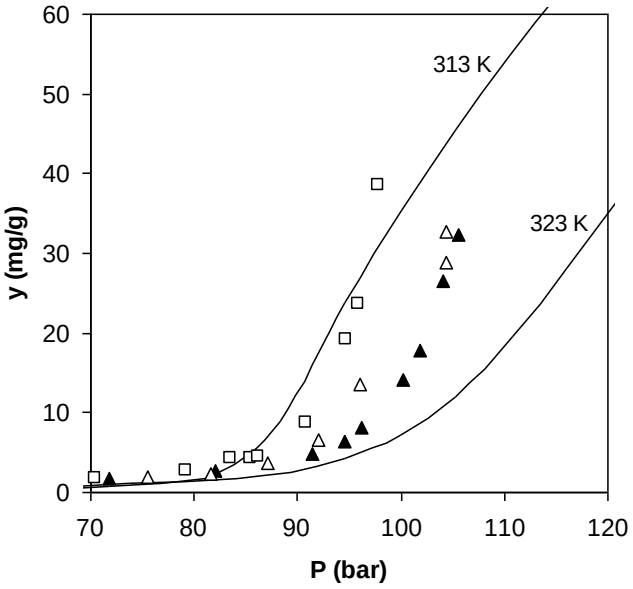


Figura 5.23. Solubilidad de *l*-mentol en CO_2 supercrítico.
(□) T=313 K [49], (▲) T=323 K [49], (△) T=323 K [50], (—) predicciones GC-EOS.

Finalmente, no se encontró información binaria de los componentes seleccionados del aceite de *T. minuta* con CO_2, por lo que sólo se muestran en las Figuras 5.24 y 5.25 las predicciones de la solubilidad y coeficiente de distribución de ***E*-ocimeno** y ***Z*-ocimenona** para tres temperaturas (313, 323 y 333 K) calculadas con la GC-EOS, a modo ilustrativo.

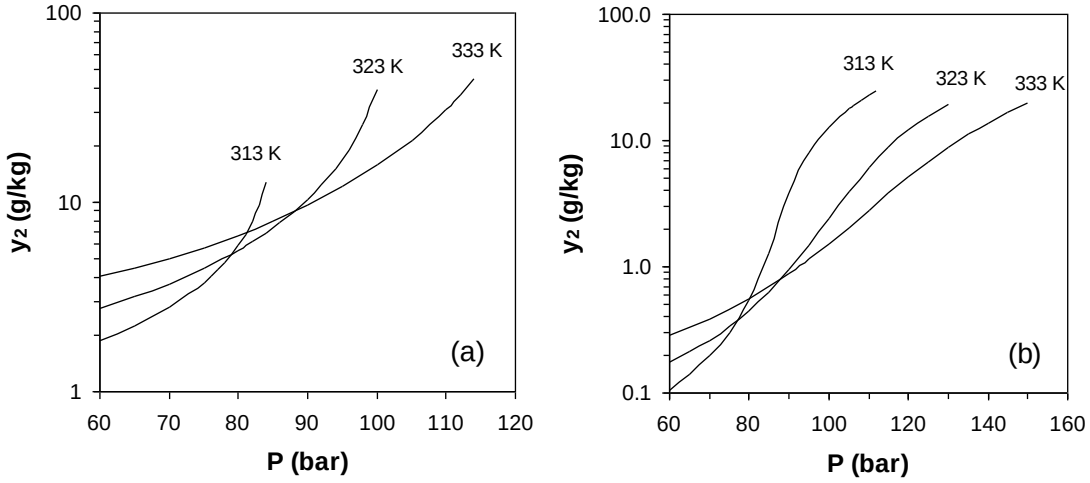


Figura 5.24. Solubilidad de (a) *E*-ocimeno, (b) *Z*-ocimenona en CO_2 supercrítico (calculada con la GC-EOS).

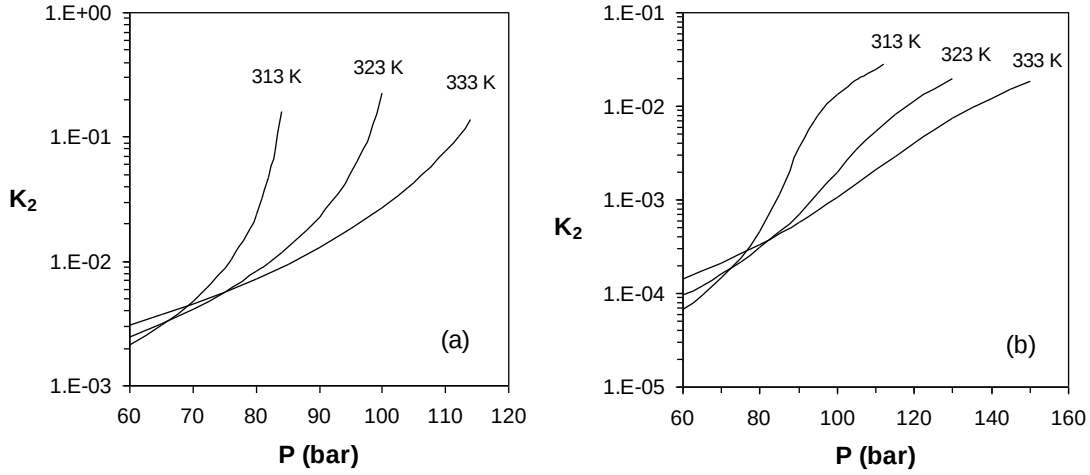


Figura 5.25. Coeficiente de distribución de (a) *E*-ocimeno, (b) *Z*-ocimenona en CO_2 supercrítico (calculado con la GC-EOS).

5.4. Conclusiones

En este capítulo se han revisado los principios básicos del modelado termodinámico, así como los distintos modelos desarrollados para la descripción del comportamiento de fases de sistemas asimétricos, tanto en tamaño como en interacciones moleculares. De acuerdo a las características de los sistemas estudiados en esta tesis, se seleccionó como modelo la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS). Esta ecuación es particularmente útil para la descripción del comportamiento de mezclas de

productos naturales a alta presión, ya que permite representar una gran cantidad de compuestos diferentes con un número limitado de parámetros grupales.

Para simplificar el modelado, se utilizó el enfoque de pseudo-componentes, es decir, se consideró a los distintos aceites como mezclas de dos o tres componentes representativos de cada fracción, luego de analizar su composición.

Se verificó la correcta descripción del modelo siguiendo un procedimiento sistemático. En primer lugar se determinó la estructura grupal de cada componente seleccionado, ajustándose luego los parámetros binarios no disponibles (cetona-olefina) a partir de datos reportados por otros autores. A continuación se verificó la correcta predicción de la presión de vapor de los compuestos puros y datos de equilibrio binario con CO_2 cuasi- y supercrítico, en términos de solubilidad, curvas de burbuja y rocío y coeficientes de distribución.

En conclusión, se observó una buena correspondencia entre las predicciones del modelo y los datos experimentales utilizados. En el siguiente capítulo, se presentarán los datos experimentales obtenidos en esta tesis para sistemas multicomponente y las correspondientes predicciones del modelo, confirmándose su gran potencialidad para su uso en la representación y simulación de sistemas de procesamiento de productos naturales con fluidos supercríticos.

REFERENCIAS

[1] Prausnitz, J.M., Lichtenthaler, R.N., Gomes de Acevedo, E. *Termodinámical molecular de los equilibrios de fases* (3º Edition). Prentice Hall Iberia, Madrid, 2000.

[2] Orbey, H., Sandler, S.I. *Modeling Vapor-Liquid Equilibria. Cubic Equations of State and Their Mixing Rules.* Cambridge University Press, 1998.

[3] Michelsen, M.L., Mollerup, J.M. *Thermodynamic Models: Fundamentals and Computational Aspects* (2nd Edition). Tie-Line Publications, Dinamarca, 2007.

[4] Wilson, G.M. *Vapor-liquid equilibrium. XI. A new expression for the excess free energy of mixing.* J. of the American Chemical Society 86 (1964) 127-130.

[5] Renon, H., Prausnitz, J.M. *Local compositions in thermodynamic excess functions for liquid mixtures*. AIChE Journal 14 (1968) 135-144.

[6] Abrams, D.S., Prausnitz, J.M. *Statistical thermodynamics of liquid mixtures: A new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems*. AIChE Journal 21 (1975) 116-128.

[7] Huron, M.J., Vidal, J. *New mixing rules in simple equations of state for strongly non-ideal mixtures.* Fluid Phase Equilibria 3 (1979) 255-271.

[8] Kontogeorgis, G.M., Economou, I.G. *Equations of state: From the ideas of van der Waals to association theories.* J. of Supercritical Fluids 55 (2010) 421-437.

[9] Fredenslund, A., Sorensen, J.M. *Group Contribution Estimation Methods*. In: Models for Thermodynamic and Phase Equilibria Calculations (Ed.: S.I. Sandler), Marcel Dekker Inc., New York, 1994.

[10] Fredenslund, A., Jones, R.L., Prausnitz, J.M. *Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures.* AIChE Journal 21 (1975) 1086-1099.

[11] Carnahan, N.F., Starling, K.E. *Equation of state for nonattracting rigid spheres*. J. of Chemical Physics 51 (1969) 635.

[12] Brignole, E.A., Pereda, S. *Phase Equilibrium Engineering.* Supercritical Fluid Science and Technology, Vol. 3 (Series Editor: E. Kiran). Elsevier, 2013.

[13] Skjøld-Jorgensen, S. *Group contribution equation of state (GC-EOS): a predictive method for phase equilibrium computations over wide ranges of temperatures and pressures up to 30 MPa,* Industrial and Engineering Chemistry Research 27 (1988) 110.

[14] Gros, H.P., Bottini, S., Brignole, E.A. *Group contribution equation of state for associating mixtures*. Fluid Phase Equilibria 116 (1996) 537-544.

[15] Chapman, W.G., Gubbins, K.E., Jackson, G., Radosz, M. *SAFT: Equation of state solution model for associating fluids*. Fluid Phase Equilibria 52 (1989) 31-38.

[16] Mansoori, G., Carnahan, N., Starling, K., Leland, T. *Equilibrium thermodynamic properties of the mixture of hard spheres*. J. of Chemical Physics 54 (1971) 1523.

[17] Bottini, S.B., Fornari, T., Brignole, E.A. *Phase equilibria modeling of triglycerides with near critical solvents*. Fluid Phase Equilibria 158-160 (1999) 211-218.

[18] Espinosa, S. *Procesamiento Supercrítico de Productos Naturales. Modelado, Análisis y Optimización* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Sur, Argentina, 2001.

[19] Fornari, T. *Revision and summary of the group contribution equation of state parameter table: Application to edible oil constituents*. Fluid Phase Equilibria 262 (2007) 187-209.

[20] Michelsen, M.L. *The isothermal flash problem. Part II. Phase-split calculation*. Fluid Phase Equilibria 9 (1982) 21-40.

[21] Brignole, E.A., Andersen, P.M., Fredenslund, A. *Supercritical fluid extraction of alcohols from water.* Industrial & Engineering Chemistry Research 26 (1987) 254-261.

[22] Schmelzer, J., Obst, S.O., Sühnel, K., Quitzsch, K. *Phasengleichgewichte in phenolhaltigen Modellsystemen.* Chem Tech. 43 (1991) 261-265.

[23] Wolff, S.R., Danner, R.P., Fredenslund, A. *Extension of the group contribution equation of state for the calculation of gas solubilities*. Fluid Phase Equilibria 81 (1992) 109-127.

[24] Pusch, J., Schmelzer, J. *Extension of the Group-Contribution Equation of State parameter matrix for the prediction of phase equilibria containing argon, ammonia, propene and other alkenes.* Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 97 (1993) 597-603.

[25] Bamberger, A., Schmelzer, J., Walther, D., Maurer, G. *High-pressure vapour-liquid equilibria in binary mixtures of carbon dioxide and benzene compounds: Experimental data for mixtures with ethylbenzene, isopropylbenzene, 1,2,4-trimethylbenzene, 1,3,5-trimethylbenzene, ethenylbenzene and isopropenylbenzene, and their correlation with the generalized Bender and Skold-Jorgensen's Group Contribution Equation of State*. Fluid Phase Equilibria 97 (1994) 167-189.

[26] Espinosa, S., Foco, G.M., Bermúdez, A., Fornari, T. *Revision and extension of the Group Contribution Equation of State to new solvent groups and higher molecular weight alkanes.* Fluid Phase Equilibria 172 (2000) 129-143.

[27] Pereda, S., Bottini, S.B., Brignole, E.A. *Gas-liquid reactions under supercritical conditions – Phase equilibria and thermodynamic modeling.* Fluid Phase Equilibria 194-197 (2002) 493-499.

[28] Espinosa, S., Fornari, T., Bottini, S.B., Brignole, E.A. *Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model*. J. of Supercritical Fluids 23 (2002) 91-102.

[29] Espinosa, S., Díaz, S., Fornari, T. *Extension of the group contribution associating equation of state to mixtures containing phenol, aromatic acid and aromatic ether compounds.* Fluid Phase Equilibria 231 (2005) 197-210.

[30] Andreatta, A.E., Bottini, S.B., Florusse, L.J., Peters, C.J. *Phase equilibria of allyl sulfide + carbon dioxide binary mixtures: Experimental data and thermodynamic modeling*. J. of Supercritical Fluids 38 (2006) 306-311.

[31] Base de datos TERMOINT.

[32] Boublik, T., Lu, B.C.Y. *Vapor-liquid equilibria of the cyclohexane+cyclohexanone system at 323.15 and 348.15 K*. J. of Chemical and Engineering Data 22 (1977) 331.

[33] Matteoli, E., Lepori, L. *Isothermal liquid-vapor equilibria of mixtures containing organic compounds. 2. Excess Gibbs free energies of a hydrocarbon or tetrachloromethane + a cyclic ketone at 298.15 K*. J. of Chemical and Engineering Data 33 (1988) 247-250.

[34] Kireev, V.A., Sheinker, Y.N., Peresleni, E.M. Zh. Fiz. Khim. 26 (1952) 352, cited in DECHEMA Data Series.

[35] Chang, C.J., Chen, C.Y. *Solubilities of carbon dioxide and nitrous oxide in cyclohexanone, toluene and N,N-dimethylformamide at elevated pressures*. J. of Chemical and Engineering Data 40 (1995) 850-855.

[36] Batiu, I. *Vapor-liquid equilibria in the binary systems n-decane + (-)-menthone and n-decane + (+)-fenchone at temperatures between 344.45 and 390.75 K*. Fluid Phase Equilibria 198 (2002) 111-121.

[37] Steele, W.V., Chirico, R.D., Cowell, A.B., Knipmeyer, S.E., Nguyen, A. *Thermodynamic properties and ideal-gas enthalpies of formation for 2-aminoisobutyric acid (2-methylalanine), acetic acid, (Z)-5-ethylidene-2-norbornene, mesityl oxide (4-methyl-3-penten-2-one), 4-methylpent-1-ene, 2,2'-bis(phenylthio)propane, and glycidyl phenyl ether (1,2-epoxy-3-phenoxypropane)*. J. of Chemical and Engineering Data 42 (1997) 1053-1066.

[38] Smirnov, V.V., Pavlov, S.Y., Groshkov, V.A., Serafimov, L.A. Prom-St. Sint. Kauch. 2, 1 (1976), cited in DECHEMA Data Series.

[39] Smirnov, V.V., Saraev, B.A., Pavlov, S.Y., Serafimov, L.A. Prom-St. Sint. Kauch. 2, 3 (1976), cited in DECHEMA Data Series.

[40] Steele, W.V., Chirico, R.D., Knipmeyer, S.E., Nguyen, A. *Measurements of vapor pressure, heat capacity, and density along the saturation line for cyclopropane carboxylic acid, N,N-diethylethanolamine, 2,3-dihydrofuran, 5-hexen-2-one, perfluorobutanoic acid, and 2-phenylpropionaldehyde*. J. of Chemical and Engineering Data 47 (2002) 715-724.

[41] Hanson, D.C., Van Winkle, M.J. J. of Chemical and Engineering Data 12 (1967), cited in DECHEMA Data Series.

[42] Guenther, E. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand Company, Inc., 1947.

[43] *Perry´s Chemical Engineer´s Handbook*, 6th Ed., Mc. Graw-Hill, New York, 1984.

[44] Poling, B.E., Prausnitz, J.M., O'Connell, J.P. *The Properties of Gases and Liquids* (5th Edition), McGraw-Hill, New York, 2001.

[45] Richter, M., Sovová, H. *The solubility of two monoterpenes in supercritical carbon dioxide*. Fluid Phase Equilibria 85 (1993) 285-300.

[46] Akgün, M., Akgün, N., Dincer, S. *Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 15 (1999) 117-125.

[47] Stahl, E., Quirin, K.W. *Dense gas extraction on a laboratory scale: a survey of some recent results.* Fluid Phase Equilibria 10 (1983) 269-278.

[48] Maschietti, M. *High-pressure gas-liquid equilibrium of the system carbon dioxide-β-caryophyllene at 50 and 70ºC*. J. of Supercritical Fluids 59 (2011) 8-13.

[49] Sovová, H., Jez, J. *Solubility of menthol in supercritical carbon dioxide*. J. of Chemical and Engineering Data 39, 4 (1994) 840-841.

[50] Sovová, H., Stateva, R.P., Galushko, A.A. *High-pressure equilibrium of menthol + CO_2*. J. of Supercritical Fluids 41 (2007) 1-9**.**

6. Resultados experimentales y discusión

6.1. Mediciones de equilibrio multicomponente

Siguiendo los lineamientos mencionados previamente, se realizaron en primer lugar mediciones exploratorias de equilibrio en diferentes condiciones de presión y temperatura, utilizando el método dinámico descripto en el Capítulo 4. Estas mediciones permitieron determinar:

- la solubilidad global del aceite (o capacidad de carga del solvente supercrítico) en la fase vapor o "extracto";
- la composición de la fase vapor o "extracto" en diferentes condiciones de presión y temperatura, así como los coeficientes de reparto (K_i) y la volatilidad relativa (α_{ij}) de las principales fracciones;
- algunos límites de la región bifásica de operación.

Los resultados obtenidos permitieron investigar el efecto de la presión y la temperatura en el grado de separación de las fracciones de interés, obtener algunas conclusiones sobre las condiciones recomendables de operación y validar las predicciones obtenidas con el modelo GC-EOS.

Se realizaron ensayos a 313 y 323 K y en un rango de presión de 70 a 120 bar, condiciones seleccionadas a partir de la ventana operativa definida en el Capítulo 3, considerando los límites de la región bifásica, la termolabilidad de los compuestos y una adecuada diferencia de densidad entre las fases.

Debido a la densidad variable del CO_2 en el rango de presión estudiado y al volumen fijo de la celda, debe tenerse en cuenta que la composición global del sistema es distinta en cada punto experimental, variando entre 0.10 y 0.03 aprox. (en fracción molar de aceite) en el rango estudiado.

6.1.1. Sistema CO_2 + aceite de T. minuta

Las Figuras 6.1 (a) y (b) muestran los resultados de ***solubilidad global*** del aceite de *T. minuta* en la fase vapor o "extracto" en forma de curvas isotérmicas, en función de la presión y de la densidad del CO_2 puro, respectivamente.

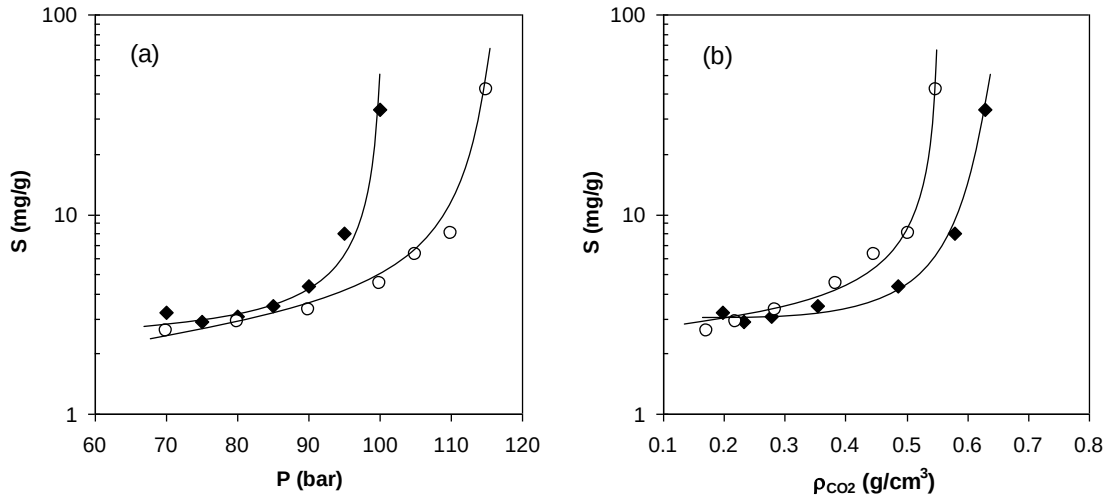


Figura 6.1. Solubilidad global de aceite de *T. minuta* en CO_2 : (a) en función de la presión, (b) en función de la densidad de CO_2 puro. (◆) T=313 K, (○) T=323 K, (—) líneas de tendencia.

Se observa que la solubilidad del aceite se incrementa de manera aproximadamente exponencial con la presión (y con la densidad del solvente) a temperatura constante. El incremento es de un orden de magnitud en el rango estudiado, aumentando desde valores del orden de 2 mg/g en las regiones de densidad más baja hasta valores en torno a 50 mg/g a medida que el sistema se aproxima al límite de la región bifásica. Los valores observados a 100 bar / 313 K y a 115 bar / 323 K corresponden a condiciones de homogeneidad, puesto que la solubilidad observada es aproximadamente igual a la composición global del sistema, y por lo tanto constituyen límites superiores de la región de operación.

El efecto de la temperatura es más complejo. Como se ha mencionado antes, la temperatura tiene dos efectos opuestos en la solubilidad: por un lado incrementa la presión de vapor de los solutos, favoreciendo su transferencia a la fase supercrítica, y por el otro reduce la densidad del CO_2, con disminución de su poder solvente. Cuando se observan los resultados expresados en función de la densidad del CO_2 puro (en vez de la

presión), estos efectos pueden analizarse separadamente, verificándose que a una misma densidad del solvente, la solubilidad aumenta con la temperatura.

La ***composición*** de la fase vapor o extracto en las distintas condiciones estudiadas se muestra en las Tablas 6.1 y 6.2, en términos de la fracción en peso de los componentes principales en base libre de solvente, obtenida por análisis cromatográfico (GC-FID), tal como se detalló en el Capítulo 4. Se indican también las cantidades totales de monoterpenos hidrocarbonados (MT) y de monoterpenos oxigenados (OT), las dos fracciones constitutivas de este aceite.

Tabla 6.1. Composición de la fase extracto para CO_2 + aceite de *T. minuta* a T=313 K (fracción en peso en base libre de solvente).

	70 bar	**75 bar**	**80 bar**	**85 bar**	**90 bar**	**95 bar**	**100 bar**
β-pineno	0.038	0.031	0.034	0.029	0.029	0.022	0.017
d-limoneno	0.174	0.162	0.166	0.154	0.149	0.133	0.103
E-ocimeno	0.600	0.583	0.605	0.558	0.535	0.483	0.358
dihidrotagetona	0.047	0.034	0.035	0.031	0.032	0.029	0.022
E-tagetona	-	0.008	-	0.017	0.010	0.009	0.008
Z-tagetona	-	0.019	0.016	0.006	0.019	0.022	0.021
Z-ocimenona	0.054	0.042	0.034	0.039	0.049	0.053	0.092
E-ocimenona	0.049	0.087	0.086	0.121	0.157	0.201	0.353
otros (<1%)	0.038	0.035	0.025	0.046	0.020	0.049	0.027
TOTAL MT	0.849	0.810	0.830	0.779	0.732	0.667	0.481
TOTAL OT	0.151	0.190	0.170	0.221	0.268	0.333	0.519

Tabla 6.2. Composición de la fase extracto para CO_2 + aceite de *T. minuta* a T=323 K (fracción en peso en base libre de solvente).

	70 bar	**80 bar**	**90 bar**	**100 bar**	**110 bar**	**120 bar**
β-pineno	0.041	0.034	0.040	0.032	0.025	0.015
d-limoneno	0.190	0.169	0.194	0.186	0.147	0.110
E-ocimeno	0.601	0.607	0.640	0.551	0.495	0.381
dihidrotagetona	0.033	0.033	0.032	0.025	0.022	0.023
E-tagetona	0.010	0.022	-	0.017	0.018	0.015
Z-tagetona	0.011	-	-	0.007	0.014	0.019
Z-ocimenona	0.023	0.032	0.012	0.033	0.067	0.088
E-ocimenona	0.029	0.076	0.024	0.103	0.198	0.331
otros (<1%)	0.063	0.028	0.058	0.096	0.064	0.018
TOTAL MT	0.895	0.837	0.932	0.851	0.733	0.521
TOTAL OT	0.105	0.163	0.068	0.149	0.267	0.479

Puede observarse que el comportamiento de los distintos componentes del aceite sigue dos tendencias principales: algunos de ellos (más volátiles) tienden a enriquecerse en la fase extracto con respecto a su composición en la mezcla original, mientras que otros (menos volátiles) tienden a empobrecerse, enriqueciéndose en la fase líquida. Este comportamiento puede observarse de manera más gráfica en la Figura 6.2, que muestra los ***coeficientes de distribución*** de los principales componentes en base libre de solvente (K'_i), en función de las condiciones de presión y temperatura analizadas. Para el cálculo de dichos valores, se estimó la composición de la fase líquida mediante balances de masa. Como puede observarse, los dos comportamientos mencionados se traducen en valores de K'_i mayores y menores a 1, respectivamente.

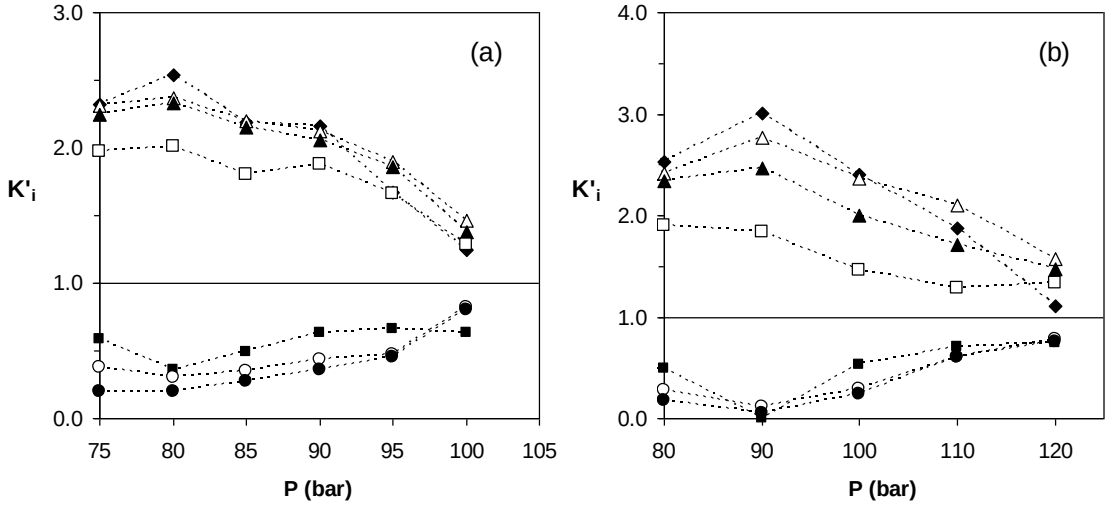


Figura 6.2. Coeficientes de distribución en base libre de solvente (K'_i) para el sistema CO_2 + aceite de *T. minuta* para (a) T=313 K, (b) T=323 K. (◆) β-pineno, (△) limoneno, (▲) ocimeno, (□) dihidrotagetona, (■) tagetonas, (○) Z-ocimenona, (●) E-ocimenona.

Por otra parte, se observa que a medida que aumenta la presión (y la capacidad del solvente) la composición de los extractos se aproxima a la composición original del aceite, y los valores de K'_i tienden a 1.

El análisis de los K'_i por componente brinda justificación experimental al tratamiento propuesto de este aceite como un sistema pseudo-binario, así como la selección de componentes clave para definir la separación. Se observan dos grupos de componentes con comportamiento claramente diferenciado, correspondientes al grupo de MT ($K'_i > 1$) y OT ($K'_i < 1$) respectivamente, con la única excepción de la dihidrotagetona, que aunque funcionalmente es un OT se comporta como los MT desde el punto de vista de la

volatilidad. Los componentes de mayor actividad biocida (tagetonas y ocimenonas), correspondientes a la fracción de OT, tienden a enriquecerse en la fase líquida.

Con respecto a las predicciones del modelo GC-EOS, la Figura 6.3 muestra los valores calculados de composición de la fase extracto (en base libre de solvente) en el rango de condiciones estudiado, considerando el aceite como un sistema pseudo-binario constituido por ocimeno y ocimenona, junto con los valores experimentales globales. Se muestra sólo la fracción de MT, ya que la otra fracción puede obtenerse simplemente por diferencia. Como se ha mencionado anteriormente, los cálculos fueron realizados con la subrutina GCTHREE y utilizando en cada punto la composición global del sistema estimada en función del volumen de la celda y la densidad del solvente.

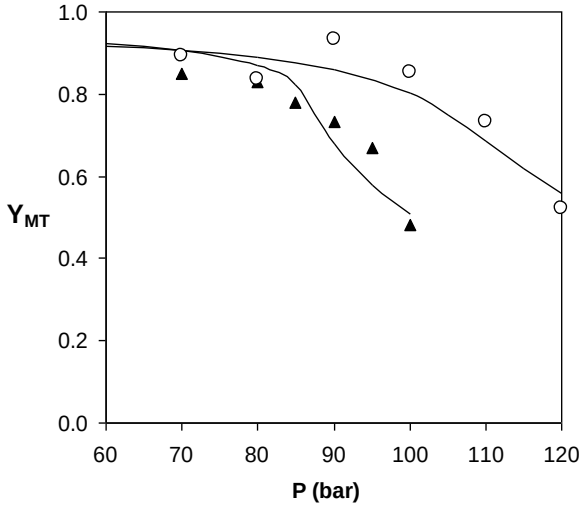


Figura 6.3. Composición de la fase extracto (fracción en peso de MT en base libre de solvente) para CO_2 + aceite de *T. minuta*. (▲) T=313 K, (○) T=323 K, (–) predicción GC-EOS.

Como puede observarse, el modelo predice en forma correcta el comportamiento observado experimentalmente en el rango estudiado, no sólo cualitativa sino también cuantitativamente, confirmando la validez de la utilización del enfoque de pseudo-componentes.

El análisis de los resultados indica que *existe un compromiso entre la capacidad del solvente y la selectividad de la separación*. En efecto, a medida que aumenta la capacidad (al incrementar la presión y/o la densidad del solvente), la fracción de MT en el extracto se reduce. Se ha señalado que la selectividad de la separación está determinada por la volatilidad relativa (α_{ij}) entre los componentes a separar. Las Figuras 6.4 (a) y (b) muestran paralelamente la evolución de los valores de α_{ij} de los MT con respecto a los OT (obtenidos a partir de la información experimental, así como los valores predichos por

el modelo) y de la solubilidad global en función de la presión de operación, para las dos temperaturas estudiadas.

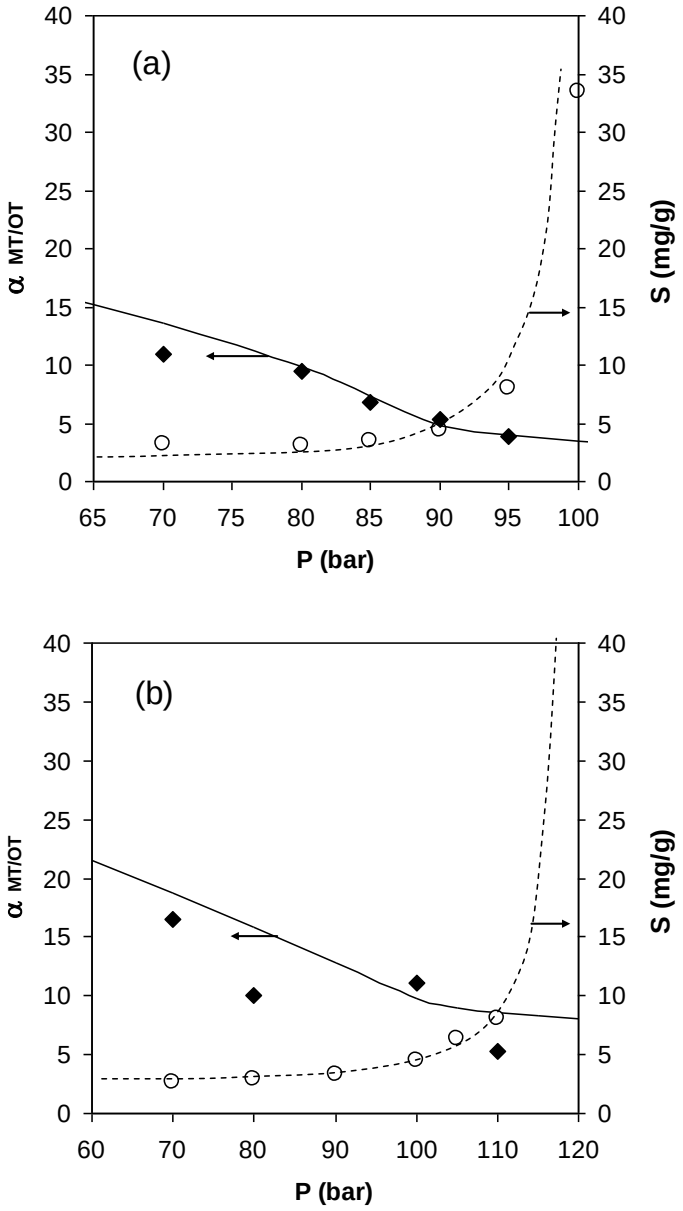


Figura 6.4. Selectividad y solubilidad global para el sistema CO_2 + aceite de *T. minuta:*
(a) T= 313 K, (b) T=323 K. (◆) Volatilidad relativa de MT con respecto a OT, (○) solubilidad global, (—) predicción GC-EOS, (---) línea de tendencia.

Como puede observarse, la volatilidad relativa entre MT y OT disminuye con la presión, de manera inversa a la solubilidad. Es decir, para lograr una buena separación es preciso operar en el rango de presiones más bajas, región en que la solubilidad es también baja, requiriéndose un elevado caudal de CO_2.

De todos modos, se observa que los valores de α_{ij} para este sistema son altos (llegan a 15 para algunas condiciones), lo cual indica que la separación entre MT y OT es factible con relativa facilidad. Una columna contracorriente simple podría ser suficiente para obtener un refinado de OT de alta pureza y bioactividad sin pérdidas significativas en el extracto.
Los resultados son comparables en términos generales a los obtenidos por Tomova y col. mediante fraccionamiento de aceite de *T. minuta* por destilación al vacío [1]. Estos autores separaron un aceite que contenía aproximadamente 60% de MT, 38% de OT y 2% de ST en tres fracciones de distinto rango de ebullición (303–313 K, 313–323 K y 323–333 K) y un residuo, operando a una presión de 1 mmHg. La Figura 6.5 muestra la composición relativa de cada fracción, observándose cómo disminuye la relación MT/OT en el destilado a medida que aumenta la temperatura de ebullición.

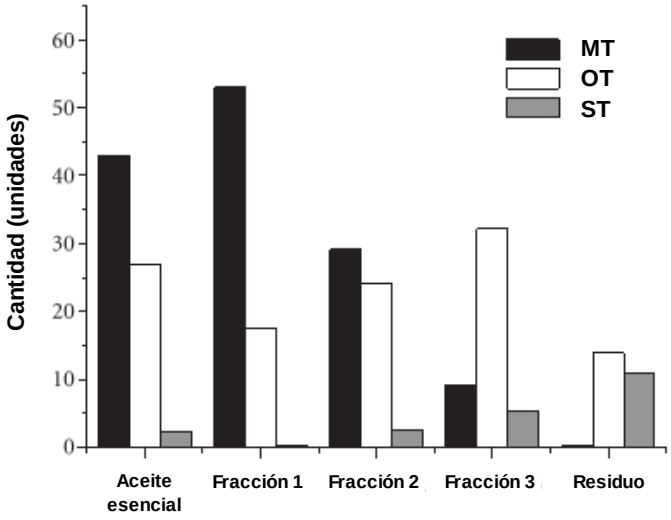


Figura 6.5. Composición relativa de aceite esencial de *T. minuta* y fracciones obtenidas por destilación al vacío [1].

6.1.2. Sistema CO_2 + aceite de S. officinalis

La Figura 6.6 muestra las isotermas de ***solubilidad*** de este aceite en la fase vapor o extracto. Al igual que en el caso del aceite de *T. minuta*, se observa un incremento aproximadamente exponencial de la solubilidad con la presión y con la densidad del CO_2 puro.

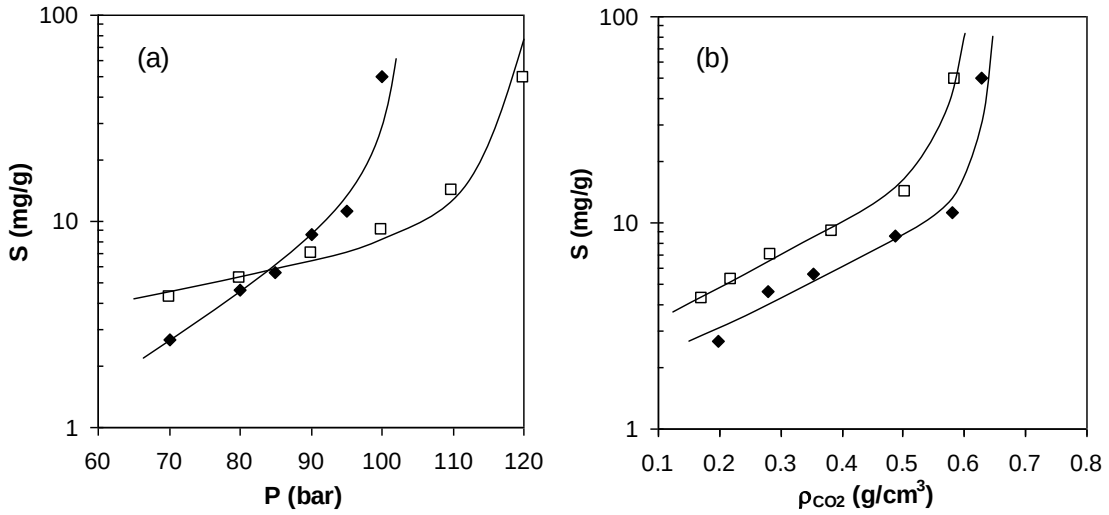


Figura 6.6. Solubilidad global de aceite de *S. officinalis* en CO_2 : (a) en función de la presión, (b) en función de la densidad de CO_2 puro. (◆) T=313 K, (□) T=323 K, (—) líneas de tendencia.

Con respecto a la dependencia con la temperatura, puede observarse en la Figura (a) el fenómeno de *"cross-over"* referido en el Capítulo 2, es decir, la inversión del comportamiento de la solubilidad, manifestada como una intersección de las isotermas. En el caso de este aceite, el punto de inversión de la solubilidad está en torno a 85 bar. A presiones menores, predomina el efecto de la temperatura sobre la presión de vapor de los solutos, incrementando la solubilidad; a presiones mayores, predomina el efecto sobre la densidad del solvente, reduciendo la solubilidad.

Por otra parte, en la Figura (b) puede analizarse por separado el efecto de la densidad del solvente y de la temperatura, observándose que a igual densidad la capacidad aumenta con la temperatura. En esta representación, la intersección de las isotermas lógicamente desaparece.

La ***composición*** de la fase extracto, en términos de los principales componentes en base libre de solvente, se muestra en la Tabla 6.3. Se indican también los valores globales de monoterpenos hidrocarbonados (MT), monoterpenos oxigenados (OT) y sesquiterpenos (ST), fracciones constitutivas de este aceite.

En este caso, puede comprobarse que la fase extracto es más rica en MT que el aceite original, como es esperable, aunque la separación es menos marcada que para el aceite de *T. minuta*. Asimismo, a medida que aumenta la presión la fase extracto se enriquece en los componentes menos volátiles (OT y ST), hasta aproximarse a la composición global en los límites de la región bifásica.

Tabla 6.3. Composición de la fase extracto para CO_2 + aceite de *S. officinalis* a T=313 K (fracción en peso en base libre de solvente).

	70 bar	**80 bar**	**85 bar**	**90 bar**	**95 bar**
α-pineno	0.226	0.219	0.221	0.170	0.132
canfeno	0.121	0.118	0.124	0.098	0.079
β-pineno	0.049	0.045	0.038	0.039	0.027
mirceno	0.030	0.024	0.026	0.026	0.020
1,8-cineol	0.109	0.101	0.099	0.097	0.082
α-tuyona	0.232	0.239	0.283	0.328	0.377
β-tuyona	0.045	0.048	0.056	0.067	0.076
alcanfor	0.065	0.080	0.089	0.110	0.134
β-cariofileno	0.006	0.006	0.005	0.011	0.020
α-cariofileno	0.006	0.003	-	0.008	0.017
otros (<1%)	0.112	0.117	0.060	0.046	0.035
TOTAL MT	0.514	0.489	0.451	0.365	0.281
TOTAL OT	0.474	0.503	0.546	0.615	0.682
TOTAL ST	0.012	0.010	0.005	0.020	0.037

El análisis de los ***coeficientes de distribución*** en base libre de solvente (K'_i), cuya evolución puede verse en la Figura 6.7, muestra un grupo de componentes con K'_i >1 (correspondiente a los MT), otro grupo con K'_i <1 (correspondiente a los OT) y otro con valores de K'_i <<1 (correspondiente a los ST). La única excepción a esta distinción es el 1,8-cineol, que a pesar de ser químicamente un OT se comporta como un MT desde el punto de vista de la volatilidad. Este comportamiento ya ha sido observado por otros autores. Matos y col. [2] han reportado datos experimentales de equilibrio líquido-vapor de limoneno y 1,8-cineol en CO_2 supercrítico (en sistemas binarios), observando que las solubilidades de ambos componentes son prácticamente iguales. Estos autores también han demostrado que el uso de una mezcla azeotrópica de CO_2 y etano no introduce ninguna diferencia significativa en la solubilidad de estos compuestos. Por su parte, Francisco y col. [3] estudiaron la separación de una mezcla equimolar de limoneno y 1,8-cineol con CO_2 supercrítico, en el contexto del fraccionamiento de aceite esencial de eucalipto, observando que la composición de la fase vapor era prácticamente igual a la composición de la mezcla, es decir que el CO_2 no muestra selectividad por ninguno de los dos compuestos.

En el caso del aceite de *S. officinalis*, este comportamiento explica que la proporción de OT en la fase extracto sea mayor que la esperable o, en otros términos, que la separación entre MT y OT no sea tan marcada. Este aumento debe ser atribuido al enriquecimiento

del 1,8-cineol en la fase vapor. Sin embargo, puesto que la fracción de MT está compuesta principalmente por α- y β-pineno, cuya volatilidad es algo mayor que la de limoneno, es factible obtener algún grado de separación entre estos componentes y 1,8-cineol, como se verá más adelante.

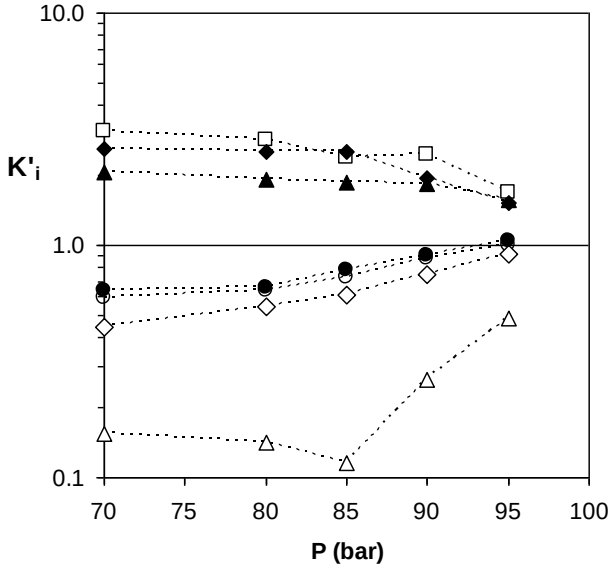


Figura 6.7. Coeficientes de distribución en base libre de solvente (K'_i) para el sistema CO_2 + aceite de *S. officinalis* para T=313 K. (□) β-pineno, (◆) α-pineno, (▲) 1,8-cineol, (●) α-tuyona, (○) β-tuyona, (◇) alcanfor, (△) β-cariofileno

La Figura 6.8 muestra la composición de la fase extracto en términos de MT, OT y ST en las condiciones estudiadas, tanto los valores experimentales como los calculados por el modelo, observándose una buena concordancia.

En este caso, se observa el mismo compromiso entre selectividad y capacidad que en el fraccionamiento de aceite de *T. minuta*. En la Figura 6.9 puede analizarse paralelamente el comportamiento de la volatilidad relativa de la fracción de MT con respecto a los demás componentes (OT+ST) y de la solubilidad global en la fase extracto. Los valores de α_{ij}, que varían entre 5 y 1 aproximadamente, disminuyendo con la presión, anticipan una mayor dificultad en la separación.

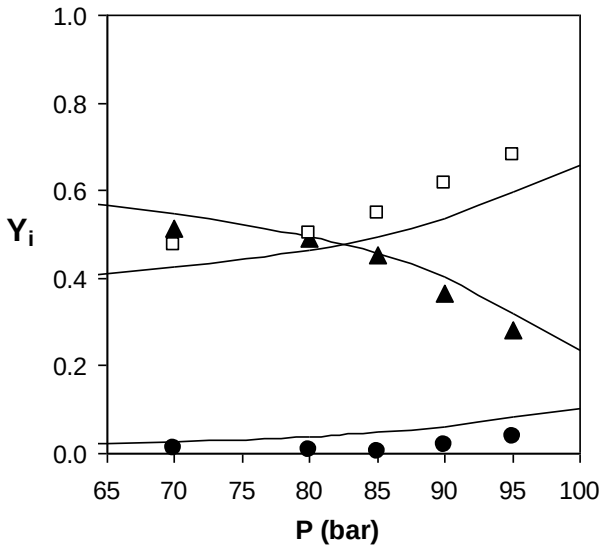


Figura 6.8. Composición de la fase extracto (fracción en peso en base libre de solvente) para CO_2 + aceite de *S. officinalis*, T=313 K. (▲) MT, (□) OT, (●) ST, (–) predicción GC-EOS.

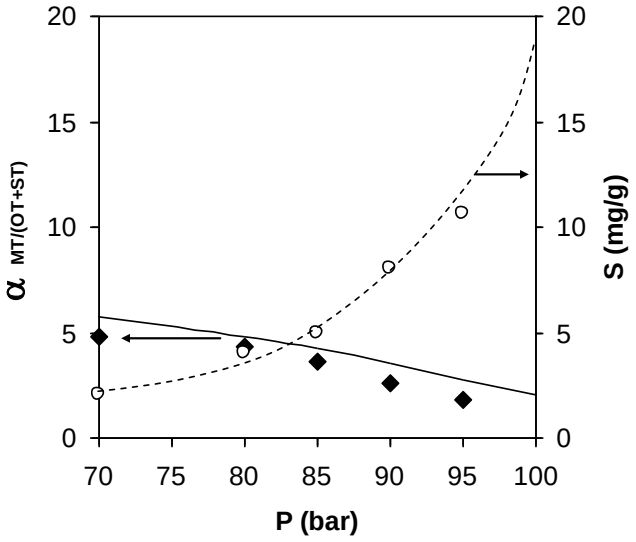


Figura 6.9. Selectividad y solubilidad global para el sistema CO_2 + aceite de *S. officinalis* a T= 313 K. (◆) Volatilidad relativa de MT con respecto a OT+ST, (○) solubilidad global, (—) predicción GC-EOS, (---) línea de tendencia.

La presencia de una cantidad significativa de ST es un elemento adicional a la hora de analizar el comportamiento de este sistema, ya que introduce un esquema más complejo de interacciones.

6.1.3. Sistema CO_2 + aceite de M. piperita

De manera similar a los casos anteriores, la Figura 6.10 muestra las isotermas de solubilidad global del aceite de *M. piperita* para 313 y 323 K en función de la presión y de la densidad del CO_2 puro. La tendencia exponencial observada es semejante a la reportada para los otros aceites. Se observa el referido fenómeno de *cross-over*, con una

presión de inversión en torno a 85-90 bar. Al representar los resultados en función de la densidad del solvente, se observa el efecto positivo de la temperatura en la solubilidad de forma separada.

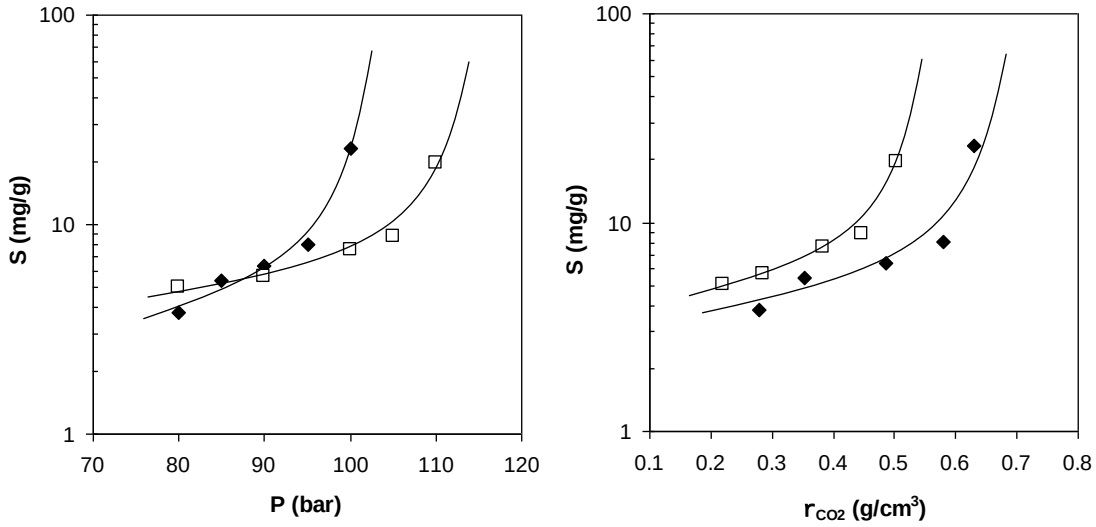


Figura 6.10. Solubilidad global de aceite de *M. piperita* en CO_2 : (a) en función de la presión, (b) en función de la densidad de CO_2 puro. (◆) T=313 K, (□) T=323 K, (—) líneas de tendencia.

La ***composición*** de la fase vapor o extracto se detalla en las Tablas 6.4 y 6.5 para los componentes principales del aceite. Analizando los resultados, se verifica que algunos componentes se enriquecen en el extracto con respecto a la fase líquida, mientras que otros siguen un comportamiento inverso. La Figura 6.11 muestra el fenómeno en términos de los ***coeficientes de distribución*** en base libre de solvente. La diferencia observada permite la distinción entre dos fracciones: una que incluye los componentes que exhiben K'_i >1 (F1) y otra que agrupa los componentes con K'_i <1 (F2). Como puede verse, estas fracciones no se corresponden con la división utilizada anteriormente entre MT, OT y ST, ya que el aceite está constituido principalmente por OT de distinta volatilidad, con pequeñas cantidades de MT y ST. La selección de isomentona (K'_i >1) y *l*-mentol (K'_i <1) como componentes clave responde al mismo criterio, aunque como puede verse sus volatilidades son muy cercanas en todo el rango estudiado.

Tabla 6.4. Composición de la fase extracto para CO_2 + aceite de *M. piperita* a T=313 K (fracción en peso en base libre de solvente).

	80 bar	**85 bar**	**90 bar**	**95 bar**	**100 bar**
terpinil acetato	0.027	0.034	0.028	0.028	0.018
1,8-cineol	0.095	0.113	0.096	0.102	0.066
isomentona	0.021	0.022	0.021	0.024	0.019
mentofurano	0.195	0.211	0.193	0.127	0.141
l-mentol	0.231	0.236	0.235	0.252	0.281
mentil acetato	0.327	0.340	0.329	0.376	0.382
β-cariofileno	0.004	-	0.003	0.007	0.013
otros (<1%)	0.102	0.044	0.095	0.084	0.081
TOTAL F1	0.390	0.396	0.384	0.319	0.263
TOTAL F2	0.610	0.604	0.616	0.681	0.737

Tabla 6.5. Composición de la fase extracto para CO_2 + aceite de *M. piperita* a T=323 K (fracción en peso en base libre de solvente).

	80 bar	**90 bar**	**100 bar**	**110 bar**
terpinil acetato	0.019	0.033	0.029	0.014
1,8-cineol	0.119	0.104	0.103	0.056
isomentona	0.020	0.019	0.022	0.019
mentofurano	0.169	0.167	0.186	0.163
l-mentol	0.202	0.240	0.225	0.284
mentil acetato	0.309	0.337	0.322	0.372
β-cariofileno	0.011	0.007	0.007	0.013
otros (<1%)	0.151	0.093	0.105	0.079
TOTAL F1	0.411	0.379	0.397	0.272
TOTAL F2	0.589	0.621	0.603	0.728

La Figura 6.12 muestra la composición de la fase extracto en términos de la fracción más volátil (F1). La otra fracción puede obtenerse simplemente por diferencia. Se muestran también las predicciones del modelo GC-EOS, considerando el aceite como un sistema pseudo-binario (mentona+mentol). Se observa una buena concordancia entre los valores experimentales y calculados en todo el rango estudiado.

Como puede verse, el nivel de separación entre fracciones es bajo. La fase extracto tiene una composición muy cercana a la del líquido, con un leve enriquecimiento de los componentes de la fracción F1. La temperatura no tiene un efecto significativo sobre la

separación, sólo extiende la región bifásica de operación hacia regiones de mayor presión, como en los casos anteriores.

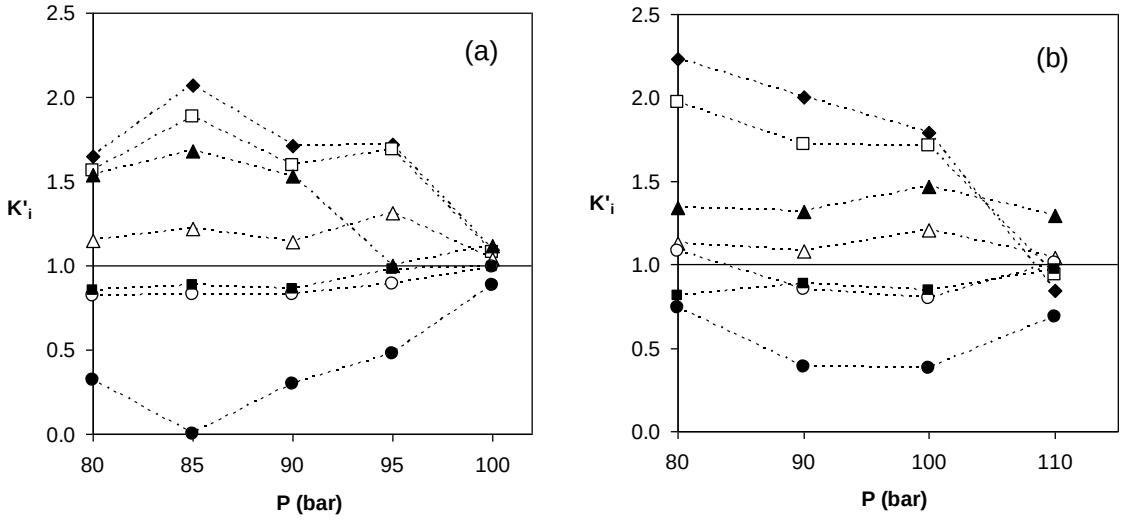


Figura 6.11. Coeficientes de distribución en base libre de solvente (K'_i) para el sistema CO_2 + aceite de *M. piperita* para (a) T=313 K, (b) T=323 K. (◆) terpinil acetato, (□) 1,8-cineol, (▲) mentofurano, (△) isomentona, (○) *l*-mentol, (■) mentil acetato, (●) β-cariofileno

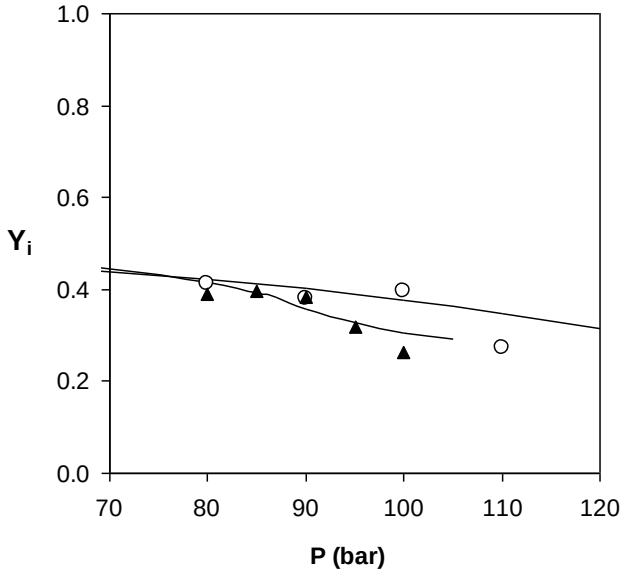


Figura 6.12. Composición de la fase extracto (fracción en peso de F1 en base libre de solvente) para CO_2 + aceite de *M. piperita*. (▲) T=313 K, (○) T=323 K, (–) predicción GC-EOS.

La volatilidad relativa entre fracciones puede verse en la Figura 6.13, paralelamente a la solubilidad global. Se observa el mismo tipo de compromiso entre ambas variables, pero en este caso la selectividad de la separación es mucho menor, presentando valores de α_{ij} entre 1 y 2.

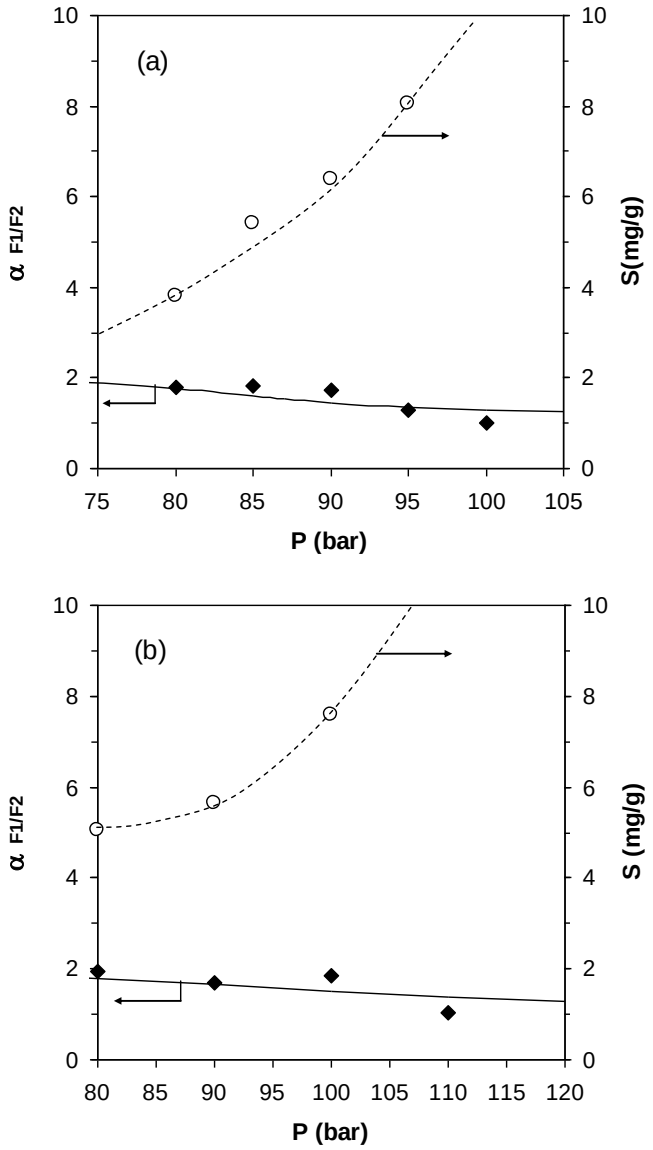


Figura 6.13. Selectividad y solubilidad global para el sistema CO_2 + aceite de *M. piperita:* (a) T= 313 K, (b) T=323 K. (◆) Volatilidad relativa de MT con respecto a OT, (○) solubilidad global, (—) predicción GC-EOS, (---) línea de tendencia.

6.1.4. Conclusiones y discusión. Volatilidad binaria vs. multicomponente

Los resultados presentados, además de confirmar las predicciones del modelo, permiten extraer algunas conclusiones aplicables al proceso de fraccionamiento.

Más allá de las diferencias en cada sistema, existe en todos los casos un compromiso entre la selectividad de la separación y la capacidad del solvente. Esto implica que para obtener productos de elevada pureza debe operarse en condiciones de baja densidad de

CO_2, lo cual implica un elevado requerimiento de caudal. Desde el punto de vista de la economía del proceso, esto torna obligatorio un análisis de optimización de las condiciones de operación, de modo de utilizar la menor cantidad posible de solvente compatible con las especificaciones de la separación, así como un adecuado sistema de recirculación.

Por otra parte, la buena concordancia entre los resultados experimentales y las predicciones del modelo confirma que la GC-EOS y el enfoque de pseudo-componentes son herramientas válidas y adecuadas para describir el comportamiento de fases de los sistemas multicomponente estudiados en esta tesis, y por lo tanto pueden utilizarse con confianza en la representación y simulación de procesos de fraccionamiento en columnas de etapas múltiples.

Con respecto a los sistemas individuales, los resultados indican que el grado de separación entre MT y OT en el aceite de *T. minuta* es elevado, obteniéndose una fracción de OT relativamente pura sin pérdidas importantes en la fase extracto. Una columna en contra-corriente simple podría ser suficiente para obtener fracciones de alta pureza. El aceite de *S. officinalis* representa un caso intermedio, con un grado de separación limitado. Esto sugiere un esquema más complejo de interacciones debido a la presencia de una cantidad significativa de ST y al comportamiento de 1,8-cineol, semejante a los MT. Finalmente, la separación entre las fracciones F1 y F2 del aceite de *M. piperita* es la más difícil de lograr: de hecho, la composición de los extractos es muy cercana a la del aceite original. Las volatilidades relativamente semejantes de mentona y *l*-mentol ayudan a explicar la dificultad de esta separación.

Se ha mencionado que es importante contar con información de equilibrio multicomponente, y no sólo con información binaria, a la hora de evaluar las volatilidades relativas en sistemas complejos. La estimación de la volatilidad relativa entre dos componentes o fracciones a partir de los respectivos K_i binarios (en mezclas con CO_2) puede dar una orientación preliminar, pero muchas veces no es adecuada para describir el comportamiento real de sistemas ternarios o multicomponente. La distribución de cada componente es afectada por la presencia de otros componentes, y este efecto puede ser significativo. Por ejemplo, la Figura 6.14 muestra el coeficiente de distribución K_i (experimental y predicho por el modelo) de α-pineno –el principal componente de la fracción de MT en el aceite de *S. officinalis*– en mezcla binaria con CO_2 [4] y en el sistema multicomponente estudiado en esta tesis, computado a partir de los resultados

cromatográficos individuales para α-pineno. En el último caso, se observa un cambio significativo en el comportamiento de la volatilidad a presiones mayores a 80 bar. La presencia de mayores cantidades de ST en la fase extracto, debido a la mayor densidad del solvente, extiende la región de dos fases hacia zonas de presión mayor, en las que el α-pineno sería totalmente miscible con CO_2 en mezclas binarias. El comportamiento de este componente particular puede extenderse a los otros componentes de la fracción de MT con conclusiones similares.

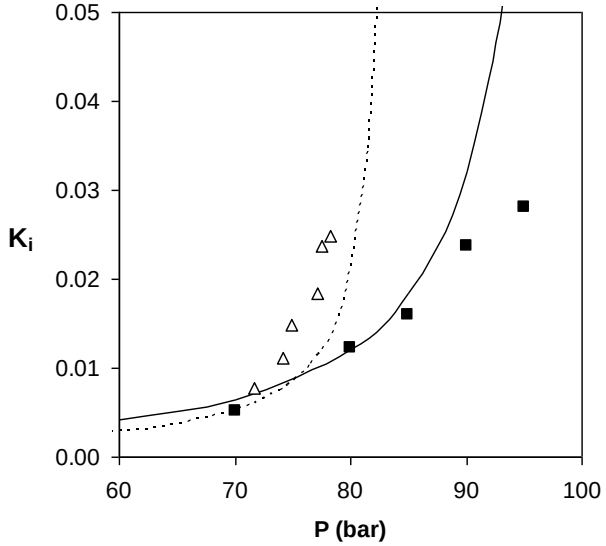


Figura 6.14. Coeficiente de distribución (K_i) de α-pineno en CO_2 a T=313 K.
Binario:
(△) valores experimentales [4],
(- - -) predicción GC-EOS.
Multicomponente:
(■) valores experimentales (esta tesis),
(—) predicción GC-EOS.

6.2. Fraccionamiento semicontinuo

6.2.1. Ensayos y cálculos

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron condiciones adecuadas para realizar ensayos de fraccionamiento semicontinuo en condiciones fijas de presión y temperatura. En base a un equilibrio entre selectividad y solubilidad se decidió hacer ensayos a 313 K y 80 bar. Se ensayaron sólo los aceites de *S. officinalis* y *T. minuta*. debido a la dificultad de obtener un grado de separación apreciable para el aceite de *M. piperita* en el equipo experimental disponible.

Se siguió el procedimiento detallado en el Capítulo 4, tomando extractos sucesivos a lo largo del tiempo y determinando la evolución de las siguientes variables:

- composición del extracto (instantánea y acumulada)
- composición del refinado
- volatilidad relativa de MT respecto de OT/ST
- recuperación de MT, OT y ST en ambas fases

La composición del refinado se calculó mediante balances de masa en base libre de solvente, y dicho dato se utilizó para estimar valores de volatilidad relativa y de recuperación en ambas fases a lo largo del proceso.

Como indicador del avance del proceso de fraccionamiento se utilizó el porcentaje de la masa inicial de aceite extraída en la corriente de CO_2 (% de extracción) y el consumo específico de solvente, expresado como la masa de CO_2 acumulada, normalizada con respecto a la masa inicial de aceite (m_{CO2}/m_{aceite}).

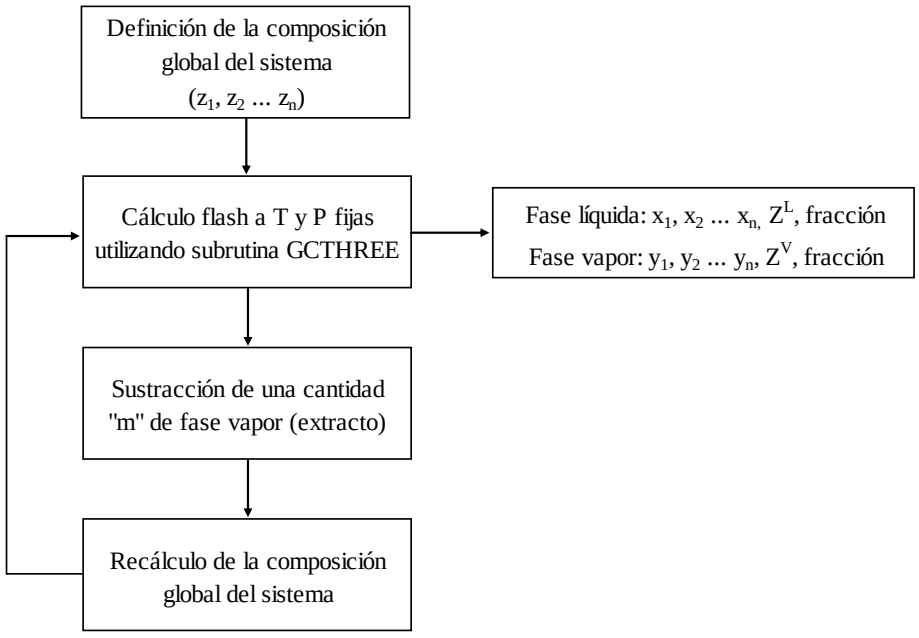


Figura 6.15. Esquema de cálculo para la simulación del fraccionamiento semicontinuo utilizando el modelo GC-EOS.

Por otra parte, los experimentos de fraccionamiento semicontinuo se simularon utilizando el modelo GC-EOS, utilizando el tratamiento matemático de una destilación *batch* de una única etapa o "destilación diferencial" (ecuación de Rayleigh). El procedimiento de cálculo consistió en una secuencia de cálculos flash a temperatura y presión fijas, utilizando la subrutina GCTHREE, y recalculando en cada paso la composición global del

sistema, como se muestra en el esquema de la Figura 6.15. Para ello se substrae del sistema una cantidad *m* de fase extracto en cada intervalo de extracción y se aplica un nuevo balance de masa. El tamaño del paso (determinado por la cantidad extraída *m*) se redefine en cada cálculo, de acuerdo a la sensitividad de la variable composición en cada punto. En este esquema de cálculo, las volatilidades relativas son recalculadas en cada etapa.

6.2.2. Fraccionamiento de aceite de T. minuta

La Tabla 6.6 muestra la composición de la fase extracto (instantánea) y la composición del extracto acumulado en función del avance del proceso de fraccionamiento, en términos de las fracciones de MT y OT en base libre de solvente, determinada mediante análisis cromatográfico (GC-FID).

Tabla 6.6. Composición de la fase extracto y del extracto acumulado en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *T. minuta* con CO_2 a 313 K y 80 bar.

		Extracto (puntual)		Extracto (acumulado)	
% extracción	m_{CO2}/m_{aceite}	MT	OT	MT	OT
6.0	14.8	0.838	0.162	0.838	0.162
11.8	31.6	0.846	0.154	0.842	0.158
17.2	48.0	0.847	0.153	0.843	0.157
22.2	64.1	0.826	0.174	0.840	0.160
25.9	78.2	0.786	0.214	0.832	0.168
29.9	91.2	0.704	0.296	0.815	0.185
34.4	103.7	0.573	0.427	0.783	0.217
38.9	116.4	0.424	0.576	0.742	0.258
42.7	129.5	0.310	0.690	0.709	0.291
45.9	140.9	0.151	0.849	0.670	0.330
49.0	153.0	0.076	0.924	0.632	0.368
52.4	158.4	0.027	0.973	0.592	0.408

Los resultados experimentales de la composición de la fase extracto se muestran también en la Figura 6.16, junto con las predicciones del modelo. Se muestra sólo la fracción de MT, ya que la fracción de OT puede obtenerse simplemente por diferencia. Como puede observarse, los extractos son inicialmente más ricos en MT que los aceites originales, confirmando los valores obtenidos en los experimentos previos. Luego, a medida que los

MT son removidos por la corriente de CO_2, los extractos se vuelven cada vez más ricos en OT. A los fines comparativos, se realizó también una simulación utilizando una volatilidad relativa *constante* a lo largo de todo el proceso (igual a su valor inicial), computándose cada paso mediante una expresión derivada de la ecuación de Rayleigh, que describe el avance de un proceso de destilación batch de un sistema binario [5]:

$$\ln\left(\frac{W_0}{W}\right) = \frac{1}{\alpha - 1}\left[\ln\left(\frac{x_0}{x}\right) + \alpha \ln\left(\frac{1-x}{1-x_0}\right)\right]$$

en donde W y x son los moles de líquido y la composición de la fase líquida en un momento dado del proceso, respectivamente, y W_0 y x_0 representan los valores iniciales (para t=0). Comparando ambas curvas, se observa que el uso de una volatilidad relativa *variable* (dependiente de la composición) en los cálculos del modelo mejora la descripción del comportamiento del sistema, sobre todo en la primera parte del proceso.

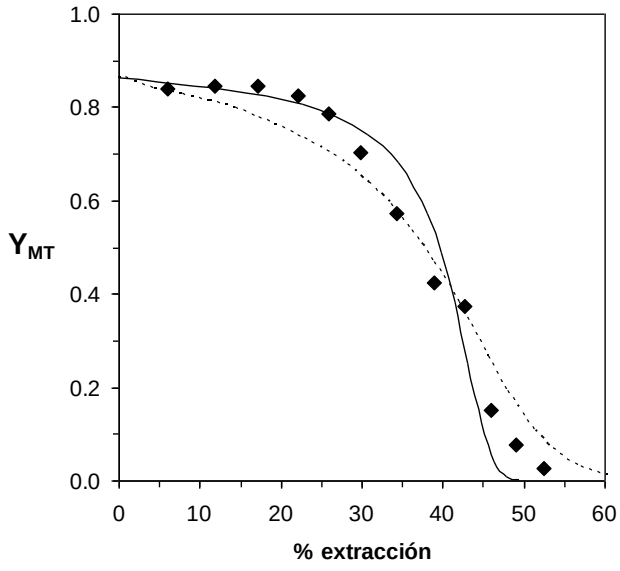


Figura 6.16. Composición de la fase extracto (fracción en peso de MT en base libre de solvente) en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *T. minuta*, a T=313 K y P=80 bar. (◆) valor experimental (esta tesis). (—) predicción GC–EOS usando volatilidad relativa *variable*. (- -) predicción GC–EOS usando volatilidad relativa *constante*.

A su vez, la información obtenida permite inferir cómo evoluciona la composición de la fase líquida o refinado a lo largo del proceso, estimada mediante un balance de masa por fracción. Los resultados y las predicciones del modelo se muestran en la Figura 6.17, en términos de concentración de OT en el refinado (X_{OT}) en base libre de solvente.

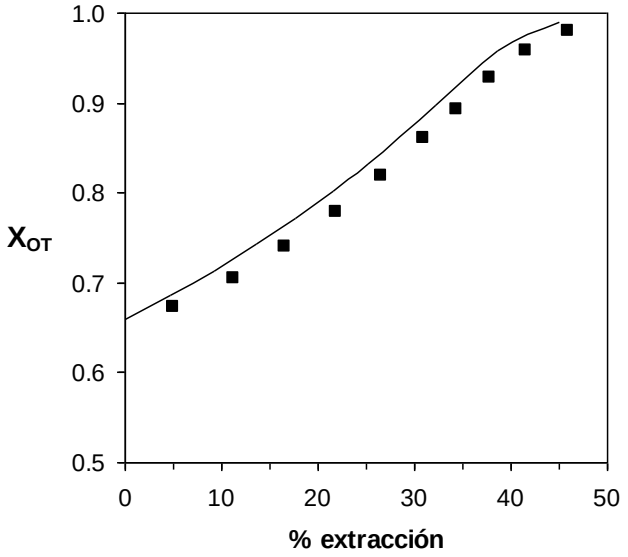


Figura 6.17. Composición de la fase refinado (fracción en peso de OT en base libre de solvente) en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *T. minuta*, a T=313 K y P=80 bar. (■) valor experimental (esta tesis), (—) predicción GC–EOS.

Los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID del aceite alimentado, un extracto rico en MT y el refinado final obtenido pueden verse en la Figura 6.18, a modo de ejemplo. Se indican los picos principales.

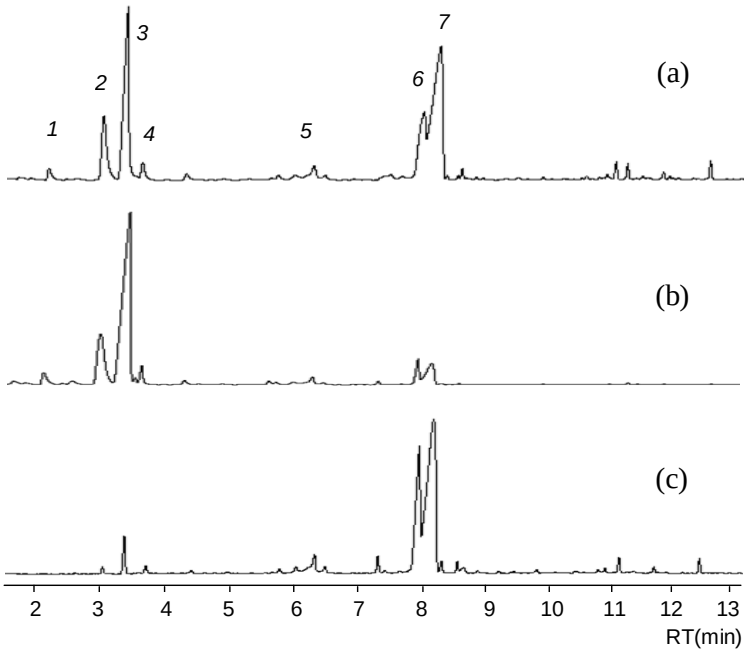


Figura 6.18. Perfiles cromatográficos (GC-FID) de (a) aceite de *T. minuta*, (b) extracto inicial rico en MT y (c) aceite desterpenado (refinado). Picos principales: 1. β-pineno, 2. d-limoneno, 3. E-β-ocimeno, 4. dihidrotagetona, 5. tagetonas, 6. Z-ocimenona, 7. E-ocimenona.

El proceso de fraccionamiento semicontinuo produce un extracto con más de 80% de MT durante la primera parte (hasta un 25% de extracción del aceite); luego la concentración de MT disminuye rápidamente en la fase extracto hasta su agotamiento casi total, una vez extraído el 50% de la masa inicial de aceite. Esto significa que puede obtenerse un refinado rico en OT sin pérdidas significativas de esta fracción: al final del experimento, el refinado obtenido (*2-fold*, es decir, concentrado a la mitad del volumen inicial) tiene 95% de OT, con una pérdida del 26% de OT en el extracto (o dicho de otro modo: una recuperación del 74%). Esto puede verse más fácilmente en la Figura 6.19, que muestra la masa extraída acumulada de MT y OT (como porcentaje de la masa inicial de cada fracción) en función del consumo específico de solvente (expesado como la masa acumulada de CO_2 dividido por la masa inicial de aceite). En esta representación, la pendiente de las curvas de extracción en el primer tramo del proceso pueden considerarse equivalentes a la solubilidad de cada fracción, y la suma de ambas representa la capacidad global del solvente en las condiciones de operación.

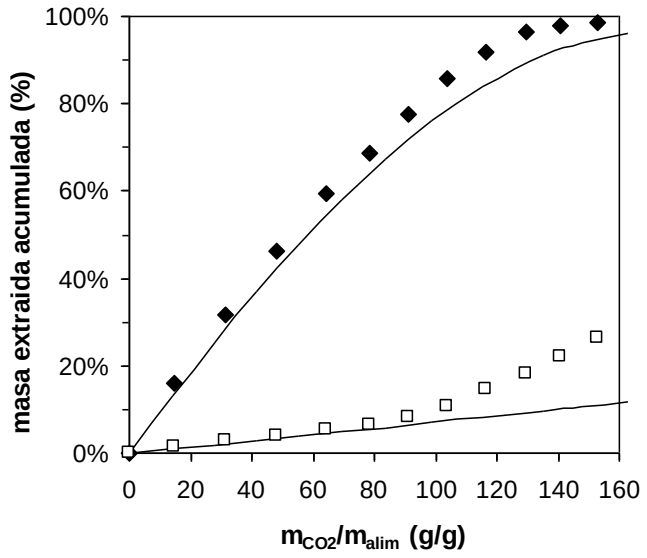


Figura 6.19. Masa extraída acumulada (%) vs. consumo de solvente en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *T. minuta* a T=313 K y P=80 bar. (◆) MT, (□) OT, (—) predicción GC–EOS.

Como puede verse, el modelo GC-EOS predice en forma correcta no sólo las condiciones iniciales de equilibrio, sino también la evolución de las composiciones a lo largo del proceso y las curvas de extracción, excepto en la última parte del proceso, correspondiente al agotamiento de los MT. En esta región, las desviaciones observadas pueden adjudicarse al hecho de que el modelo trata la fracción de OT como si fuera *E*-ocimenona pura, cuando en realidad está constituida también por otros compuestos cuya volatilidad es algo mayor. Asimismo, al agotarse los MT e incrementarse la cantidad de

OT en la fase vapor o extracto, la polaridad de dicha fase aumenta, facilitando la extracción de componentes oxigenados.

La buena concordancia entre los datos experimentales y calculados implica que el modelo GC-EOS representa en forma correcta la dependencia de las volatilidades relativas no sólo con respecto a la presión y la temperatura (como se vio en la Sección 6.1) sino también con respecto a la *composición* del sistema. Este aspecto es interesante cuando se modela procesos de separación en los que la composición del sistema varía: ya sea con respecto al tiempo (semicontinuos), con respecto a la posición a lo largo de la columna (fraccionamiento en estado estacionario) o bien a causa de variaciones en la composición del aceite alimentado, muy comunes en el caso de mezclas de origen natural.

Esta información se representa de manera gráfica en la Figura 6.20, en forma de diagrama X–Y (composición de MT en el refinado vs. composición en el extracto, en base libre de solvente), mostrando las condiciones de equilibrio para diferentes composiciones de la fase líquida. Este tipo de representación del equilibrio resulta útil a la hora de diseñar una columna, ya que permite obtener el número de etapas teóricas necesarias para una separación dada por medio del conocido método gráfico de McCabe-Thiele [5].

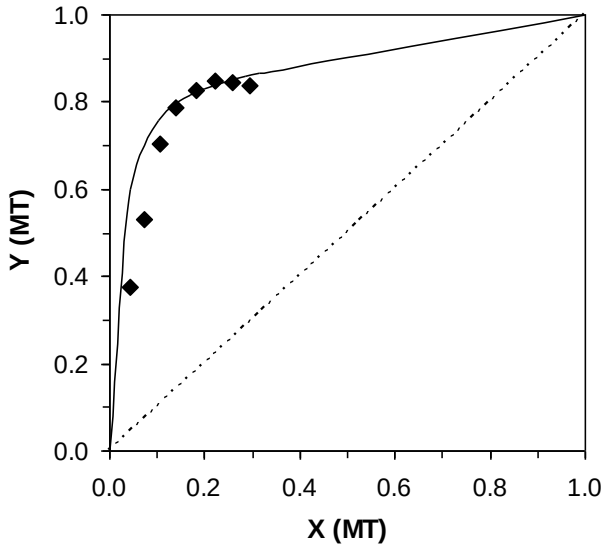


Figura 6.20. Composición de la fase extracto (Y) vs. composición de la fase refinado (X), en fracción de MT en base libre de solvente para el sistema CO_2 + aceite de *T. minuta* a T=313 K y P=80 bar: (◆) resultados experimentales, (—) predicción GC–EOS.

Las representaciones anteriores analizan el comportamiento de los solutos en base libre de solvente. La Figura 6.21, en cambio, muestra el diagrama *ternario* del sistema en las condiciones del ensayo, considerando las fracciones molares de los tres componentes (MT, OT y CO_2) a lo largo del ensayo. Sólo se muestran los puntos experimentales correspondientes a la composición de la fase vapor o supercrítica, ya que el ensayo no

permite determinar la cantidad de CO_2 disuelto en la fase líquida. Se muestran, en cambio, las predicciones del modelo para ambas fases, indicando algunas *tie lines*. Se observa que en estas condiciones el sistema presenta un comportamiento de tipo II, con miscibilidad parcial en los subsistemas binarios MT+CO_2 y OT+CO_2. Se observa también una buena concordancia con los resultados experimentales, excepto para fracciones molares de MT menores a 0.001, divergencia que ya fue mencionada previamente.

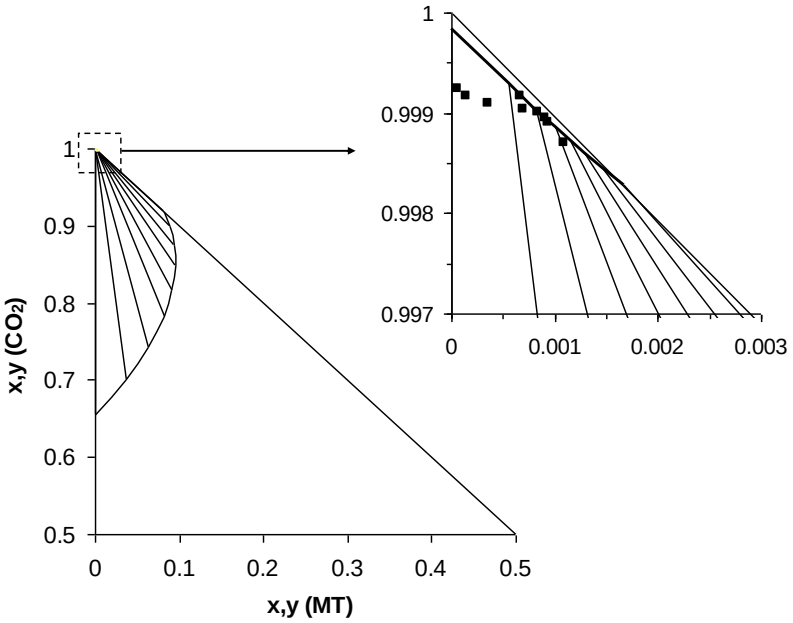


Figura 6.21. Diagrama ternario del sistema CO_2+aceite de *T. minuta* a T=313 K y P=80 bar. (■) Resultados experimentales, (—) predicciones GC-EOS.

6.2.3. Fraccionamiento de aceite de S. officinalis

De manera similar, la Tabla 6.7 muestra la composición de la fase extracto y la composición del extracto acumulado en cada punto del experimento, en términos de las fracciones de MT, OT y ST en base libre de solvente en función del avance del fraccionamiento del aceite de *S. officinalis*.

Por su parte, la Figura 6.22 muestra estos resultados en forma gráfica, junto con los valores calculados por el modelo.

Tabla 6.7. Composición de la fase extracto y del extracto acumulado en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *S. officinalis* con CO_2 a 313 K y 80 bar.

		Extracto (puntual)			Extracto (acumulado)		
% extracción	m_{CO2}/m_{aceite}	MT	OT	ST	MT	OT	ST
6.7	15.6	0.489	0.503	0.008	0.489	0.503	0.008
11.3	27.0	0.418	0.575	0.007	0.460	0.532	0.008
16.3	39.7	0.381	0.599	0.019	0.434	0.555	0.011
21.9	51.8	0.348	0.646	0.006	0.415	0.575	0.010
26.5	63.4	0.326	0.670	0.004	0.399	0.592	0.009
30.8	75.5	0.223	0.762	0.016	0.375	0.615	0.010
37.0	93.1	0.188	0.791	0.021	0.343	0.645	0.012

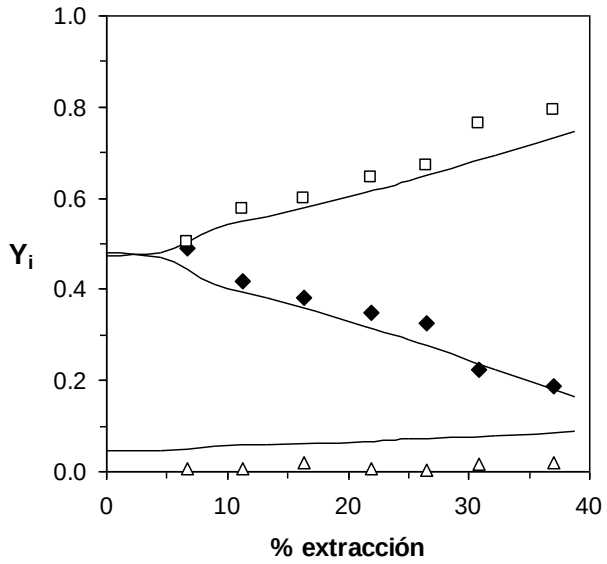


Figura 6.22. Composición de la fase extracto (en base libre de solvente) en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *S. officinalis*, a T=313 K y P=80 bar. (◆) MT, (□) OT, (△) ST, (—) predicción GC–EOS.

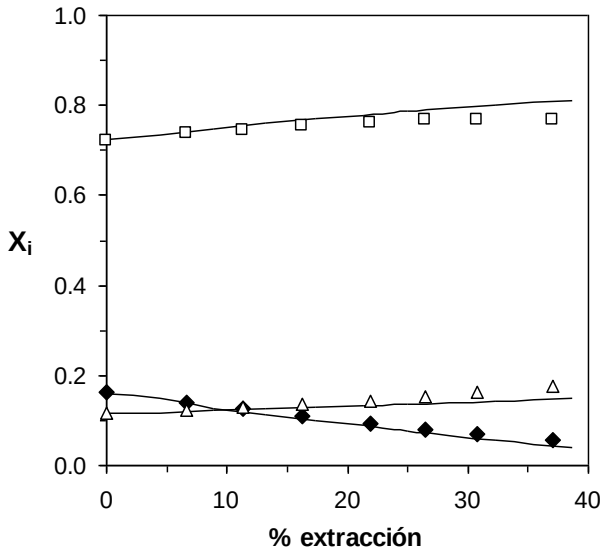


Figura 6.23. Composición de la fase refinado (en base libre de solvente) en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *S. officinalis*, a T=313 K y P=80 bar. (◆) MT, (□) OT, (△) ST, (—) predicción GC–EOS.

Como puede verse, los extractos sucesivos son más ricos en MT que el aceite original, confirmando las mediciones previas, aunque la concentración de OT es relativamente alta (más del 50%). El modelo predice en forma correcta la evolución de las composiciones, excepto para el caso de los ST, cuya concentración es sobrepredicha. Correlativamente, la proporción de MT en la fase líquida disminuye, reduciéndose a menos de 5% al final del experimento. Se obtiene así un refinado constituido casi íntegramente por OT y ST, como puede verse en la Figura 6.23, que muestra la evolución de la composición de la fase líquida a lo largo del proceso.

Es decir que la remoción de MT para purificar la fracción de mayor actividad biocida es factible en estas condiciones, pero la pérdida de OT en la fase extracto puede ser significativa. La Figura 6.24 muestra las curvas de extracción por fracción (masa extraida en función del solvente consumido, de manera normalizada), lo cual da una idea de la recuperación de las fracciones en el extracto. Allí puede verse, por ejemplo, que la remoción del 80% de MT implica la pérdida de un 33% de OT. Los ST prácticamente no son extraídos en la fase vapor, recuperándose casi totalmente en el refinado, aunque el modelo predice un grado de extracción mayor al observado.

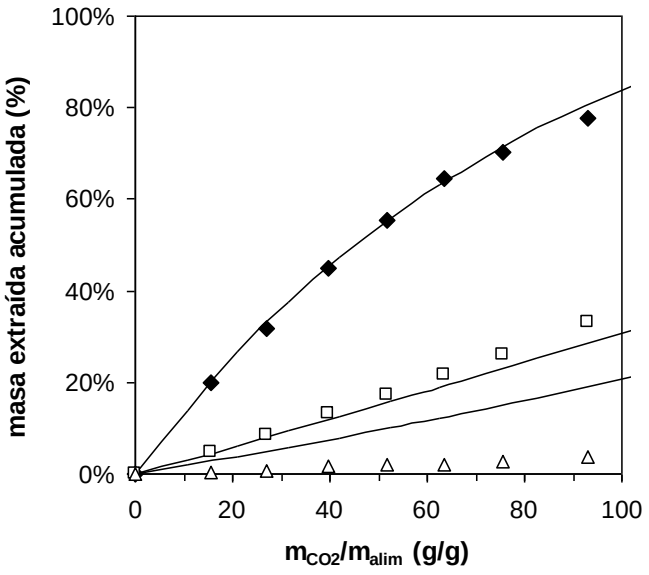


Figura 6.24. Masa extraída acumulada (%) vs. consumo de solvente en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *S. officinalis* a T=313 K y P=80 bar. (◆) MT, (□) OT, (△) ST, (—) predicción GC–EOS.

Como se ha mencionado para el caso del fraccionamiento de aceite de *T. minuta*, el experimento suministra también información de equilibrio para una composición variable de la fase líquida. Estos datos se presentan en la Figura 6.25 en forma de diagrama X–Y (curva de equilibrio para MT en base libre de solvente).

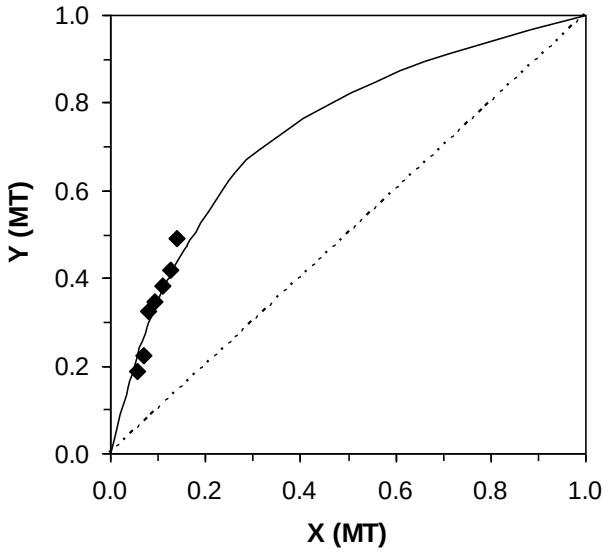


Figura 6.25. Composición de la fase extracto (Y) vs. composición de la fase refinado (X), en fracción de MT en base libre de solvente para el sistema CO_2 + aceite de *S. officinalis* a T=313 K y P=80 bar: (◆) resultados experimentales, (—) predicción GC–EOS.

Los resultados obtenidos en ambos ensayos son comparables a los datos reportados por otros autores en sistemas semi-continuos, especialmente en el caso del aceite de *T. minuta*, que constituye el caso de separación más nítida. Por ejemplo, los perfiles de composición de la fase extracto a lo largo del proceso (que pueden verse en las Figuras 6.16 y 6.21) muestran un comportamiento similar al observado en el desterpenado de aceite de limón reportado por Benvenuti y col. [6] y por Gironi y Maschietti [7], como se muestra en la Figura 6.26. En este caso, desde luego, el extracto es muy rico en MT durante gran parte del proceso, ya que también lo es el aceite alimentado, confirmando así el efecto de la composición del sistema en la selectividad de la separación.

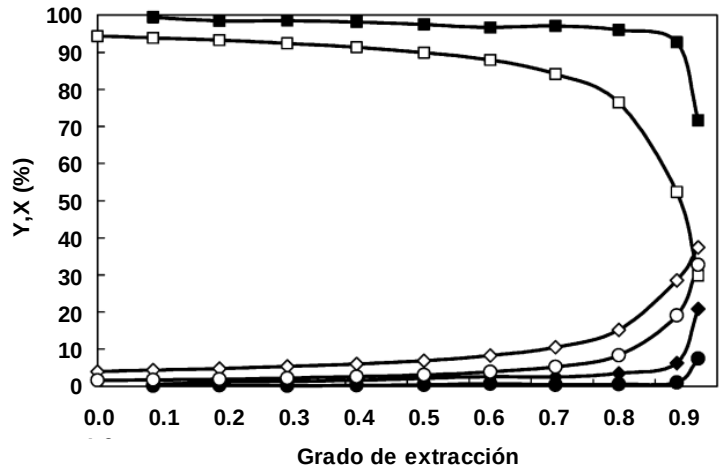


Figura 6.26. Fraccionamiento semi-continuo de aceite de limón con CO_2 (T=333 K, P=90 bar). Composición del extracto y del refinado durante el proceso. Extracto: (■) MT, (◆) OT, (●) ST. Refinado: (□) MT, (◇) OT, (○) ST. Adaptado de [7].

Las curvas de extracción acumulada (Figuras 6.19 y 6.24), por su parte, son semejantes a las obtenidas en el fraccionamiento de aceites cítricos por desorción selectiva con CO_2, como puede verse en la Figura 3.7 (presentada en el Capítulo 3).

6.2.4. Separación de isómeros y estereoisómeros

El comportamiento de los diferentes compuestos de la fracción oxigenada de ambos aceites también fue analizado. Dado que se trata de los componentes que exhiben mayor actividad biocida, la posibilidad de separarlos no sólo de las demás fracciones sino también entre sí, de modo de obtener componentes con un grado mayor de pureza, es de gran interés para su aplicación.

Como se ha visto, en el caso del aceite de *T. minuta* la fracción de OT está compuesta principalmente por cuatro cetonas insaturadas estructuralmente relacionadas: dihidrotagetona (DHT), tagetona (TAG), *Z*-ocimenona (ZOC) y *E*-ocimenona (EOC), en orden de volatilidad decreciente. La Figura 6.27 muestra los perfiles de composición de los extractos sucesivos obtenidos en el proceso de fraccionamiento, en términos de cada OT individual (curvas de extracción o "*breakthrough*"). Luego de un comportamiento inicial similar, sus tendencias comienzan a diverger a medida que los MT son removidos. La concentración de DHT en la fase extracto disminuye, junto con los MT, hasta agotarse casi completamente al final del experimento. La extracción de TAG pasa por un máximo, seguida por un decrecimiento continuo, como una especie de "curva de respuesta" desplazada en el tiempo con respecto a la DHT. Finalmente, las concentraciones de ZOC y EOC aumentan durante todo el período analizado. Si el proceso continúa a mayores niveles de extracción, es esperable que la extracción de ZOC pase por un máximo y luego comience a decrecer, dejando un refinado de EOC prácticamente pura.

En particular, el fraccionamiento de ocimenonas es interesante como ejemplo de separación de estereoisómeros tipo *Z-E* (o *cis-trans*), ya que a menudo es una de las formas isoméricas la que presenta actividad biológica. Aunque son compuestos químicamente similares, los resultados sugieren que las pequeñas diferencias de volatilidad (debidas a diferencias de momento dipolar y/o polarizabilidad introducidas por la posición de parte de la molécula con respecto a un doble enlace) pueden hacer factible su fraccionamiento.

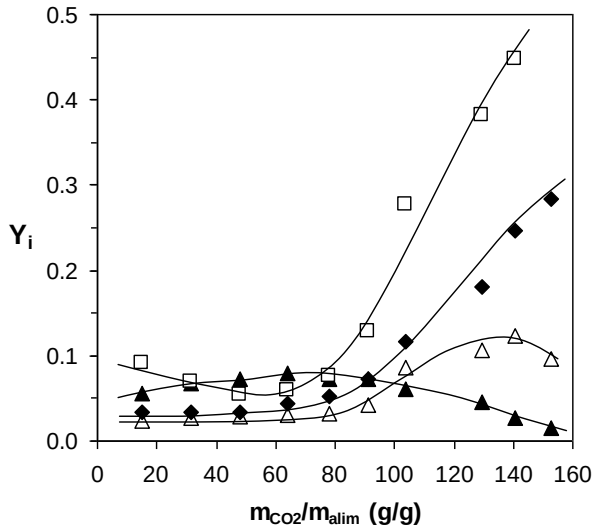


Figura 6.27. Fracción en peso de OT individuales en el extracto (en base libre de solvente) vs. consumo de CO_2 en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *T. minuta* a T=313 K y P=80 bar. (▲) dihidrotagetona, (△) tagetona, (◆) Z-ocimenona, (□) E-ocimenona, (—) líneas de tendencia.

Para investigar un poco más este fenómeno, se analizó la variación de la selectividad del proceso en cuanto a la separación de estos dos isómeros en distintas condiciones de presión. Como caso semejante, también se analizó la separación entre los isómeros *Z* y *E* del citral (neral y geranial) en el fraccionamiento de aceite de limón. Los resultados se muestran en la Figura 6.28. Se observa que la selectividad entre isómeros tiene valores bajos (entre 1 y 2), deteriorándose a medida que aumenta la presión y consiguientemente la capacidad del solvente. Una optimización de las condiciones de proceso podría aprovechar y potenciar dicha diferencia de volatilidad y permitir un grado de separación ventajoso, ya sea alimentando la mezcla de OT (refinado libre de MT) a una segunda columna de fraccionamiento, o bien extrayendo los distintos componentes individuales en forma secuencial modificando las condiciones de operación de una única columna operada en modo semicontinuo.

Los resultados para el caso de los isómeros del citral en el aceite de limón son comparables a los que pueden extraerse del trabajo de Benvenuti y col. [6]. Si bien los autores no investigan este aspecto de la separación, puede calcularse a partir de los datos reportados que la selectividad entre neral y geranial a lo largo del proceso de fraccionamiento con CO_2 a 80 y 85 bar y 316 K oscila entre 1.1 y 1.3.

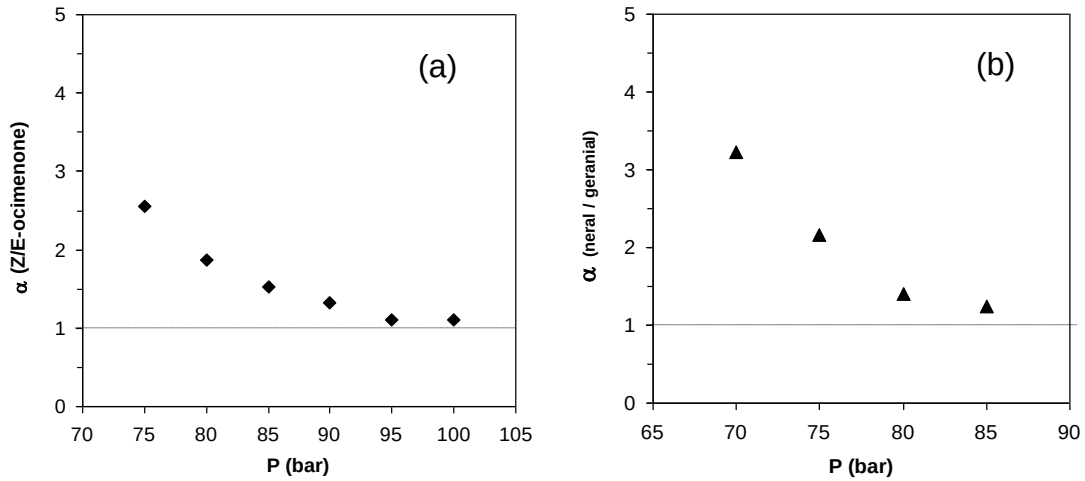


Figura 6.28. Separación de isómeros tipo Z-E en el fraccionamiento de aceites esenciales con CO_2 supercrítico a T=313 K. (a) Selectividad de Z- vs. E-ocimenona. (b) Selectividad de neral vs. geranial (o E- vs. Z-citral).

En el caso del fraccionamiento de aceite de *S. officinalis*, los principales componentes de la fracción de OT son 1,8-cineol, α-tuyona, β-tuyona y alcanfor, en orden de volatilidad decreciente. Como puede verse en la Figura 6.29, todos estos compuestos se enriquecen en forma paralela en la fase extracto a lo largo del proceo. Las diferencias en volatilidad (que pueden observarse en la Figura 6.6) parecen ser demasiado pequeñas para producir un efecto significativo de fraccionamiento en el período analizado, no sólo entre los isómeros ópticos (α y β) de tuyona –lo cual es esperable– sino también con respecto a isómeros estructurales como el alcanfor.

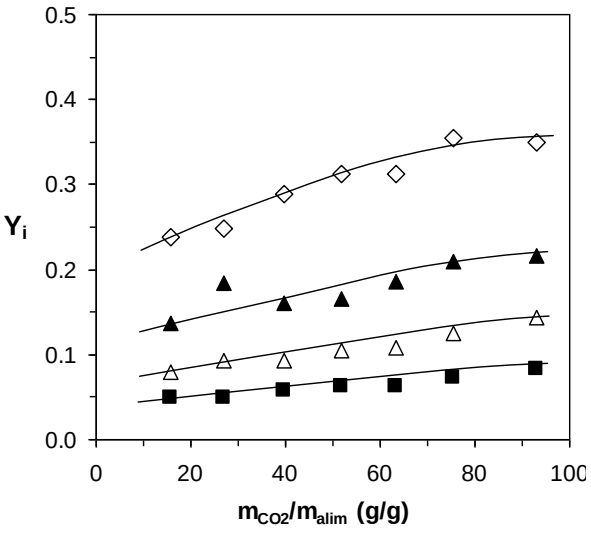


Figura 6.29. Fracción en peso de OT individuales en el extracto (en base libre de solvente) vs. consumo de CO_2 en el fraccionamiento semicontinuo de aceite de *S. officinalis* a T=313 K y P=80 bar. (▲) 1,8-cineol, (◇) α-tuyona, (■) β-tuyona, (△) alcanfor, (—) líneas de tendencia.

La Figura 6.30 muestra la variación de la selectividad entre distintos pares de componentes en función de la presión. Se observa que la selectividad entre los isómeros α y β de tuyona es aproximadamente igual a 1 en todo el rango, por lo que su separación por este medio no es factible. La separación de 1,8-cineol, en cambio, es posible, como ya se ha mencionado al analizar el comportamiento de la volatilidad de este compuesto.

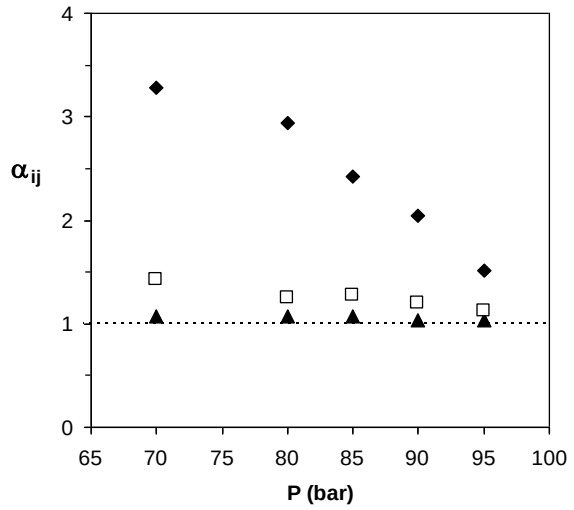


Figura 6.30. Selectividad entre OT individuales en el fraccionamiento de *S. officinalis* con CO_2 supercrítico (T=313 K). (◆) 1,8-cineol vs. tuyonas, (▲) α-tuyona vs. β-tuyona, (□) tuyonas vs. alcanfor.

6.2.5. Selectividad y recuperación en el fraccionamiento semicontinuo

Los ensayos de fraccionamiento semi-continuo permitieron complementar la información obtenida en las mediciones previas de equilibrio en condiciones variables de presión y temperatura, suministrando datos acerca de la dependencia de las principales variables con respecto a la composición del sistema.

A su vez, permitieron confirmar experimentalmente las limitaciones en el grado de separación impuestas por la volatilidad relativa entre las fracciones o componentes a separar. Como se ha mencionado, los ensayos realizados de fraccionamiento semi-continuo pueden asimilarse a una *destilación diferencial* (destilación batch sin reflujo), si se analiza el proceso en base libre de solvente: de hecho, si bien el solvente supercrítico fluye en forma continua a través de la celda, desde el punto de vista de los solutos se trata de una separación de tipo *batch*. El tratamiento matemático de la destilación diferencial se basa en la conocida *ecuación de Rayleigh*:

$$\int_{x_0}^{x} \frac{dx}{y-x} = \ln\left(\frac{W}{W_0}\right)$$

en donde x e y son las concentraciones del componente *"i"* en el líquido y el vapor, respectivamente, W son los moles totales de líquido y el subíndice "0" se refiere a las condiciones iniciales. Esta ecuación es aplicable a cualquier par de componentes de un sistema multicomponente. La integración de la ecuación a partir de las condiciones iniciales de carga permite obtener la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{M_i}{M_{i_0}}\right) = \alpha_{ij} \ln\left(\frac{M_j}{M_{j_0}}\right)$$

en donde M_i y M_j representan los moles de componente *"i"* y *"j"* en el líquido, respectivamente [5]. Los cocientes entre paréntesis corresponden a las recuperaciones de *"i"* y *"j"* en el líquido o refinado (Φ), de modo que puede expresarse como:

$$\ln \Phi_i^L = \alpha_{ij} \ln \Phi_j^L$$

A su vez, como las recuperaciones de cada componente en el líquido y el vapor suman 1, puede reescribirse como:

$$\ln\left(1-\Phi_i^V\right) = \alpha_{ij} \ln \Phi_j^L$$

Esta expresión permite determinar de manera simple el efecto de la volatilidad relativa (α_{ij}) en el grado de separación que es posible lograr en un proceso de este tipo. De hecho, se observa que la volatilidad relativa determina (y limita) la recuperación que es posible obtener simultáneamente en cada fase.

Desde el punto de vista operativo, esta ecuación permite seleccionar las condiciones de operación correspondientes al valor de volatilidad relativa necesario para lograr una separación especificada. Como se ha visto, en general α_{ij} no es independiente de la composición, y por lo tanto varía a lo largo del proceso. Si se quiere obtener una buena descripción, es preciso contar con datos experimentales o con modelos que permitan una predicción confiable de α_{ij}.

Tomando como ejemplo el fraccionamiento de aceite de *T. minuta*, puede verificarse que la ecuación anterior representa adecuadamente los resultados obtenidos. A 313 K y 80

bar, la volatilidad relativa entre MT y OT observada experimentalmente tiene un valor aproximado de 10 (ver Figura 6.4). En tales condiciones, el valor calculado de recuperación de OT en el refinado al final del proceso (correspondiente a una recuperación de MT del 5% en dicha fase) es del 75%, muy próximo a la recuperación observada experimentalmente, que es del 74%. Del mismo modo, pueden calcularse las recuperaciones en otros puntos intermedios del proceso, o en otras condiciones de presión y temperatura.

6.3. Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados experimentales obtenidos en esta tesis referidos al comportamiento de los sistemas multicomponente formados por CO_2 y los distintos aceites esenciales a alta presión, así como las predicciones del modelo GC-EOS. Se realizaron dos tipos de experimentos. En primer lugar, se realizaron ensayos puntuales en condiciones variables de presión (70–120 bar) y temperatura (313–323 K), tomando muestras de la fase vapor o supercrítica y analizándolas por cromatografía de gases. De este modo, se obtuvo información acerca de la solubilidad global del aceite en dicha fase y su composición, y su dependencia con la presión y la temperatura. Con los perfiles obtenidos, se calcularon los coeficientes de distribución de los principales componentes y las volatilidades relativas de las principales fracciones identificadas. En todos los casos, se observó un compromiso entre la solubilidad (o capacidad de carga del CO_2) y la selectividad (en términos de la volatilidad relativa), ya que la primera aumenta y la segunda se reduce con la densidad del solvente, y por lo tanto con la presión de operación. Con respecto a la dependencia con la temperatura, se observaron puntos de *crossover*.

Las solubilidades observadas se encuentran en el rango de 10^{-3} a 10^{-2} (en peso). Para el caso del aceite de *T. minuta*, se observó una buena selectividad entre las fracciones de MT (ocimeno) y OT (ocimenonas), con valores entre 5 y 15 aprox. en la ventana operativa estudiada. En el caso del aceite de *S. officinalis*, la mayor abundancia de compuestos de volatilidad intermedia entre los MT y los OT (como 1,8-cineol), así como la presencia de una cantidad significativa de ST más pesados, modifica el escenario reduciendo la selectividad entre las fracciones (y sus componentes clave seleccionados: β−pineno, tuyonas y β−cariofileno). Finalmente, en el caso del aceite de *M. piperita*, los

componentes clave (mentona y mentol) tienen volatilidades tan cercanas que la selectividad se reduce a valores entre 1 y 2, haciendo muy difícil obtener un grado de separación apreciable.

Se realizaron también ensayos de fraccionamiento semicontinuo en condiciones fijas de presión y temperatura (80 bar y 313 K), para investigar el efecto de la variación de composición. Estos ensayos se realizaron sólo para los aceites de *T. minuta* y *S. officinalis*, extrayendo y analizando muestras sucesivas de la fase extracto a lo largo del proceso.

Se estudió también el efecto de fraccionamiento entre componentes individuales dentro de la fracción de OT (para el caso de *S. officinalis*) y de isómeros tipo *Z-E* (para el caso de las ocimenonas de *T. minuta*). Se observó cierto grado de selectividad, atribuida a las pequeñas diferencias de volatilidad asociadas a diferencias estructurales, incluso entre isómeros tipo *Z-E*.

Por otra parte, se comprobó que el modelo GC-EOS predice de manera adecuada el comportamiento observado experimentalmente, lo cual permite su utilización en forma confiable como modelo termodinámico en la simulación de procesos de fraccionamiento de los aceites seleccionados con CO_2 supercrítico, tema que se desarrollará en el siguiente capítulo.

REFERENCIAS

[1] Tomova, B.S., Waterhouse, J.S., Doberski, J. *The effect of fractionated Tagetes oil volatiles on aphid reproduction*. Entomologia Experimentalis et Applicata 115 (2005) 153-159.

[2] Matos, H.A., Gomes de Acevedo, E., Simoes, P.C., Carrondo, M.T., Nunes da Ponte, M. *Phase equilibria of natural flavours and supercritical solvents*. Fluid Phase Equilibria 52 (1989) 357-364.

[3] Francisco, J.C., Sivik, B. *Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide*. J. of Supercritical Fluids 23 (2002) 11-19.

[4] Akgun, M., Akgun, N.A., Dincer, S. *Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide.* J. of Supercritical Fluids 15 (1999) 117-125.

[5] Seader, J.D., Henley, E.J., Hoper, D.K. *Separation Process Principles. Chemical and Biochemical Operations* (3rd Edition), John Wiley & Sons, Inc., 2011.

[6] Benvenuti, F., Gironi, F., Lamberti, L. *Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process*. J. of Supercritical Fluids 20 (2001) 29-44.

[7] Gironi, F., Maschietti, M. *Supercritical carbon dioxide fractionation of lemon oil by means of a batch process with an external reflux*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 227-234.

7. Simulación y análisis de columnas en contra-corriente

7.1. Modelado de la separación en contra-corriente

7.1.1. Aspectos generales

Como ya se ha mencionado, el uso de columnas multietapa en contra-corriente es indispensable para lograr una buena separación entre componentes o fracciones de componentes cuya volatilidad relativa es moderada o baja (entre 1 y 10 aprox.) [1]. En el Capítulo 3 se han presentado los aspectos básicos sobre el funcionamiento de columnas aplicadas al fraccionamiento con fluidos supercríticos, así como algunas cuestiones prácticas asociadas al procesamiento de mezclas naturales. En este capítulo, se hará una breve introducción al modelado del fraccionamiento en contra-corriente, para luego dar lugar a un estudio de simulación y análisis de distintas configuraciones de proceso para el fraccionamiento de aceites de *T. minuta* y *S. officinalis* con CO_2 supercrítico, con el objetivo de purificar sus componentes de mayor actividad biocida.

El modelado matemático del fraccionamiento supercrítico implica formular un sistema de ecuaciones básicas representativas del proceso [1],[2] formado por:

i) relaciones de equilibrio
ii) balances de masa (global y por componente)
iii) balance de energía
iv) ecuaciones de transferencia de masa

La Tabla 7.1 esquematiza estas ecuaciones en su forma general, en donde:

L,V = caudal total de fase líquida o vapor

L_i, V_i = caudal de componente *i* en la fase líquida o vapor

H^L, H^V = entalpía de la fase líquida o vapor

q = flujo de energía calórica

z = coordenada axial de la columna

y_i^* = concentración de equilibrio del componente *i* en la fase vapor

K_i = coeficiente de distribución del componente *i*

$k_{V,i}$ = coeficiente de transferencia de masa del componente *i* en la fase vapor

a = área de transferencia de masa por unidad de volumen del equipo

P = presión total

Tabla 7.1. Ecuaciones básicas del fraccionamiento en contra-corriente

i) Relación de equilibrio	$y_i^* = \frac{K_i V}{L} L_i$
ii) Balances de masa	$\frac{dL_i}{dz} - \frac{dV_i}{dz} = 0$ $\sum_{i=1}^{N} L_i = L \qquad \sum_{i=1}^{N} V_i = V$
iii) Balance de energía	$\frac{d(H^L L)}{dz} - \frac{d(H^V V)}{dz} - q = 0$
iv) Ecuación de transferencia de masa	$\frac{dV_i}{dz} = \frac{k_{V,i} aP}{V}(V_i - V_i^*)$

En ciertos casos, tales como la operación en condiciones isotérmicas o cuando los efectos térmicos asociados a la disolución de las fases no son significativos, el análisis puede prescindir del balance de energía. Las relaciones de equilibrio, por su parte, son calculadas a partir de un modelo termodinámico adecuado, que sea capaz de predecir correctamente los coeficientes de distribución.

El problema de separación puede analizarse siguiendo dos enfoques principales:

a) el método de *etapas teóricas o de equilibrio*

b) el método de *unidades de transferencia*

El objetivo de ambos métodos es determinar el número de etapas teóricas o unidades de transferencia necesarias para lograr una determinada separación a partir de una alimentación dada. Luego, conociendo la altura equivalente de la etapa teórica o unidad de transferencia (aspecto relacionado con las características del equipamiento, así como con cuestiones fluidodinámicas y de transferencia de masa), es posible dimensionar la altura total de la columna.

El método de **etapas teóricas o de equilibrio** divide la separación en una serie de secciones discretas, que pueden corresponder o no a segmentos de la columna (por ejemplo, platos). En cada etapa las fases entrantes se ponen en contacto y los componentes se distribuyen entre ambas, de tal modo que las composiciones salientes corresponden al equilibrio. Es el enfoque utilizado en esta tesis.

El método de **unidades de transferencia**, por otra parte, supone un cambio gradual de las concentraciones a lo largo de la columna (en lugar de variación por etapas discretas), lo que implica trabajar con las ecuaciones del modelo en su forma diferencial. Diversos autores han desarrollado modelos y correlaciones para describir el fenómeno de transferencia de masa en columnas de fraccionamiento supercrítico, cuya descripción detallada escapa a los alcances de esta tesis [3][4].

El número de etapas teóricas puede calcularse de manera preliminar a partir de los conocidos métodos de McCabe-Thiele y Ponchon-Savarit, de amplio uso en columnas de destilación [5]. Estos métodos (originalmente gráficos) dan una buena estimación del número necesario de etapas teóricas sin tener que realizar experimentos con columnas, siempre que se disponga de información confiable del equilibrio de fases, así como su dependencia con respecto a la composición del sistema. El método de ***McCabe-Thiele*** considera el sistema como un pseudo-binario constituido por los dos componentes clave o pseudo-componentes, es decir, despreciando la influencia del solvente supercrítico. Esta suposición es admisible cuando las solubilidades no varían significativamente con la concentración a lo largo de la columna. Si tal condición no se verifica, se utiliza el método de ***Ponchon-Savarit***, que incluye al solvente en los cálculos, tratando al sistema como un pseudo-ternario. Debe tenerse en cuenta que a menudo el número de etapas teóricas calculado por uno y otro método pueden variar significativamente [2].

Por otra parte, si las ecuaciones de equilibrio y los balances de masa son lineales en el sistema de coordenadas *y-x*, lo cual puede ocurrir a muy bajas o altas concentraciones, existe una solución analítica conocida como ecuación de ***Kremser-Souders-Brown*** [1].

Sin embargo, puede realizarse un análisis más completo mediante simulaciones multicomponente asistidas por computadora. En esta tesis se utilizó un simulador de columna multietapa en contra-corriente (GCEXTRAC) [6] para el cálculo de las columnas fraccionadoras, acoplado a un módulo de cálculo flash multifásico a presión y temperatura constantes para los separadores (GCTHREE) [7], como se ha mencionado en el Capítulo 5. Ambos simuladores utilizan la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS) como modelo termodinámico para el cálculo de las fugacidades y coeficientes de distribución.

7.1.2. Aspectos fluidodinámicos y diseño de columna

Además del conocimiento del comportamiento de fases del sistema, el diseño y dimensionamiento posterior de la columna requiere el conocimiento de otras características, tanto del sistema a procesar como del equipo de separación.

La *altura* de la columna estará determinada por el número de etapas teóricas (o de unidades de transferencia) calculado previamente y la altura de cada etapa teórica (o unidad de transferencia) [1]. Este parámetro depende de la eficiencia de la transferencia de masa y de las características fluidodinámicas del sistema. Aunque existen correlaciones de cierta generalidad para distintos tipos de material de relleno, que incorporan la densidad, la viscosidad y la tensión superficial de la mezcla a procesar, siempre es más confiable su determinación mediante experimentación con columnas reales, a escala piloto o de laboratorio [2]. Por otra parte, el *diámetro* de la columna depende de la productividad deseada, es decir, del caudal de líquido a tratar y la relación solvente-alimentación. Otros parámetros importantes que deben tenerse en cuenta son el caudal de inundación (*flooding*), la caída de presión a lo largo de la columna y el *hold-up* de líquido (es decir, la cantidad de líquido retenido por el relleno de la columna) [8].

Existe escasa información referida a estos aspectos fluidodinámicos y operativos para columnas de fraccionamiento supercrítico, y se ha señalado que las correlaciones desarrolladas para columnas y sistemas a baja presión no son necesariamente válidas cuando se aplican en condiciones de alta presión [9]. Algunos autores han informado estudios experimentales con columnas a escala piloto (como se ha visto en el Capítulo 3) y han determinado algunas de estas propiedades para sistemas de interés, tales como mezclas de ácidos grasos y esteres, y aceites esenciales cítricos (sobre todo de naranja).

Por ejemplo, en el contexto del desterpenado de aceite de naranja con CO_2, tanto Sato y col. [12] como Budich y col. [11] han reportado valores de altura de la etapa teórica en torno a 0.5 m, variando hasta 3.8 m dependiendo de la relación solvente-alimentación. Estos últimos autores han realizado también estudios de punto de inundación o *flooding* para el mismo sistema, determinando la influencia de la viscosidad y la diferencia de densidad entre las fases en este comportamiento. No obstante, en general, la especificidad de los sistemas y columnas estudiadas dificulta la realización de comparaciones de utilidad general extrapolables a otros casos [2].

7.1.3. Esquemas de proceso y nomenclatura

Las Figuras 7.1 (a) y (b) muestran una representación esquemática de las columnas de fraccionamiento que se analizarán en este capítulo.

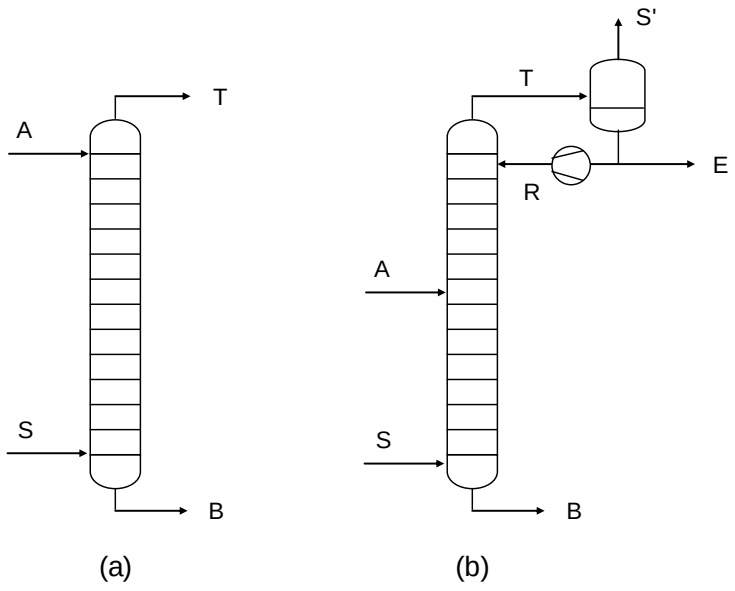


Figura 7.1. Esquemas de fraccionamiento continuo en contra-corriente.
(a) Columna contra-corriente simple, (b) Columna contra-corriente con reflujo externo. A=alimentación de aceite, S=alimentación de solvente (CO_2), T=extracto de tope, B=refinado, S'=solvente recuperado, E=extracto parcialmente despresurizado, R=reflujo.

El sistema (a) constituye una única cascada de separación en contra-corriente. La alimentación de aceite (*A*) se introduce por el tope y el solvente (*S*) por el fondo, extrayéndose la corriente vapor como producto de tope (*T*) y la corriente líquida o refinado como producto de fondo (*B*).

En la columna (b) el aceite es alimentado en una etapa intermedia, y la fase vapor (producto de tope) es parcialmente condensada en un recipiente separador, obteniéndose una corriente de solvente prácticamente puro (*S'*) y una fase líquida enriquecida en los componentes más volátiles, la cual es parcialmente extraída como extracto (*E*) y parcialmente recirculada a la columna como una corriente de reflujo (*R*). La columna opera así con dos secciones (rectificación y despojo) delimitadas por el punto de alimentación de aceite. Los sistemas de recirculación de CO_2 no se analizan aquí.

7.1.4. Criterios y consideraciones de análisis

Recapitulando lo dicho en el Capítulo 3, al analizar un proceso de separación con fluidos supercríticos, es conveniente definir de manera preliminar una "ventana operativa", es decir, una región acotada y adecuada de condiciones de operación.

En el caso del fraccionamiento supercrítico, tal región está delimitada por: *(a)* la frontera de la región bifásica o envolvente de fases, *(b)* las condiciones críticas del solvente, *(c)* la temperatura máxima compatible con la estabilidad térmica de los componentes y *(d)* un rango de densidades que permitan una alta solubilidad en la fase vapor, pero sin alcanzar valores tan altos que dificulten la separación entre las fases.

Con respecto a este último punto, se ha señalado que se requiere una diferencia mínima de densidad entre las fases de 150 kg/m^3 [2]. La densidad de la fase vapor puede considerarse aproximadamente igual a la del CO_2 puro en las mismas condiciones de presión y temperatura. La densidad de la fase líquida, dependiendo de las condiciones, puede aproximarse a la densidad de los aceites puros (que oscila entre 880 y 930 kg/m^3), con alguna variación por la disolución de CO_2. Teniendo en cuenta esta restricción, la densidad máxima del solvente debería ser del orden de 750 ± 30 kg/m^3. A una temperatura dada, la densidad del fluido puede controlarse a través de la presión. A 313 K esta densidad límite corresponde a una presión aproximada de 130 bar, mientras que a 323 y 333 K corresponde a presiones de 175 y 220 bar respectivamente. Como se verá, estos valores de presión se encuentran por encima del valor límite de presión de la región bifásica, lo que asegura una adecuada diferencia de densidad entre las fases en toda la ventana operativa.

Dentro de esta ventana, la búsqueda de condiciones óptimas o recomendables de operación se llevará a cabo en función del efecto de las variables operativas sobre la

selectividad y la *solubilidad*. Un proceso eficiente debe procurar una selectividad tal que permita el grado de separación deseado con el menor consumo de solvente posible, para minimizar tanto los costos operativos y de recompresión como la inversión asociada a un mayor diámetro y altura de la columna.

El grado de separación se evaluará en términos de la *concentración* y *recuperación* de las fracciones en ambas fases (particularmente la fracción más activa). De acuerdo al tipo de columna estudiado, las variables operativas y de diseño que se analizan son:

- Número de etapas teóricas (*n*)
- Presión en la columna
- Temperatura en la columna
- Presión en el separador de tope
- Temperatura en el separador de tope
- Relación solvente-alimentación (*S/A*)
- Relación de reflujo (*RR = R/E*)

7.2. Fraccionamiento de aceite de *Tagetes minuta*

7.2.1. Análisis preliminar de las condiciones de operación

El objetivo fundamental del fraccionamiento de aceite de *T. minuta* es la purificación de los componentes cetónicos que constituyen la fracción de OT (ocimenonas, y en menor medida tagetonas y dihidrotagetona), principales responsables de la actividad biocida. Como se ha visto, estos componentes tienden a enriquecerse en la fase líquida, por lo que el producto de interés en este caso lo constituye el refinado. Los MT (fundamentalmente ocimeno y limoneno) tienden a concentrarse en la fase supercrítica. Se plantean entonces dos escenarios alternativos, con diferentes especificaciones:

- *Caso 1:* se busca un refinado de alta pureza ($X_{OT} > 99\%$), junto con un extracto de baja calidad.
- *Caso 2:* se busca a la vez un refinado y un extracto de alta calidad ($X_{OT} > 99\%$ y $\Phi_{OT} > 90\%$).

El primer caso admite pérdidas de OT en el extracto, reduciendo su recuperación. El segundo caso implica una separación casi completa entre las dos fracciones, para obtener dos productos puros.
A su vez, ambas separaciones deben lograrse procurando minimizar el número de etapas teóricas (y por lo tanto la altura de la columna, con sus costos de inversión asociados) y el consumo de solvente, criterios generales de optimización del proceso.

Las condiciones de presión y temperatura de la columna pueden acotarse de manera preliminar a partir de los datos de selectividad y solubilidad. Como se mencionó en el capítulo anterior, existe un compromiso entre ambas variables, ya que dependen de manera opuesta de la densidad del solvente: las condiciones de mayor selectividad corresponden a regiones de baja densidad, en las que la capacidad del solvente es baja. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la Figura 7.2 muestra la relación entre la selectividad (expresada como volatilidad relativa entre MT y OT), la solubilidad y la presión para las dos temperaturas estudiadas experimentalmente (313 y 323 K), agregándose una predicción a 333 K para explorar un rango mayor de condiciones. Por simplicidad, sólo se muestran los valores calculados por el modelo, pues se ha visto que concuerdan de manera satisfactoria con los datos experimentales. Como puede observarse, la operación a 313 K es la menos aconsejable, ya que las selectividades son menores en todo el rango. Además, el sistema se encuentra muy cerca de las condiciones límite de la región bifásica, como indica el rápido aumento de la solubilidad con la presión. La operación a 333 K, por su parte, permite obtener mayores valores de selectividad que a 323 K, pero con reducción de la solubilidad, lo cual se traduce en un mayor consumo de solvente. Con respecto a la presión, el límite inferior recomendable está en torno a 90 bar, ya que a valores menores la solubilidad es demasiado baja (menor a 5 mg/g). El límite superior depende de la extensión de la región bifásica a cada temperatura.
En conclusión, puede considerarse *a priori* que la región óptima de operación estará entre 323 y 333 K y presión entre 90 y 100 bar, correspondiendo a una volatilidad relativa aproximadamente igual a 15 y una solubilidad entre 5 y 10 mg/g.

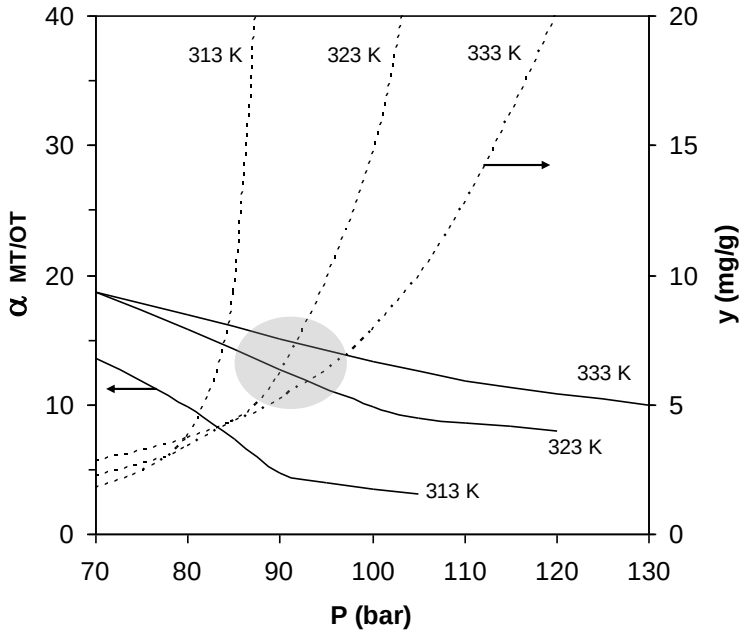


Figura 7.2. Selectividad ($\alpha_{MT/OT}$) y solubilidad (y) en función de la temperatura y la presión de operación para el sistema CO_2 + aceite de *T. minuta* (predicciones GC-EOS).

7.2.2. Operación en contra-corriente simple

El análisis anterior proporciona una primera aproximación en la búsqueda de las condiciones óptimas de operación, pero no tiene en cuenta la relación de solvente consumido por unidad de aceite alimentado (relación S/A), parámetro que puede tener gran influencia en la composición de las fases y la recuperación de los productos, además de los costos operativos.

Teniendo en cuenta esto, se realizaron simulaciones de una columna en contra-corriente simple dentro del rango de temperatura y presión previamente definido y utilizando diferentes condiciones de relación S/A con el objetivo de evaluar su efecto sobre el desempeño de la separación. La Figura 7.3 muestra algunos resultados de estas simulaciones, en términos de la concentración y recuperación de OT en el refinado en función de la presión, la temperatura y la relación S/A. Se utilizó en todos los casos una columna de 5 etapas teóricas, número suficiente para alcanzar un buen nivel de fraccionamiento, dentro de los valores especificados. El agregado de más estapas no produjo mejoras significativas, como se muestra en la Figura 7.4 para dos condiciones seleccionadas entre los mejores resultados.

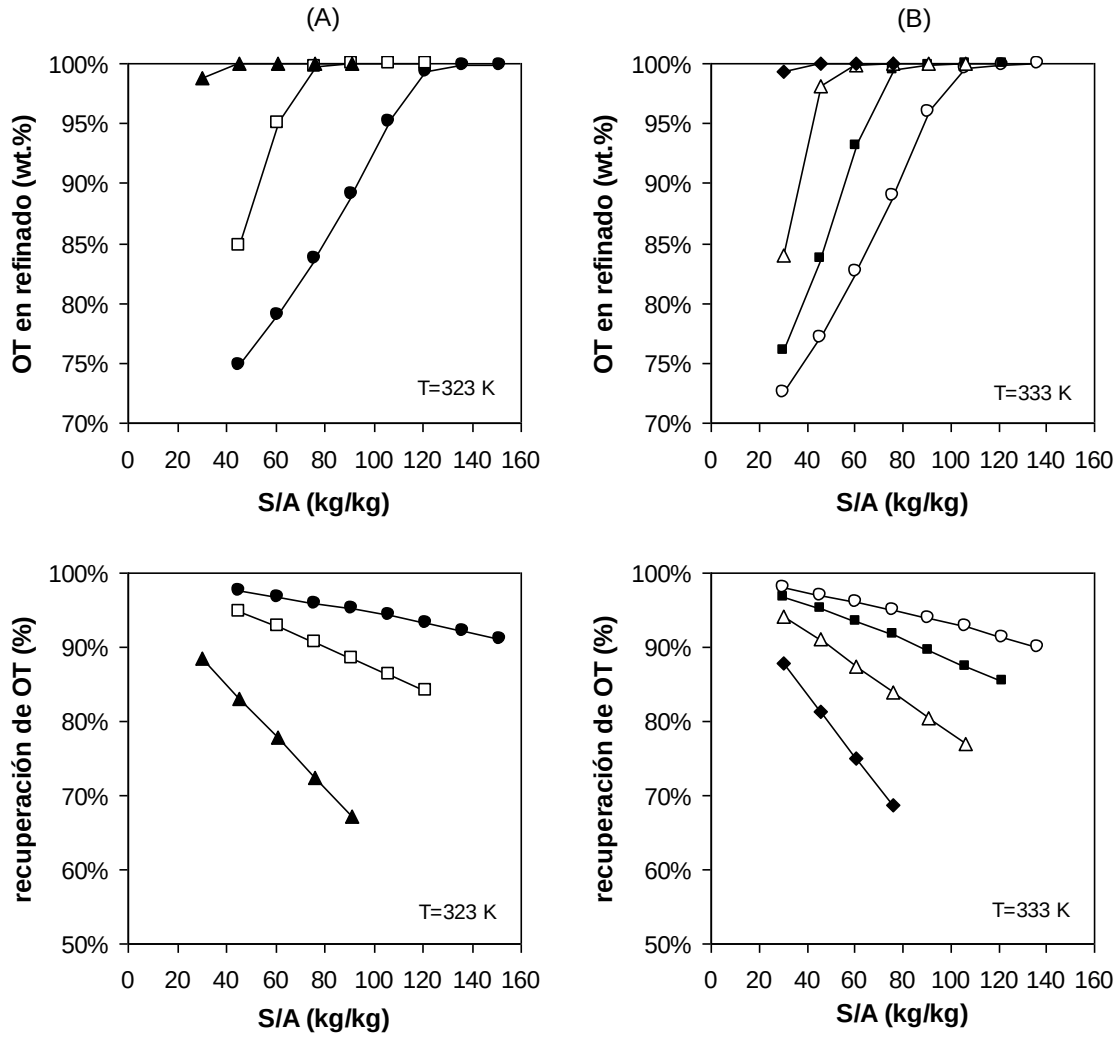


Figura 7.3. Fraccionamiento en contra-corriente simple de aceite de *T. minuta*. Concentración y recuperación de OT en el refinado, n=5. (A) 323 K y (●) 80 bar, (□) 90 bar, (▲) 100 bar. (B) 333 K y (○) 80 bar, (■) 90 bar, (△) 100 bar, (◆) 110 bar. (Predicciones GC-EOS).

El análisis de los resultados permite observar algunas tendencias:

(a) Operar a mayores valores de relación S/A incrementa la pureza del refinado, pero reduce la recuperación de OT, es decir que existe un compromiso entre estos dos parámetros.

(b) Por su parte, la presión tiene un efecto similar: operar a presiones mayores aumenta la pureza del refinado, pero reduce la recuperación de OT, ya que se incrementa la densidad del CO_2 y su poder solvente. En consecuencia, el incremento de presión permite cumplir la especificación de pureza (X_{OT} > 99%) a caudales menores de solvente.

(c) La temperatura tiene un efecto más complejo, debido al ya referido fenómeno de *cross-over*: dependiendo de la presión, aumenta, reduce o prácticamente no modifica la concentración y la recuperación de OT.

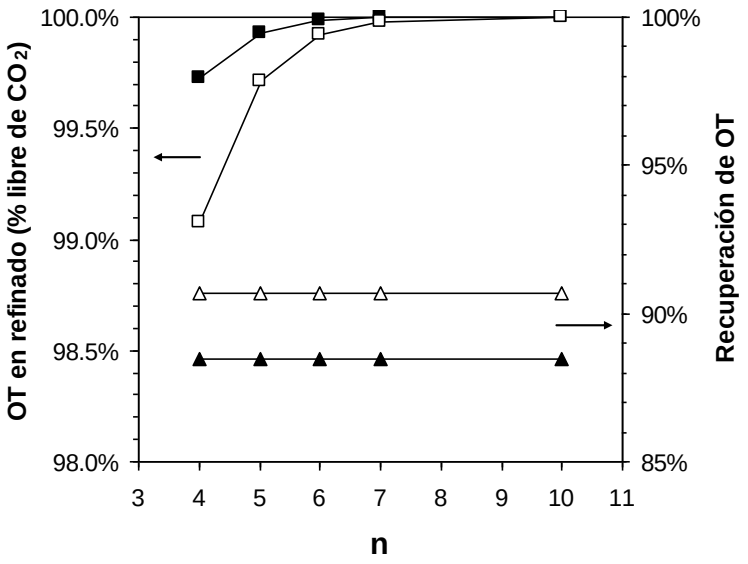


Figura 7.4. Efecto del número de etapas en la concentración y recuperación de OT en el refinado para una columna en contra-corriente simple a T=323 K y P=90 bar.
(□,△) S/A=76 kg/kg, (■,▲) S/A=91 kg/kg.

Este compromiso entre concentración, recuperación y consumo de solvente parece tener una región óptima operando en torno a una presión de **90 bar** y una relación S/A de **76 kg/kg.** En estas condiciones, el proceso cumple las especificaciones desde el punto de vista del refinado, obteniéndose más de 99% de pureza y más de 90% de recuperación de OT. El efecto de la temperatura en estas condiciones es muy poco significativo, como puede verse en la Tabla 7.2 para tres temperaturas analizadas. La elección de la temperatura de operación dependerá entonces del criterio preferido. A 323 K se opera en condiciones de mayor densidad y capacidad del solvente, reduciendo así el diámetro requerido de columna. Una temperatura mayor, por otra parte, reduce la densidad y la solubilidad pero permite obtener un 1% más de recuperación de OT, además de tratarse de una condición más alejada de la región crítica, y por lo tanto de más fácil control.

Tabla 7.2.
Concentración (X,Y) y recuperación (Φ) de fracciones de aceite de *T. minuta* en una columna en contra-corriente simple de 5 etapas teóricas operando a P=90 bar y S/A=76 kg/kg.

T (K)	X_{OT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{OT} (%)	Y_{MT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{MT} (%)
323	99.7%	90.7%	85.2%	99.5%
328	99.4%	91.8%	86.6%	99.0%
333	99.5%	91.7%	86.5%	99.2%

Como puede verse, el fraccionamiento en contra-corriente simple operando en estas condiciones permite obtener productos que cumplen con las especificaciones del caso 1, pero no las del caso 2. En efecto, la concentración máxima de MT que es posible obtener en el extracto es del 86% aprox., debido a la pérdida de 8–9% de OT en la fase supercrítica. Para obtener dos productos de elevada calidad es preciso utilizar otras estrategias, que se exploran a continuación.

7.2.3. Efecto de un gradiente de temperatura

Varios autores han estudiado el efecto del reflujo interno inducido por un gradiente térmico a lo largo de la columna. Sato y col. [11] hallaron que un gradiente de 333–313 K, de tope a fondo, mejoraba la selectividad en el fraccionamiento semicontinuo de aceites cítricos, en comparación con las columnas de rectificación isotérmicas. Köse y col. [13] llegaron a conclusiones similares en el fraccionamiento de aceite de orégano usando un gradiente de 328–311 K. En estas configuraciones, se alcanzan condiciones de una sola fase en el fondo (sección de extracción) y el fraccionamiento se lleva a cabo en la sección de rectificación, con los compuestos menos volátiles condensando y fluyendo hacia abajo a medida que la temperatura aumenta. Sin embargo, este enfoque –válido para la operación semicontinua– no necesariamente mejora la selectividad en el caso del procesamiento continuo, como fue indicado por Espinosa y col. [14] a partir de resultados numéricos. Para confirmar esta observación, se simuló una columna con un gradiente térmico lineal de 333–313 K (de tope a fondo), operando en las demás condiciones operativas recomendadas previamente. Los resultados pueden verse en la Tabla 7.3, en comparación con los resultados de la operación isotérmica. Se observa que el gradiente

incrementa muy ligeramente la pureza del refinado y la recuperación de OT, sin afectar sensiblemente la calidad del extracto.

Tabla 7.3.
Concentración (X,Y) y recuperación (Φ) de fracciones de aceite de *T. minuta* en una columna en contra-corriente simple de 5 etapas teóricas con y sin gradiente térmico (P=90 bar y S/F=76 kg/kg).

T (K)	X_{OT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{OT} (%)	Y_{MT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{MT} (%)
323	99.7	90.7	85.2	99.5
333	99.5	91.6	86.5	99.2
333–313	99.8	91.7	86.6	99.6

La Figura 7.4 muestra los perfiles de composición de las fases y la selectividad a lo largo de la columna para ambos casos (operación isotérmica a 323 K y con gradiente térmico). Como puede verse, el gradiente de temperatura modifica los perfiles, pero prácticamente no tiene efecto en la composición final del extracto y del refinado. Se observa también que la selectividad entre MT y OT disminuye a medida que aumenta la concentración de MT en la fase supercrítica.

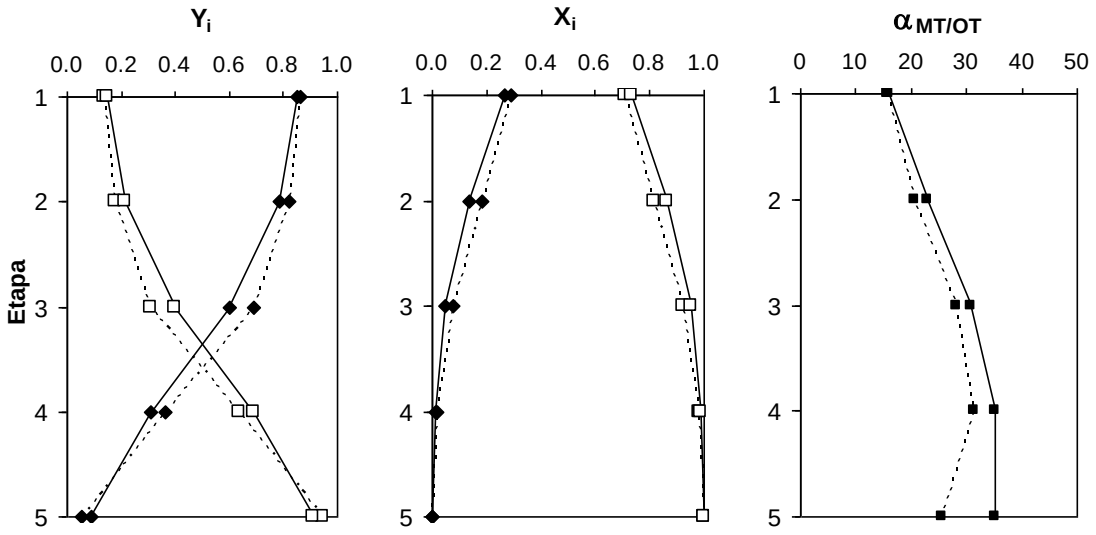


Figura 7.4. Fraccionamiento de aceite de *T. minuta* en contra-corriente simple (P=90 bar, n=5, S/A=76 kg/kg). Perfiles de composición molar (en base libre de solvente) en el extracto (Y_i), en el refinado (X_i) y selectividad ($\alpha_{MT/OT}$) a lo largo de la columna: (—) operación isotérmica a 323 K, (---) operación con gradiente térmico 313-333 K. (◆) MT, (□) OT.

Como fue señalado por Díaz y col. [15], en columnas en contra-corriente simple las recuperaciones están limitadas termodinámicamente por la volatilidad relativa, asumiendo que los caudales de ambas fases son constantes, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\alpha_{12} = \frac{\Phi_1}{1-\Phi_2}$$

en donde α_{12} es la volatilidad relativa entre los componentes 1 y 2, y Φ_1 y Φ_2 son las correspondientes recuperaciones límite. Los componentes 1 y 2 son en este caso los MT y OT, respectivamente. Cuando la volatilidad relativa es baja, un proceso en contra-corriente simple aún es capaz de producir un refinado de alta pureza. Sin embargo, no puede obtenerse simultáneamente una alta recuperación de MT y OT en el extracto y en el refinado, y viceversa. La aplicación de un gradiente térmico modifica las volatilidades relativas a lo largo de la columna, pero no mejora sensiblemente la eficiencia. Sin embargo, el uso de un reflujo externo puede superar esta limitación, incrementando a la vez las purezas y recuperaciones. Además, agrega una variable de diseño adicional para mantener el sistema dentro de la región de dos fases.

7.2.4. Columna con reflujo externo

En un primer análisis, se utilizó temperaturas de 323 y 333 K y presiones de 90 y 100 bar, y se evaluaron distintos valores de relación S/A y relación de reflujo (RR). El agregado de una sección de rectificación de 5 etapas (n_{total}=10) fue suficiente para lograr el nivel de separación deseado.

Las condiciones de operación del separador (285 K – 35 bar) fueron seleccionadas en base a predicciones, de modo de obtener una condensación cuantitativa de los solutos y una corriente de CO_2 prácticamente puro (99.99%), intentando a la vez minimizar la reducción de presión y temperatura para reducir así los costos de regeneración del solvente.

La Tabla 7.4 muestra resultados comparativos obtenidos en operación simple (columna de 5 etapas) y con reflujo externo (columna de 10 etapas con alimentación en la etapa 5), para distintas condiciones de relación S/A y relación de reflujo (RR).

Tabla 7.4. Fraccionamiento de aceite de *T. minuta*. Resultados comparativos de simulaciones en columna simple (n=5) y con reflujo externo (n=10, alimentación en etapa 5).

			Columna simple		*Columna con reflujo*		
T (K)	P (bar)	S/A (kg/kg)	X_{OT}	Φ_{OT}	RR	X_{OT}	Φ_{OT}
323	90	60	0.9498	0.9286	0.67	0.9330	0.9746
323	90	76	0.9971	0.9069	1.00	0.9982	0.9788
323	90	91	0.9994	0.8845	1.00	0.9998	0.9575
333	90	76	0.9952	0.9165	0.67	0.9969	0.9663
333	100	45	0.9814	0.9115	0.43	0.9706	0.9651
333	100	60	0.9991	0.8748	0.43	0.9997	0.9218

Puede observarse que en todos los casos la operación con reflujo externo incrementa la recuperación de OT en el refinado (hasta un 98%) con respecto a la operación en contra-corriente simple, con el consiguiente aumento de la concentración de MT en el extracto. Como puede verse en las simulaciones a 323 K y 90 bar, el incremento del caudal de solvente manteniendo constante la relación de reflujo reduce la recuperación de OT, por mayor disolución de éstos en la fase supercrítica. Por otra parte, el aumento simultáneo de la relación de reflujo y el caudal de solvente aumenta la pureza del refinado, sin afectar significativamente la recuperación de OT.

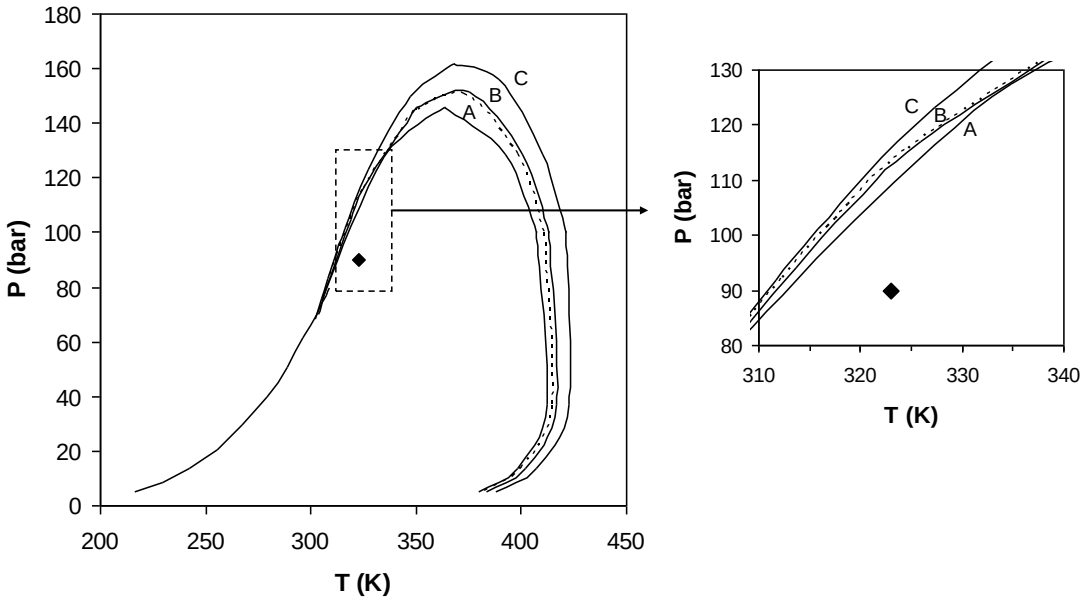


Figura 7.5. Fraccionamiento supercrítico de aceite de *T. minuta*. Envolventes de fases para proceso en contra-corriente con reflujo externo, n=10, alimentación en etapa 5 (predicción GC-EOS). (A) S/A=91 kg/kg, RR=1. (B) S/A=76 kg/kg, RR=1. (C) S/A=60 kg/kg, RR=0.67. (---) Contra-corriente simple, N=5, S/A=76 kg/kg. (◆) Condiciones seleccionadas de operación.

Por su parte, la Figura 7.5 muestra las envolventes de fases calculadas en base a la composición global de la columna (alimentación o alimentación+reflujo) para distintas condiciones de relación S/A y reflujo, observándose el efecto de tales variables en los límites de la región bifásica. Se observa que el aumento de la relación S/A –es decir, el aumento de la concentración global de CO_2– reduce la presión máxima de operación para una temperatura dada.

La Tabla 7.5 muestra las condiciones seleccionadas de operación para este aceite, en base al análisis de los resultados de las simulaciones, así como la concentración y recuperación de los productos. Se observa que operando en estas condiciones es posible obtener a la vez un refinado y un extracto de elevada pureza. La Figura 7.6 muestra los perfiles de composición y selectividad a lo largo de la columna, a modo ilustrativo.

Tabla 7.5.
Fraccionamiento de aceite de *T. minuta* en contra-corriente con reflujo externo. Condiciones de operación seleccionadas y predicción de la concentración y recuperación de OT en el refinado.

Variable	Valor
Temperatura de la columna (K)	323
Presión de la columna (bar)	90
Relación S/A (kg/kg)	76
Número de etapas teóricas	10
Etapa de alimentación de aceite	5
Temperatura del separador (K)	285
Presión del separador (bar)	35
Relación de reflujo	1.0
Concentración de OT en refinado (% molar, libre de CO_2)	99.8
Recuperación de OT en refinado (%)	97.9
Concentración de MT en extracto (% molar, libre de CO_2)	96.0
Recuperación de MT en extracto (%)	98.8
CO_2 en el vapor del separador (% molar)	> 99.9

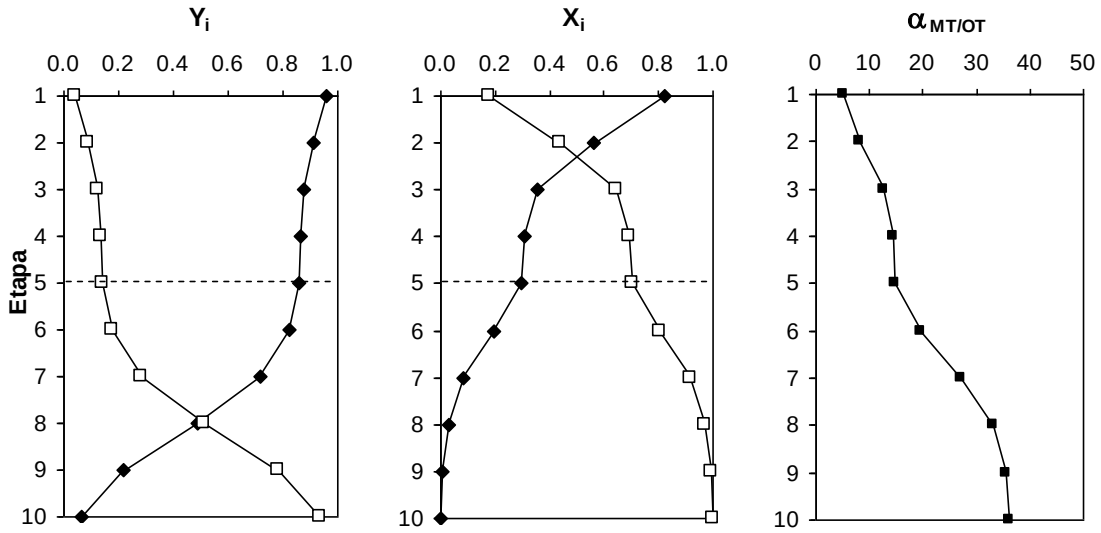


Figura 7.6. Fraccionamiento de aceite de *T. minuta* en contra-corriente con reflujo externo (P=90 bar, T=323 K, n=10, S/A=75 kg/kg, RR=1). Perfiles de composición molar en el extracto (Y_i), en el refinado (X_i) y selectividad ($\alpha_{MT/OT}$) a lo largo de la columna: (◆) MT, (□) OT.

7.2.5. Efecto de la composición del aceite

El análisis hasta aquí ha considerado una alimentación con una composición igual a la del aceite utilizado en la etapa experimental (35% MT – 65% OT). Sin embargo, la composición o "calidad" del aceite (en términos de la proporción de la fracción activa de OT) es un aspecto importante, debido a la variabilidad natural que presenta este tipo de aceites, debido a factores geográficos, estacionales, ambientales, etc. Por lo tanto, es de interés analizar qué modificaciones introduce esta variable en la operación de la columna.

La Figura 7.7 muestra las envolventes de fases para una relación S/A=76 kg/kg y distintas composiciones de aceite (de 0 a 100% de MT). El efecto observado es una reducción de la extensión de la región bifásica (tanto en presión como en temperatura) a medida que el aceite es más rico en MT, más solubles en CO_2. Para valores elevados (90% MT), las condiciones en la columna pueden alcanzar fácilmente el límite de la región bifásica. En tal caso, el uso de reflujo externo es fundamental para mantener al sistema en condiciones heterogéneas. La selectividad, por su parte, se reduce con el contenido de MT, como se ha observado en los perfiles de las columnas analizadas. Por lo tanto, las recuperaciones tendrán un límite menor. En tal situación, se requerirá una optimización simultánea de las condiciones de presión, temperatura, relación S/A, relación de reflujo y número de etapas teóricas, como se ha reportado para el caso de los aceites de naranja y limón [14].

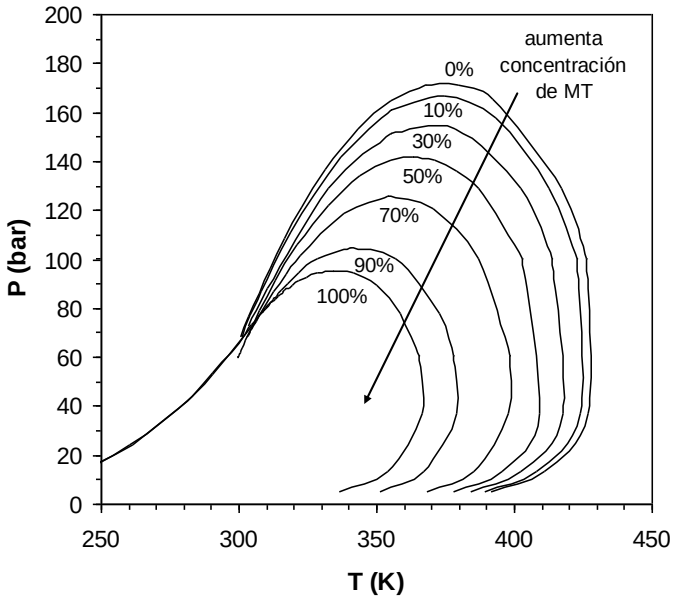


Figura 7.7. Fraccionamiento supercrítico de aceite de *T. minuta*.
Envolventes de fases para distintas composiciones del aceite alimentado, calculadas en base a la composición global de la columna para una relación S/A=76 kg/kg (predicción GC-EOS).

La Figura 7.8 muestra algunos resultados numéricos de columnas en contra-corriente simple para diferentes calidades del aceite alimentado, en términos de la concentración de compuestos activos (OT). Como puede observarse, a medida que se reduce el contenido de estos compuestos, se requiere una cantidad mayor de solvente para lograr un producto de alta pureza (>99%), a la vez que la recuperación de OT se reduce, en función del deterioro de la selectividad. En estas condiciones, resulta imprescindible el uso de un reflujo externo para evitar pérdidas excesivas de compuestos valiosos en el producto de tope.

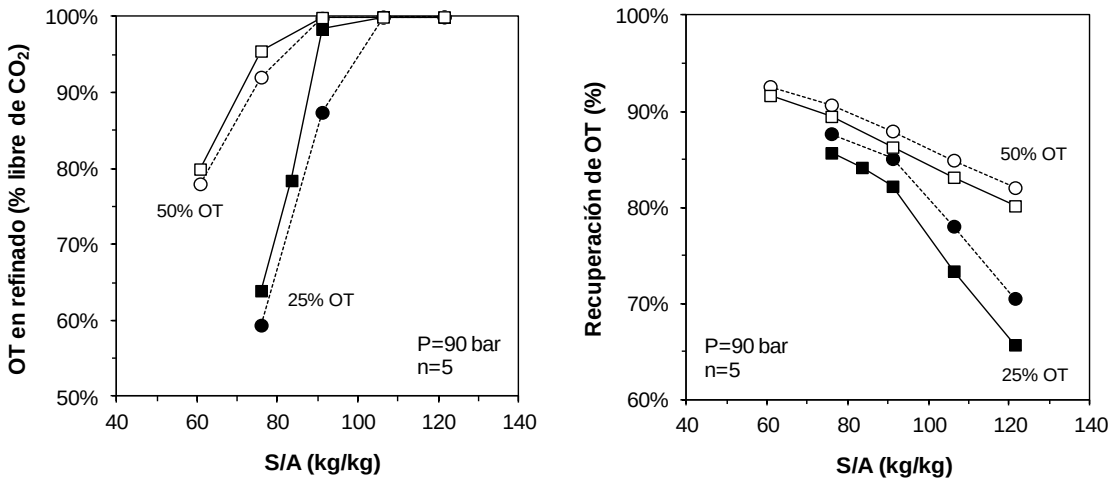


Figura 7.8. Fraccionamiento supercrítico de aceite de *T. minuta*. Influencia de la calidad de la alimentación en el desempeño de la columna, operación en contra-corriente simple.
(■,□) T=323 K, (●,○) T=333 K.

7.3. Fraccionamiento de aceite de *Salvia officinalis*

Como se ha visto, el aceite de *S. officinalis* está constituido por una fracción mayoritaria de compuestos oxigenados (1,8-cineol, tuyonas, alcanfor) y dos fracciones minoritarias de monoterpenos hidrocarbonados (MT) y sesquiterpenos (ST). Los cálculos aquí presentados fueron realizados considerando una alimentación de composición similar a la del aceite utilizado en los experimentos (18% MT, 70% OT, 12% ST, cada fracción representada por un pseudo-componente). En este caso, se plantean dos objetivos de fraccionamiento:

- *Caso 1:* obtención de un refinado libre de MT, constituido por las fracciones de OT y ST ($X_{OT+ST} > 99\%$).
- *Caso 2:* obtención de la fracción de OT pura, libre a la vez de MT y ST.

El primer caso puede lograrse en una única columna, en la que los MT son extraídos en el extracto y los OT y ST en el refinado. El segundo caso, en cambio, requiere el uso de dos columnas, una para separar los MT y otra para separar los OT y ST entre sí, como se muestra esquemáticamente en la Figura 7.9. En esta segunda columna, los OT son recuperados en la fase extracto y los ST en el refinado.

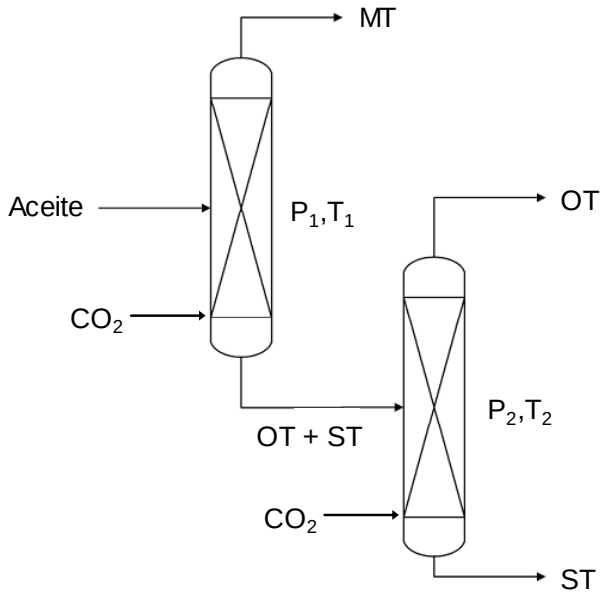


Figura 7.9.
Esquema global de fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* en dos columnas.

7.3.1. Análisis de la columna 1

Siguiendo el mismo análisis que en el caso del aceite de *T. minuta*, la Figura 7.10 muestra los valores calculados de solubilidad y selectividad (expresada como volatilidad relativa de MT con respecto al conjunto de OT+ST) en función de la presión y la temperatura. Se observa la misma situación de compromiso entre ambas variables que en el caso anterior. A 313 K tanto la selectividad como la solubilidad son muy sensibles a la presión. Además, el rango de presión correspondiente a la región bifásica es estrecho y cercano al punto crítico del solvente, condiciones poco recomendables para la operación. Por otra parte, comparando las curvas a 323 y 333 K se observa que la temperatura tiene poca influencia sobre estas variables. A 90 bar, operar a 323 o 333 K da prácticamente los mismos resultados. Estas condiciones están muy cerca de un punto de *cross-over* para este sistema.

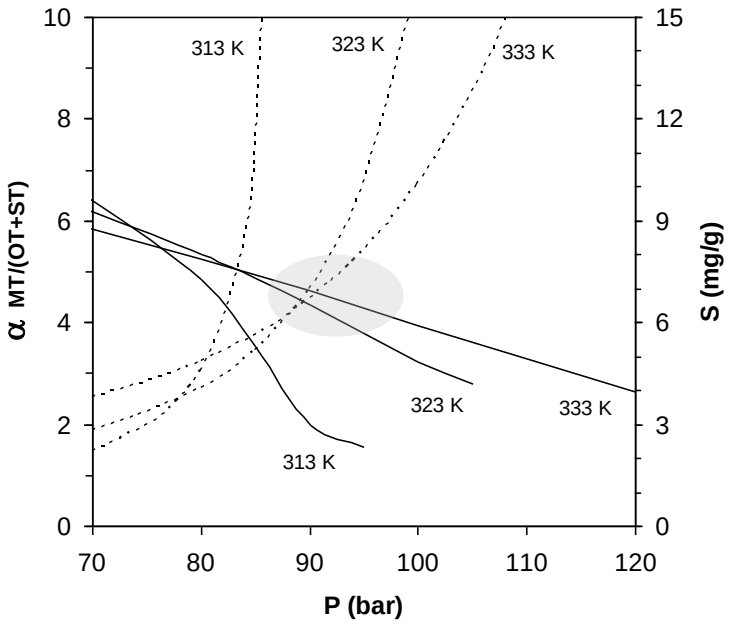


Figura 7.10. Selectividad (—) y solubilidad (- - -) en función de la temperatura y la presión de operación para el sistema CO_2 + aceite de *S. officinalis* (predicciones GC-EOS).

Al incorporar el caudal de solvente como variable (a través de la relación S/A), se observan otros fenómenos. La Figura 7.11 muestra valores calculados de concentración y recuperación de OT en el refinado para distintas condiciones de presión, temperatura y relación S/A en la simulación de columnas en contra-corriente simple de 10 etapas teóricas. En dichas curvas se ve que la concentración de OT en el refinado alcanza un valor *máximo* para un cierto valor de relación S/A, dado que al incrementarse el caudal de solvente comienza a producirse una mayor solubilización de OT y una consiguiente concentración de los ST (menos solubles) en el líquido. Del mismo modo, este punto máximo se obtiene a caudales menores de solvente a medida que aumenta su densidad. Por otra parte, se observa que a valores de relación S/A menores a 50 kg/kg es posible obtener una recuperación de OT del orden del 90%, pero en contrapartida se produce una reducción notable de su concentración.

Por su parte, la Figura 7.12 muestra la dependencia de la calidad del refinado y la recuperación de OT con respecto al número de etapas en las condiciones seleccionadas de operación. Como puede verse, el incremento del número de etapas por encima de 10 no introduce mejoras significativas en el desempeño.

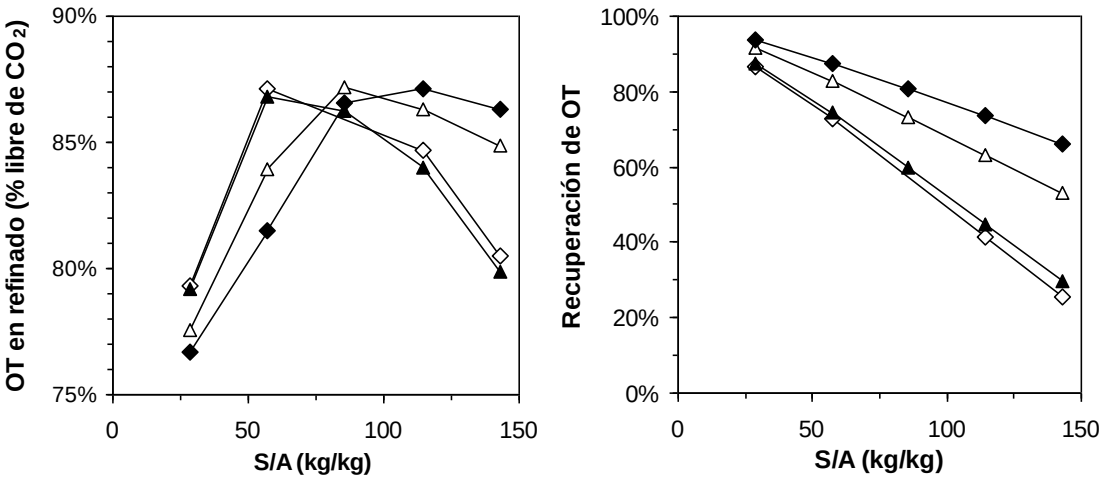


Figura 7.11. Fraccionamiento en contra-corriente simple de aceite de *S. officinalis*. Concentración y recuperación de OT en el refinado, n=10. (◇) T=323 K, P=90 bar. (◆) T=333 K, P=70 bar. (△) T=333 K, P=80 bar. (▲) T=333 K, P=90 bar. (Cálculos GC-EOS).

La Tabla 7.6 muestra los mejores resultados obtenidos en este rango de condiciones. La condición más recomendable para operar la columna parece estar en torno a una presión de **90 bar**, temperatura de **323–333 K** y relación **S/A=57 kg/kg**. Incrementar la temperatura de 323 a 333 K permite ganar casi dos puntos porcentuales en recuperación pero perder medio punto en concentración de OT en el refinado, a la vez que se reduce la densidad del solvente, con el consiguiente incremento de diámetro de la columna. La elección de la temperatura dependerá nuevamente del balance global del proceso (incluyendo inversión, consumo energético, etc.).

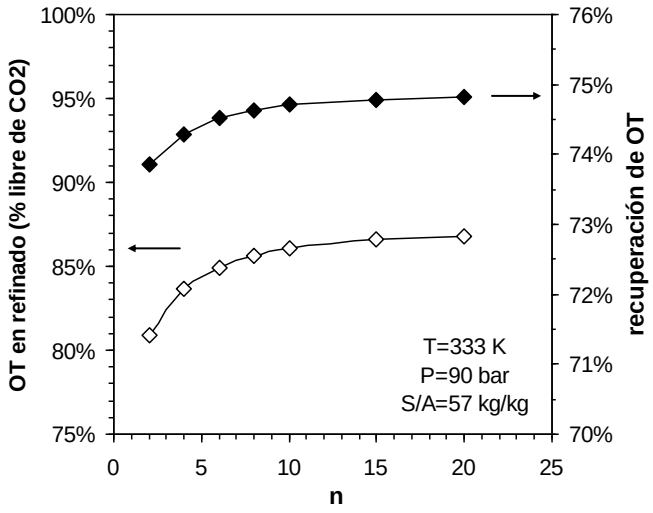


Figura 7.12. Efecto del número de etapas en la concentración (◇) y recuperación (◆) de OT en el refinado para una columna en contra-corriente simple a T=333 K, P=90 bar y S/A=57 kg/kg.

Tabla 7.6.
Concentración (X,Y) y recuperación (Φ) de OT y MT en el refinado y el extracto en el fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* en una columna en contra-corriente simple de 10 etapas teóricas.

T (K)	P (bar)	S/A (kg/kg)	X_{OT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{OT} (%)	Y_{MT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{MT} (%)
323	90	57	87.1	72.8	45.6	97.0
333	90	57	86.8	74.5	47.4	96.6
333	80	86	87.2	73.4	47.3	99.2
333	70	86	86.6	80.9	54.4	94.5

Por otra parte, parece inevitable perder alrededor de un 25% de OT en el extracto para obtener un refinado libre de MT. El extracto obtenido en todos los casos es de baja calidad (45–55% MT), pero con alta recuperación de MT (superior al 95%). El análisis de recuperaciones límite mencionado previamente indica que para obtener simultáneamente un 90% de recuperación de cada fracción se requeriría una volatilidad relativa mínima de 9 (mientras que para este aceite oscila entre 2 y 6, con valores entre 4 y 5 en las condiciones de mejor resultado, como se ve en la Figura 7.10). Para una selectividad promedio de 5 y una recuperación de 90% de OT, la recuperación de MT en el extracto sólo sería de 50%, quedando el resto en la fase líquida y reduciendo su calidad.
Por otra parte, la operación a **333 K, 70 bar** y **86 kg/kg** permite obtener una mayor recuperación de OT en el refinado (81%) sin reducir su concentración. Parece ser un punto más recomendable, de baja densidad de solvente y mayor selectividad (aprox. 6), y como está alejado de la temperatura crítica no tiene los inconvenientes de la elevada compresibilidad de dicha región. Desde el punto de vista del solvente, se trata de un fraccionamiento en condiciones *cuasi-críticas*. La principal desventaja de este punto es la baja capacidad del solvente, lo cual incrementa el caudal requerido.

Puesto que tanto la selectividad como la solubilidad prácticamente no varían con la temperatura dentro del rango operativo recomendado, es esperable que la aplicación de un *gradiente térmico* no modifique el desempeño de la columna, ya que no se cumplen las condiciones requeridas para la formación de un reflujo interno de los solutos menos solubles. Esto se corrobora al analizar los resultados obtenidos al simular una columna con un gradiente térmico lineal de 338 a 323 K (de tope a fondo), rango que asegura

condiciones bifásicas en toda la columna, presentados en la Tabla 7.7 comparativamente con los resultados de dos columnas isotérmicas.

Tabla 7.7.
Concentración (X,Y) y recuperación (Φ) de fracciones de aceite de *S. officinalis* en una columna de 10 etapas teóricas con y sin gradiente térmico, operando a 90 bar y S/A=57 kg/kg

T (K)	X_{OT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{OT} (%)	Y_{MT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{MT} (%)
323	87.1	72.8	45.3	97.1
338	86.9	72.7	46.2	98.0
338–323	86.7	72.8	46.0	97.1

Se realizaron simulaciones de columnas en contra-corriente con *reflujo externo*, condensando parcialmente el extracto de tope en un separador a 285 K y 35 bar y realimentando parte del condensado al tope de la columna. En primer lugar se mantuvieron las condiciones de operación de la columna seleccionadas previamente (90 bar, 323 o 333 K y 57 kg/kg) y se evaluó el efecto de agregar una sección de rectificación de 5 etapas (es decir, una columna de 15 etapas en total con alimentación de aceite en la etapa 5). La Tabla 7.8 muestra los resultados para ambas temperaturas usando una relación de reflujo de 0.67.

Se observa que la operación con reflujo externo mejora la recuperación de OT en el refinado (alrededor de un 10% con respecto a la operación sin reflujo en condiciones similares). Por otra parte, el aumento de temperatura de 323 a 333 K parece tener mayor influencia en la presión de vapor de los OT, ya que se reduce su concentración y recuperación en la fase refinado (aumentando los correspondientes valores para los ST) e incrementándose ligeramente en la fase extracto.
La Figura 7.13 muestra los perfiles de concentración de en ambas fases a lo largo de la columna para el caso de operación a 323 K.

Tabla 7.8.
Fraccionamiento continuo contracorriente con reflujo externo. Condiciones de operación seleccionadas y predicción de la concentración y recuperación de OT en el refinado.

Variable	*Valor*	
Temperatura de la columna (K)	323	333
Presión de la columna (bar)	90	90
Relación S/A (kg/kg)	57	57
Número de etapas teóricas (*n*)	15	15
Etapa de alimentación de aceite	5	5
Temperatura del separador (K)	285	285
Presión del separador (bar)	35	35
Relación de reflujo	0.67	0.67
Concentración de MT en extracto (% molar, libre de CO_2)	55.2	54.3
Recuperación de MT en extracto (%)	80.2	80.6
Concentración de OT en refinado (% molar, libre de CO_2)	86.6	81.2
Recuperación de OT en refinado (%)	84.1	83.3
Concentración de ST en refinado (% molar, libre de CO_2)	11.6	16.6
Recuperación de ST en refinado (%)	94.3	98.9
CO_2 en el vapor del separador (% molar)	> 99.9	> 99.9

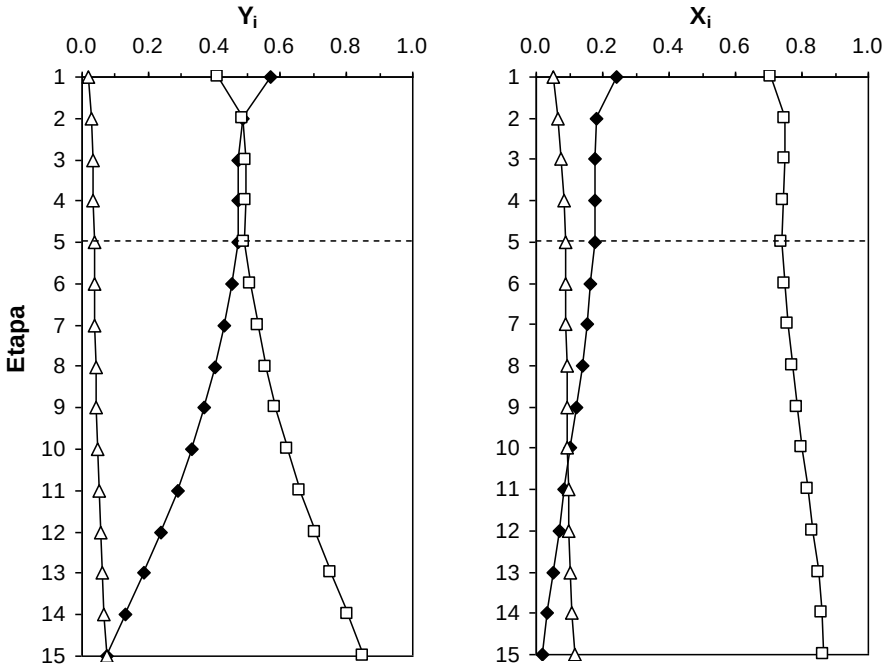


Figura 7.13. Fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* en contra-corriente con reflujo externo (P=90 bar, T=323 K, n=15, S/A=57 kg/kg, RR=0.67). Perfiles de composición molar en el extracto (Y_i) y en el refinado (X_i) a lo largo de la columna: (◆) MT, (□) OT, (△) ST.

En un segundo análisis, se evaluaron modificaciones en otras variables: relación S/A, relación de reflujo, número total de etapas y etapa de alimentación. Algunos resultados seleccionados pueden observarse en la Tabla 7.9.

Tabla 7.9.
Fraccionamiento continuo contracorriente con reflujo externo. Condiciones de operación seleccionadas y predicción de la concentración y recuperación de OT en el refinado (T=323K, P=90 bar)

Variable	I	II	III
Relación S/A (kg/kg)	57	57	86
Relación de reflujo	0.67	0.67	1.5
Número total de etapas	20	20	15
Etapa de alimentación	10	5	5
Concentración de MT en extracto (% molar, libre de CO_2)	47.5	55.4	53.6
Recuperación de MT en extracto (%)	85.2	82.3	79.6
Concentración de OT en refinado (% molar, libre de CO_2)	86.3	82.2	82.9
Recuperación de OT en refinado (%)	76.6	83.2	83.1
Concentración de ST en refinado (% molar, libre de CO_2)	13.5	17.0	17.0
Recuperación de ST en refinado (%)	100.0	97.9	99.2
CO_2 en el vapor del separador (% molar)	> 99.99	> 99.99	> 99.99

7.3.2. Análisis de la columna 2

La 2ª columna de fraccionamiento recibe como alimentación el líquido refinado proveniente de la columna anterior (constituido por 88% de OT y 12% de ST), para su separación en un extracto rico en OT y un nuevo refinado rico en ST. En este caso, a diferencia de los anteriores, la fracción que la fase supercrítica debe remover es la más abundante.

La Figura 7.14 muestra la selectividad entre OT y ST y la solubilidad global predichas por el modelo para el nuevo sistema en función de la presión, para dos temperaturas. Se observa el compromiso usual entre ambas variables, correspondiendo las condiciones de mayor selectividad a las de menor solubilidad y viceversa.

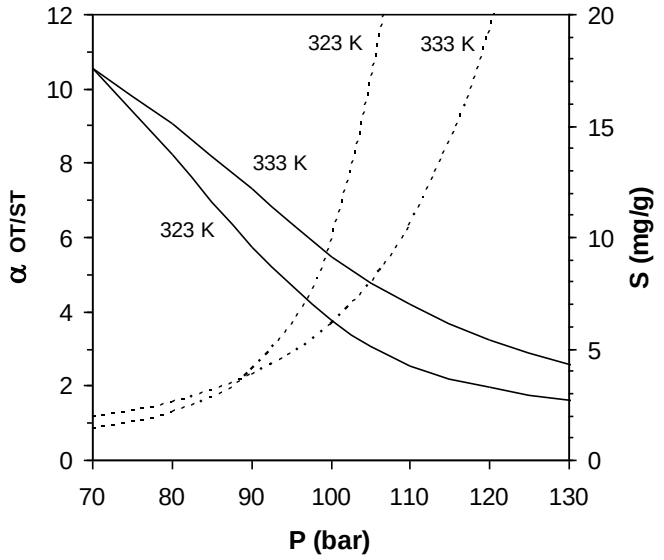


Figura 7.14. Selectividad (—) y solubilidad (- - -) de OT y ST de aceite de *S. officinalis* en CO_2 supercrítico en función de la presión y la temperatura, para la 2ª columna de fraccionamiento.

El efecto del caudal de solvente puede observarse en la Figura 7.15, que muestra los resultados de concentración y recuperación de OT en el extracto en función de la presión, para una columna de 5 etapas teóricas operando en contra-corriente simple a 333 K y distintas relaciones S/A. La Tabla 7.10 muestra los mejores resultados obtenidos en los cálculos.

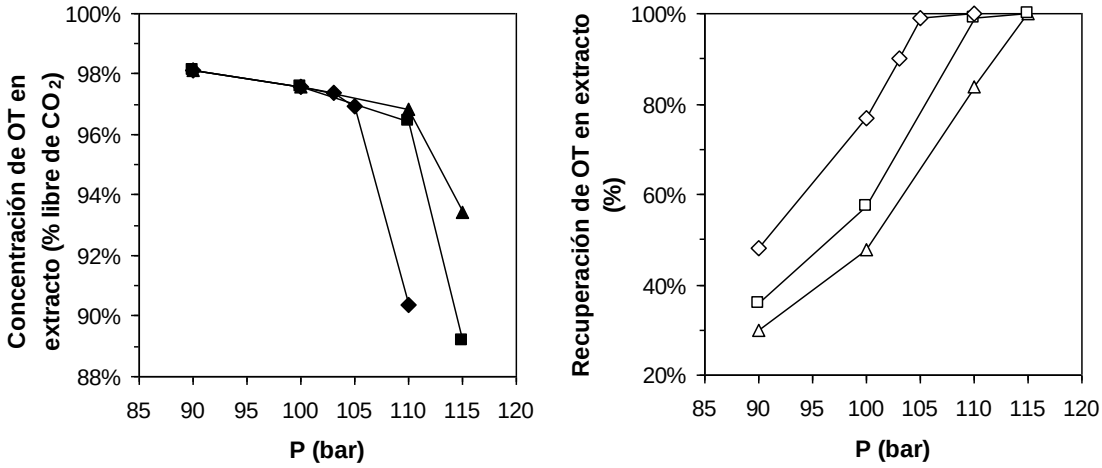


Figura 7.15. Concentración y recuperación de OT en el extracto en 2ª columna de fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* a T=333 K. (▲△) S/A=71 kg/kg (250 mol/mol), (■□) S/A=86 kg/kg (300 mol/mol), (◆◇) S/A=114 kg/kg (400 mol/mol).

Tabla 7.10.
Concentración (X,Y) y recuperación (Φ) de OT y ST en extracto y refinado en la 2ª columna de fraccionamiento de aceite de *S. officinalis* (operación en contra-corriente simple, n=5, T=333 K).

S/A (kg/kg)	P (bar)	Y_{OT} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{OT} (%)	X_{ST} (% molar, libre de CO_2)	Φ_{ST} (%)
71	110	96.8	83.7	40.0	79.8
	115	93.4	99.9	99.2	48.6
86	110	96.4	98.9	90.2	73.3
	115	89.2	100.0	100.0	11.3
114	100	97.6	76.8	33.6	86.0
	103	97.4	90.0	52.8	82.1
	105	96.9	99.1	92.1	76.9
	110	90.4	100.0	100.0	22.0

El análisis de los resultados numéricos sugiere que las condiciones recomendables de operación de la 2ª columna se encuentran en torno a **333 K, 105 bar** y una relación S/A de **114 kg/kg**. En tal caso se obtiene un extracto con una pureza de 97% de OT y una recuperación del 99%. Como refinado se obtiene un producto con 92% de ST y una recuperación del 77%, de acuerdo a los límites impuestos por la volatilidad relativa en esas condiciones.

7.4. Fraccionamiento de aceite de *Mentha piperita*

Como se explicó en el Capítulo 6, para este aceite se identificaron dos fracciones de componentes de distinta volatilidad, que se representan aquí por medio de dos pseudo-componentes: **mentona** y **mentol**. Si bien no son los compuestos mayoritarios de esta muestra, se trata de componentes típicos de este tipo de aceite. Además, su cercana volatilidad (como puede observarse en las curvas de presión de vapor de la Figura 5.x, y en el perfil cromatográfico del aceite de la Figura 1.x) permite considerarlos componentes "clave", ya que su separación asegura la del resto de los componentes de cada fracción.

Se analizaron dos casos de fraccionamiento:

1) Fraccionamiento de aceite *natural* (80% de mentol). En este caso, se propone el fraccionamiento con CO_2 supercrítico como alternativa al proceso de separación del mentol por medio de cristalización.

2) Fraccionamiento de aceite *"desmentolado"*. Como se mencionó, este aceite es el producto residual obtenido luego del proceso de cristalización de mentol, y constituye un producto de poco valor, aunque todavía contiene alrededor de 40% de mentol. En este caso, el fraccionamiento supercrítico se propone como alterntiva al rectificado tradicional, de manera de obtener un producto rico en mentol (de mayor actividad antimicrobiana) y otro rico en mentonas, que poseen mayor actividad frente a insectos y otros artrópodos.

El examen de las Figuras 6.13 (a–b), en el Capítulo 6, permite inferir que el fraccionamiento del aceite de *M. piperita* natural plantea un escenario más difícil que los anteriores, debido a la baja selectividad observada en la separación, con valores de volatilidad relativa entre 1 y 1.8, de acuerdo a las condiciones de presión y temperatura. Como en los casos anteriores, la selectividad se reduce con la densidad del solvente, obteniéndose los valores más altos a presiones levemente superiores a la crítica (alrededor de 75 bar). Se observa también un leve deterioro de la selectividad con la temperatura, indicando que esta variable incide más en la presión de vapor del compuesto menos volátil (mentol).

Ello limita severamente las posibilidades de obtener fracciones puras o nítidamente separadas en una columna en contra-corriente simple. Por ejemplo, considerando una volatilidad relativa de 1.5, si se quiere recuperar el 90% de mentol en el refinado, sólo podrá lograrse simultáneamente una recuperación del 15% de la fracción de mentonas en el extracto, lo cual por supuesto repercute en la concentración de los productos.

Los efectos de la presión, la temperatura y la relación S/A pueden observarse en la Figura 7.16, que muestra los resultados de las simulaciones para algunos casos seleccionados.

De acuerdo a los resultados numéricos, operando a 333 K y 90 bar puede obtenerse un refinado con 95% de mentol pero con menos del 30% de recuperación, junto con un extracto de 25% de mentona y una recuperación del 95%. Además, es preciso operar en condiciones de elevada relación S/A (superior a 150 kg/kg) para obtener resultados aceptables, con riesgo de cruzar los límites de la región bifásica en la zona superior de la columna. En el caso de operar en condiciones de más baja presión (75 bar), los caudales de solvente requeridos implicarán un diámetro de columna excesivamente grande, debido a la baja densidad.

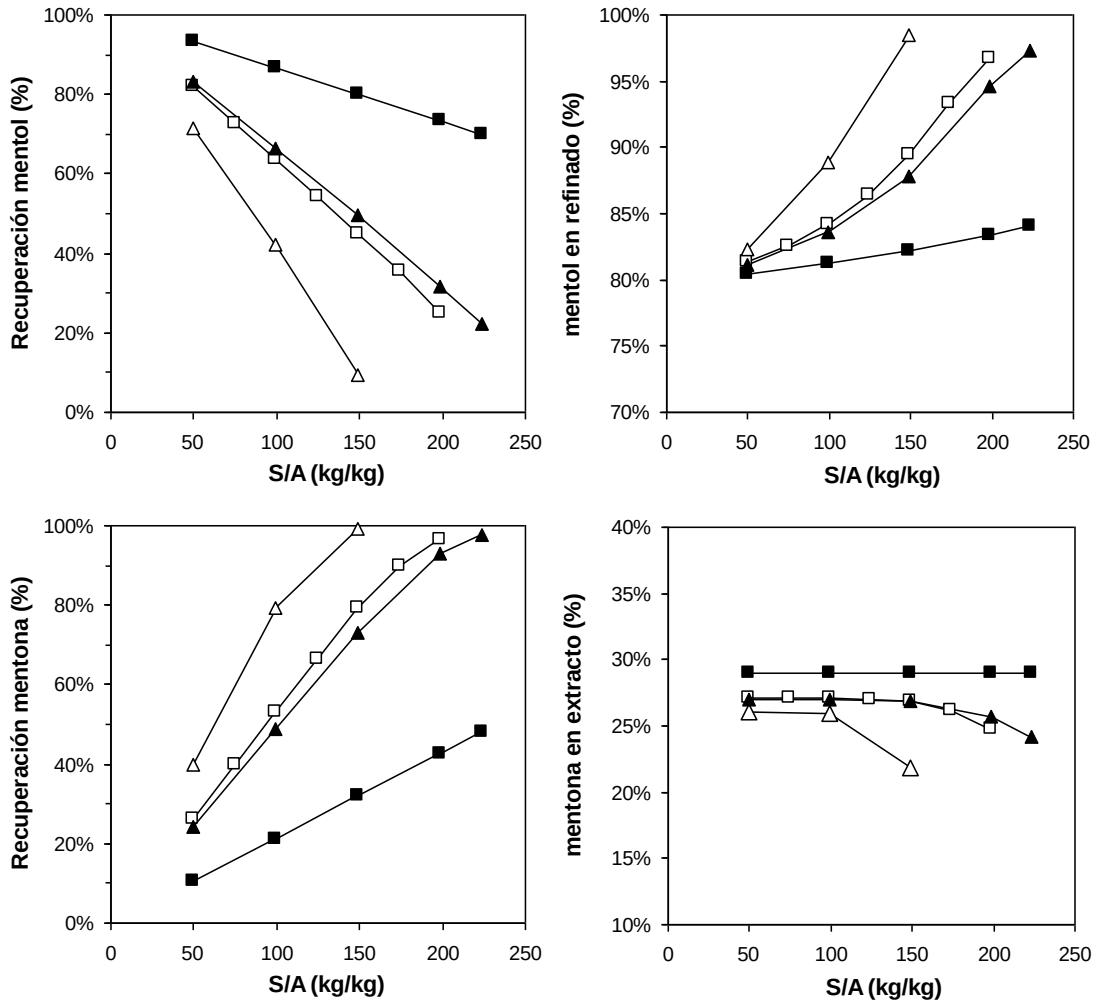


Figura 7.16. Fraccionamiento de aceite natural de *M. piperita* en una columna en contra-corriente simple (n=10). (■) 323 K–75 bar; (□) 323 K–90 bar; (▲) 333 K–90 bar; (△) 333 K–100 bar.

Se observa en particular que la concentración de mentona en la fase vapor tiene un valor límite de 25 a 30%, aumentando ligeramente a menor densidad del CO_2 y disminuyendo a medida que aumenta la relación S/A. Este comportamiento limita notablemente el efecto que podría lograrse mediante el uso de reflujo externo sobre el desempeño de la separación, ya que la corriente de reflujo (producto de la condensación de la corriente de tope) tiene una composición muy cercana a la de la alimentación, y por lo tanto la sección superior de la columna no opera prácticamente como una sección de rectificación. Los resultados numéricos confirman esta conclusión, al no observarse mejoras en la separación.

Cuando se analiza el uso de aceite desmentolado como alimentación –modelado como una mezcla binaria constituida por 60% de mentona y 40% de mentol– se observan las mismas limitaciones impuestas por la baja volatilidad relativa. Las simulaciones de columna simple indican que la máxima concentración de mentona que puede obtenerse en la fase extracto es de 69-70%. Aún puede obtenerse un refinado rico en mentol (hasta 95%) pero con una muy baja recuperación, inferior al 20%.

El caso presenta algunas similitudes con el fraccionamiento de aceite de lavanda reportado por Varona y col. [16]. En este trabajo, ya mencionado en el Capítulo 3, se propone el fraccionamiento de una mezcla pseudo-binaria de linalool (57%) y linalil acetato (43%) con CO_2 supercrítico en una columna en contra-corriente. Este sistema presenta un comportamiento semejante al binario mentona-mentol en cuanto a la selectividad, que varía entre 1 y 2 aprox. Los autores simularon una columna operando a 75 bar y 323 K, con una relación S/A aproximada de 200 kg/kg, alimentación en el centro de la columna y reflujo externo (aunque no informan la relación de reflujo utilizada). En estas condiciones de baja densidad, obtuvieron un extracto rico en linalool (94%) pero con baja recuperación (40%) y un refinado levemente enriquecido en linalil acetato (56%) y con alta recuperación (98%).

Se simuló entonces un proceso similar para el caso del aceite desmentolado, en una columna de 15 etapas y alimentación de aceite en la etapa 10, operando a 323 K, 90 bar y relación S/A de 303 kg/kg. Se seleccionaron estas condiciones de manera de asegurar la coexistencia de dos fases en toda la columna (a 75 bar esta condición no se aseguraba). En estas condiciones, la volatilidad relativa es de 1.38. El reflujo se estimó a partir de la siguiente ecuación, que relaciona la relación de reflujo mínima ($RR_{\min}$) con la volatilidad relativa para una separación binaria perfecta en una columna de destilación [5]:

$$RR_{\min} = \frac{1}{z_F(\alpha - 1)}$$

en donde z_F es la composición de la alimentación (aquí en base libre de solvente) y α la volatilidad relativa en las condiciones de la alimentación. El valor obtenido para la relación de reflujo mínima es de 5.6, equivalente a realimentar como reflujo el 85% del producto de tope condensado. En tales condiciones, se obtuvo un extracto de tope enriquecido, constituido por 87.1% de mentona, aunque con una recuperación de sólo el 18%. El refinado obtenido es prácticamente igual al aceite alimentado (46.8% de mentol,

con 96% de recuperación). La Figura 7.17 muestra los perfiles de composición a lo largo de la columna, en ambas secciones.

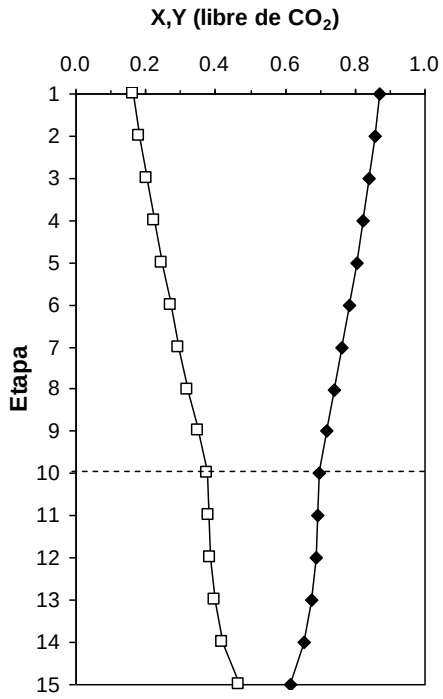


Figura 7.17.
Perfiles de composición en una columna de fraccionamiento de aceite desmentolado de *M. piperita* (n=15, alimentación en etapa 10) operando a T=323 K, P=90 bar, S/A=303 kg/kg.
(◆) Concentración de mentonas en fase vapor,
(□) Concentración de mentol en fase líquida.

7.5. Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado mediante simulaciones el desempeño de distintos esquemas de columnas multietapa en contra-corriente para el fraccionamiento de los aceites esenciales y la purificación de sus fracciones y componentes con actividad biocida. Las simulaciones se realizaron utilizando subrutinas de cálculo de columnas y separadores flash, que utilizan como modelo termodinámico la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS), previa verificación de la correcta descripción de los datos experimentales. Se analizó el efecto de las distintas variables operativas (presión, temperatura, relación solvente/alimentación, número de etapas teóricas, relación de reflujo) sobre la calidad de los productos obtenidos y el desempeño general de la separación, hallándose condiciones recomendables de trabajo.

Los resultados generales indican que es posible obtener por medio de esta tecnología una separación eficiente, que se traduce en productos concentrados y con buena recuperación de compuestos valiosos. El análisis de *screening* realizado permite obtener algunas

conclusiones. La separación entre monoterpenos hidrocarbonados (MT) y oxigenados (OT) es más eficiente a 90 bar y temperaturas entre 323 y 333 K, con relaciones S/A razonablemente bajas para este tipo de procesos (entre 60 y 80 kg/kg). Por otra parte, la separación más eficiente entre oxigenados y sesquiterpenos (ST) se obtiene en torno a 105 bar, 323–333 K y a mayores niveles de relación S/A (entre 110 y 120 kg/kg).

La información presentada en este capítulo pretende ser un primer paso en el diseño de un proceso industrial para el aprovechamiento de aceites esenciales con potencial biocida. Por supuesto, para avanzar en el diseño del proceso es preciso verificar estos resultados y tendencias en una columna de fraccionamiento experimental (a escala piloto o de laboratorio), de manera de obtener información respecto de la altura de la etapa teórica y demás características fluidodinámicas que permitan realizar el dimensionamiento con confianza.

Asimismo, es necesario realizar un estudio económico. Sin embargo, puesto que no se trata de productos actualmente disponibles a nivel comercial, es difícil predecir o estimar precios y volúmenes de producción, datos indispensables para un estudio semejante.

En el próximo capítulo, que cierra el trabajo principal de esta tesis, se presentan algunos resultados referidos a la actividad biocida de las fracciones obtenidas a partir del aceite de *T. minuta*, utilizado como caso de estudio. Si bien los resultados son preliminares, permiten obtener información –por ejemplo– sobre las concentraciones letales frente a distintos parásitos, datos que pueden ser de gran utilidad a futuro para ponderar el tamaño del mercado potencial.

REFERENCIAS

[1] Brunner, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes*. Steinkopff Darmstadt Springer New York, 1994.

[2] Brunner, G. *Industrial process development. Countercurrent multistage gas extraction (SFE) processes*. J. of Supercritical Fluids 13 (1998) 283–301.

[3] Simoes, P.C., Matos, H.A., Carmelo, P.J., Gomes de Acevedo, E., Nunes da Ponte, N. *Mass transfer in countercurrent packed columns: Application to supercritical CO_2 extraction of terpenes.* Ind. Eng. Chem. Res. 34 (1995) 613-618.

[4] Martín, A., Cocero, M.J. *Mathematical modeling of the fractionation of liquids with supercritical CO_2 in a countercurrent packed column*. J. of Supercritical Fluids 39 (2007) 304-314.

[5] Seader, J.D., Henley, E.J., Hoper, D.K. *Separation Process Principles. Chemical and Biochemical Operations* (3rd Edition), John Wiley & Sons, Inc., 2011.

[6] Brignole, E.A., Andersen, P.M., Fredenslund, A. *Supercritical fluid extraction of alcohols from water*. Industrial and Engineering Chemistry Research 26 (1987) 254-261.

[7] Michelsen, M.L. *The isothermal flash problem. Part II. Phase-split calculation*. Fluid Phase Equilibria 9 (1982) 21-40.

[8] Stockfleth, R., Brunner, G. *Holdup, pressure drop, and flooding in packed countercurrent columns for the gas extraction.* Industrial & Engineering Chemistry Research 40 (2001) 347–356.

[9] Stockfleth, R., Brunner, G. *Hydrodynamics of a packed countercurrent column for the gas extraction.* Industrial & Engineering Chemistry Research 38 (1999) 4000–4006.

[10] Sato, M., Kondo, M., Goto, M., Kodama, A., Hirose, T. *Fractionation of citrus oil by supercritical countercurrent extractor with side-stream withdrawal*. J. of Supercritical Fluids 13 (1998) 331–317.

[11] Budich, M., Heilig, S., Wesse, T., Leibküchler, V., Brunner, G. *Countercurrent deterpenation of citrus oils with supercritical CO_2*. J. of Supercritical Fluids 14 (1999) 104–114.

[12] Sato, M., Goto, M., Hirose, T. *Supercritical fluid extraction on semi-batch mode for the removal of terpene in citrus oil*. Industrial & Engineering Chemistry Research 35 (1996) 1906–1911.

[13] Köse, O., Akman, U., Hortacsu, O. *Semi-batch deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide.* J. of Supercritical Fluids 18 (2000) 49–63.

[14] Espinosa, S. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (2001).

[15] Diaz, S., Espinosa, S., Brignole, E.A. *Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids. Optimal process and solvent cycle design*. J. of Supercritical Fluids 35 (2005) 49-61.

[16] Varona, S., Martin, A., Cocero, M.J., Gamse, T. *Supercritical carbon dioxide fractionation of Lavandin essential oil: Experiments and modeling.* J. of Supercritical Fluids 45 (2008) 181–188.

8. Conclusiones y trabajos a futuro

8.1. Conclusiones de la tesis

En esta tesis se ha presentado un estudio orientado al aprovechamiento de sustancias biocidas presentes naturalmente en los aceites esenciales de tres especies vegetales (*Tagetes minuta*, *Salvia officinalis* y *Mentha piperita*), mediante el fraccionamiento con dióxido de carbono supercrítico, tecnología considerada "limpia" por su bajo impacto, tanto en el ambiente como en el producto.

Dicho estudio se desarrolló aplicando los conceptos de la Ingeniería del Equilibrio entre Fases e implicó tanto una etapa experimental como una etapa de modelado termodinámico y simulación asistida por computadora, destinada a hallar las mejores condiciones para la purificación de los compuestos más activos (principalmente los terpenos oxigenados u OT).

En una primera parte, se obtuvo información experimental sobre el comportamiento de fases de los distintos sistemas multicomponente [CO_2 + aceite esencial]. Para ello se decidió montar y utilizar un equipo *dinámico* de alta presión, ya que este tipo de sistemas permite obtener información de manera rápida y comparable a la obtenida por otros métodos, además de que permite operar en condiciones de flujo, más cercanas al proceso real. La etapa de construcción y puesta a punto del equipo permitió adquirir conocimientos útiles del trabajo a alta presión y ganar destreza en la operación de este tipo de equipamiento.

Luego de la obtención de los aceites esenciales a partir del material vegetal mediante destilación de arrastre con vapor y su caracterización por medio de cromatografía de gases y espectroscopía de masa (GC-MS), se realizaron ensayos con CO_2 a alta presión cubriendo un rango de condiciones de presión y temperatura dentro de una ventana

operativa definida previamente en base a relevamiento de literatura y consideraciones de equilibrio de fases: 70 a 120 bar y 313 a 333 K. En estas condiciones, se analizó la solubilidad global y la composición de la fase supercrítica, obteniéndose coeficientes de distribución (K_i) y volatilidades relativas (α_{ij}) entre las fracciones, identificándose los componentes que tienden a enriquecerse en la fase vapor y aquellos que lo hacen en la fase líquida. También se determinaron algunos límites de la región bifásica. Como conclusiones generales de estos experimentos podemos mencionar las siguientes:

- Se observa una solubilidad global en la fase supercrítica de entre 2 y 10 mg/g (o entre 0.2 y 1% p/p), que aumenta con la densidad del solvente y la temperatura. Esto se traduce en un aumento de la solubilidad con respecto a la presión y en la aparición de puntos de inversión o *crossover* con respecto a la dependencia con la temperatura. Para los sistemas estudiados, se observa que se alcanza el límite de la región bifásica a alrededor de 100–120 bar (incrementándose con la temperatura).
- En general, se observa un compromiso entre selectividad y solubilidad (o capacidad solvente). Para lograr un elevado grado de separación entre las fracciones de interés es necesario operar a presiones relativamente bajas, nivel en el que la densidad del solvente (y su capacidad) es menor, requiriendo así un mayor caudal de CO_2.
- El grado de separación entre MT y OT en el aceite de *T. minuta* es elevado, con selectividades entre 5 y 15. El aceite de *S. officinalis* representa un caso intermedio, con un grado de separación limitado (selectividades entre 2 y 5). Esto sugiere un esquema más complejo de interacciones, con presencia de varios compuestos de volatilidad intermedia y una cantidad significativa de ST pesados. Éstos extienden la región de dos fases hacia presiones mayores, en las que los MT son totalmente miscibles con CO_2 en mezclas binarias, modificando su volatilidad. Por último, la separación entre las fracciones F1 (más volátil) y F2 (menos volátil) del aceite de *M. piperita* es la más difícil de lograr: la selectividad varía entre 1 y 2, y la composición de los extractos es muy cercana a la del aceite original. Las presiones de vapor relativamente semejantes de los componentes clave (mentona y *l*-mentol) ayudan a explicar la dificultad de esta separación.

Se realizaron también experimentos de fraccionamiento semicontinuo de los aceites de *T. minuta* y *S. officinalis* durante períodos de tiempo más prolongados, hasta niveles de

extracción del 50% aprox. Estos ensayos se realizaron en condiciones seleccionadas (313 K y 80 bar) y permitieron investigar la influencia de la variación de la composición en el comportamiento global del sistema. Las principales conclusiones de estos ensayos son las siguientes:

- Los extractos son inicialmente más ricos en MT (componentes de mayor volatilidad) que los aceites originales, de acuerdo a lo visto en las mediciones de equilibrio. Luego, a medida que los MT son removidos por la corriente continua de CO_2, los extractos de tope se van enriqueciendo en los compuestos menos volátiles (principalmente OT).
- En el caso de *T. minuta*, el proceso de fraccionamiento semicontinuo genera un extracto de 80% MT aprox. durante la primera parte, y luego su concentración se reduce rápidamente hasta su agotamiento casi total para un 50% de extracción del aceite. El refinado obtenido (producto "two-fold") tiene una concentración de 95% OT con una pérdida de 26% de OT en la fase extracto.
- En el caso de *S. officinalis*, la pérdida de OT en la fase extracto es mayor: por ejemplo, la remoción del 80% de MT implica la pérdida de un 33% de OT. La pureza, tanto del extracto como del refinado, es mucho menor. La composición de este aceite es más compleja, ya que contiene una cantidad mayor de ST y varios OT de volatilidad intermedia, algunos de ellos muy cercanos a MT como el 1,8-cineol.
- El comportamiento de los distintos componentes individuales dentro de la fracción de OT tambien fue estudiado. En el caso de *T. minuta*, se observó un efecto de fraccionamiento dentro de la fracción, con perfiles de tipo "curva de respuesta" secuenciales, aunque con un grado de solapamiento debido a las limitaciones del equipo para obtener una separación nítida. En el caso de *S. officinalis*, en cambio, las diferencias de volatilidad entre OT parecen ser muy pequeñas como para producir un efecto de fraccionamiento significativo en las condiciones estudiadas.

En cuanto al modelado termodinámico, simulación y análisis de columnas de fraccionamiento continuas en contra-corriente, se puntualizan las siguientes conclusiones:

- Se observó una buena concordancia entre los datos experimentales y las predicciones de la GC-EOS (no sólo de la composición inicial de equilibrio sino también de las

composiciones a lo largo del proceso), lo cual implica que el modelo propuesto representa en forma correcta la dependencia de las volatilidades relativas con la presión, la temperatura y la composición del sistema (dentro del rango analizado). Esto es un aspecto atractivo a la hora de modelar procesos de separación en los que existen cambios en la composición: ya sea en el tiempo (semicontinuos), en la posición (columnas en estado estacionario) o en la alimentación.

- En el caso del aceite de *T. minuta*, se simularon y analizaron distintas configuraciones de columna continua contra-corriente, recomendándose la operación a 90 bar, 323 K y relación solvente/alimentación de 76 kg/kg, en una columna de 5 etapas teóricas, obteniéndose un refinado con 99.7% de OT (ocimenonas) con una recuperación del 91%. El agregado de una sección de rectificación de 5 etapas con reflujo externo permitiría incrementar la recuperación al 98%.
- En el caso del aceite de *S. officinalis*, se propuso un fraccionamiento secuencial en dos columnas. Una primera columna separa los MT a 90 bar, 323 o 333 K y relación S/A de 57 kg/kg. La segunda columna permite separar los OT (que se extraen por tope) de los ST (que se extraen por el fondo) operando a 105 bar, 333 K y una relación S/A de 114 kg/kg. De este modo, se obtiene un producto constituido por 97% de OT (fracción más activa), libre a la vez de MT y de ST.
- En el caso del aceite de *M. piperita*, la selectividad del proceso es tan baja que no es posible obtener un producto purificado.

Se realizó también dentro del marco de esta tesis, y como posible aplicación, una evaluación de la actividad biocida de los extractos obtenidos en el fraccionamiento de aceite de *T. minuta* frente a dos parásitos de interés agropecuario.

- En el caso del *gorgojo del maíz (Sitophilus zeamais)*, se midió la actividad fumigante de la fracción de compuestos oxigenados, constituida casi totalmente por ocimenonas, comparativamente con el aceite completo y otras cetonas comúnmente presentes en otros aceites esenciales. Se observó que la toxicidad de estos compuestos purificados es notablemente mayor que la del aceite completo, indicando que son los principales responsables de la actividad biocida observada y reportada para este aceite. Por otra parte, la comparación con otras cetonas sugiere que la mayor toxicidad puede estar

asociada a la presencia de α,β−insaturaciones, ya que las cetonas con este tipo de estructura son más activas que las saturadas o las que tienen otro tipo de insaturación.

- En el caso del *nemátodo del nudo de la raíz (Meloidogyne javanica)*, se evaluó la toxicidad por contacto de distintos extractos obtenidos a lo largo del fraccionamiento semi-continuo, con distinta composición en términos de MT y OT. Se observó que la toxicidad aumenta a medida que aumenta la proporción de OT, para una misma concentración aplicada.

Finalmente, cabe destacar que las tecnologías propuestas y aplicadas en esta tesis son de interés para el desarrollo sustentable y la valorización de productos agrícolas, dado que se basan en recursos naturales renovables y tienen bajo impacto ambiental. Los productos obtenidos pueden aplicarse en el marco de un manejo integral de control de plagas, contribuyendo al desarrollo de técnicas agroalimentarias más saludables y menos dependientes de plaguicidas sintéticos.

8.2. Trabajos a futuro

El trabajo presentado en esta tesis se limita al fraccionamiento de tres aceites esenciales: *Tagetes minuta, Salvia officinalis* y *Mentha piperita*. Sin embargo, la metodología puede extenderse a aceites extraídos de otras especies, con otras composiciones, e incluso a otras familias de compuestos. El estudio del fraccionamiento de un mayor número de aceites puede conducir a observaciones de carácter más general, con el objetivo de diseñar una estrategia más sistemática para la selección de condiciones óptimas de operación en función de las características de la mezcla y los componentes a separar, utilizando las herramientas computacionales disponibles y el enfoque de la ingeniería del equilibrio de fases.

También es de interés *ampliar el conocimiento del comportamiento de fases* de los sistemas estudiados, especialmente en lo referido a la composición real de la fase líquida y su contenido de solvente supercrítico, así como la determinación de envolventes de fases y valores más precisos de selectividad. Este estudio experimental puede

desarrollarse utilizando una celda de equilibrio de alta presión, con ventanas de observación que permitan detectar transiciones de fases y equilibrios multifásicos.

Dentro de este estudio, resulta de gran interés profundizar la investigación de la *separación de isómeros tipo cis-trans* (o *Z-E*) en base a sus propias diferencias de volatilidad, ya que con frecuencia el componente biológicamente activo es uno de los isómeros. Este fenómeno ha sido observado y referido de manera preliminar en la tesis, pero requiere una exploración más sistemática y la búsqueda de estrategias para incrementar la separación.

Desde el punto de vista ***experimental***, el equipo montado y utilizado en esta tesis ha demostrado ser verśatil y confiable, ya que permite realizar mediciones de equilibrio, ensayos de fraccionamiento y extracción de manera repetitiva. No obstante, se sugieren las siguientes modificaciones con el objetivo de mejorar su funcionamiento y facilitar la operación:

- Incorporar una bomba de alta presión para alimentar el solvente en estado supercrítico, en lugar del actual generador manual de presión. Al automatizar esta operación, se facilitará el control del caudal, se eliminarán las dificultades asociadas a la recarga del generador manual y podrán desarrollarse experimentos de mayor duración.
- Incorporar una segunda bomba de alta presión para alimentar cosolventes. De esta manera, podrá regularse la polaridad de la fase solvente y modificarse la selectividad. Esto será particularmente útil en estudios de extracción supercrítica a partir de matrices vegetales o fraccionamiento de sustancias de muy baja solubilidad.
- Mejorar el sistema de recuperación del aceite residual de la columna, para evitar los problemas de obturación que surgen en la válvula de expansión cuando se alcanzan condiciones homogéneas en la columna.
- Incorporar el análisis cromatográfico en línea de la corriente de salida del extractor, de manera de obtener un seguimiento más cercano de las variaciones de composición sin necesidad de manipular excesivamente las muestras.

Asimismo, se propone como trabajo futuro la construcción y puesta a punto de una *columna de fraccionamiento* de mayor tamaño, provista de sistemas de alimentación de aceite esencial y solvente supercrítico, para la realización de experimentos en contra-corriente. Este equipo permitiría validar las tendencias observadas en las simulaciones numéricas y suministrar información sobre aspectos fluidodinámicos de los sistemas estudiados, necesarios para avanzar en el diseño de una columna industrial.

Finalmente, con respecto a las ***aplicaciones***, se proponen dos líneas de trabajo:

a) Continuar investigando las *propiedades biocidas* de los productos obtenidos, evaluando su actividad repelente, fumigante, antimicrobiana y demás tipos de toxicidad frente a un mayor número de parásitos y microorganismos, determinando sus dosis letales o activas y su efectividad comparativa con respecto a biocidas comerciales. Este estudio permitirá detectar posibles nichos de aplicación y estimar el tamaño del mercado potencial.

b) Estudiar la incorporación de los productos biocidas obtenidos en sistemas de *liberación controlada*, por ejemplo dispositivos repelentes o envases. Esto puede lograrse por medio de la impregnación supercrítica de películas poliméricas o partículas incorporadas posteriormente a películas poliméricas. Otra potencial aplicación es la generación de partículas recubiertas de biocida mediante encapsulación por efecto antisolvente.