

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Influencia de los parámetros de operación y de la condición del sólido en el proceso de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Aplicación en el desarrollo de procesos sostenibles de interés comercial**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Miguel Viguera Sáenz**

DIRECTORA

**Lourdes Calvo Garrido**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Programa de doctorado en Ingeniería Química**



**TESIS DOCTORAL**

**INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN Y  
DE LA CONDICIÓN DEL SÓLIDO EN EL PROCESO DE  
EXTRACCIÓN CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO. APLICACIÓN  
EN EL DESARROLLO DE PROCESOS SOSTENIBLES DE  
INTERÉS COMERCIAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Miguel Viguera Sáenz**

**Directora**

**Dra. Lourdes Calvo Garrido**

**Madrid, 2018**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

LOURDES CALVO GARRIDO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado *Influencia de los parámetros de operación y de la condición del sólido en el proceso de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Aplicación en el desarrollo de procesos sostenibles de interés comercial*, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, y constituye la memoria que presenta **Miguel Viguera Sáenz** para optar al grado de *Doctor en Ingeniería Química* que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Madrid a 6 de septiembre de 2018.

Prof. Dra. Lourdes Calvo Garrido



# TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de tres artículos científicos previamente publicados. Estos documentos se presentan al final de esta tesis y se referencian a continuación:

- I. The removal of lubricating oils from metallic contacts with supercritical CO<sub>2</sub>  
M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, M.I. Barrena, L. Calvo  
The Journal of Supercritical Fluids, Volume 73, enero 2013, págs. 51-56  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.09.015>
  
- II. The parameters that affect the supercritical extraction of 2,4,6-trichloroanisol from cork  
Miguel Viguera, C. Prieto, J. Casas, E. Casas, A. Cabañas, Lourdes Calvo  
The Journal of Supercritical Fluids  
Disponible online 27 marzo 2018 In Press, Corrected proof  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.017>
  
- III. The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae  
M. Viguera, A. Martí, F. Masca, C. Prieto, L. Calvo  
The Journal of Supercritical Fluids  
Volumen 113, julio 2016, páginas 16-22  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.001>



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría mostrar mi profundo agradecimiento a la profesora Lourdes Calvo Garrido por darme la oportunidad de unirme a su grupo para realizar esta tesis doctoral. Sin su entusiasmo y sus brillantes consejos este trabajo no habría sido posible. Me gustaría destacar también su habilidad para hacer del grupo de investigación una pequeña familia.

También quisiera agradecer al profesor Gómez de Salazar su paciencia y dedicación a la hora de explicarme el funcionamiento del microscopio electrónico. No puedo dejar pasar la oportunidad de mencionar también a la profesora Cabañas, por haberme permitido usar su celda de alta presión, a Elvira Casas, de AINIA, a los distintos servicios de la UCM por su inestimable y, a veces silenciosa labor, en el manteniendo de la maquinaria de la investigación, así como a los distintos organismos y empresas financiadores.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Javier, Cristina, Laura y Diego quiero darles las gracias por su cooperación y, sobre todo, por haber hecho mucho más llevaderos los largos días de trabajo en el laboratorio.

Por último, reservo un especial y sincero agradecimiento a mi familia, a mis amigos y a Cristina. Sin su apoyo incondicional y su comprensión esta tesis no habría llegado a buen puerto.



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Disolventes supercríticos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Extracción supercrítica.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Aplicaciones industriales y nuevas aplicaciones en extracción     supercrítica.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1. Aplicaciones de eliminación de contaminantes o limpieza .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2. Aplicaciones de extracción de compuestos de alto valor         añadido.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>50</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>5. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1. Materiales.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2. Metodología.....</b>	<b>70</b>
<b>6. DISCUSIÓN INTEGRADORA: ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA.....</b>	<b>79</b>
<b>6.1. Tipos de materia prima y localización del soluto.....</b>	<b>83</b>
<b>6.2. Etapas de la extracción supercrítica.....</b>	<b>84</b>

<b>6.3. Equilibrio.....</b>	<b>86</b>
<b>6.3.1. Presión.....</b>	<b>86</b>
<b>6.3.2. Temperatura.....</b>	<b>87</b>
<b>6.3.3. Adición de codisolvente.....</b>	<b>91</b>
<b>6.4. Transferencia interna.....</b>	<b>93</b>
<b>6.4.1. Humedad.....</b>	<b>96</b>
<b>6.4.2. Impacto de la aplicación de técnicas de apertura celular.....</b>	<b>100</b>
<b>6.5. Transferencia externa.....</b>	<b>102</b>
<b>6.5.1. Temperatura.....</b>	<b>104</b>
<b>6.5.2. Presión.....</b>	<b>105</b>
<b>6.5.3. Caudal.....</b>	<b>105</b>
<b>6.6. Consumo de disolvente.....</b>	<b>112</b>
<b>6.7. Cambio de escala.....</b>	<b>115</b>
<b>6.7.1. Definición de las condiciones iniciales.....</b>	<b>115</b>
<b>6.7.2. Proceso.....</b>	<b>116</b>
<b>6.7.3. Modelado.....</b>	<b>117</b>
<b>6.7.4. Balance de materia.....</b>	<b>125</b>
<b>6.7.5. Balance de energía.....</b>	<b>126</b>
<b>6.7.6. Ingeniería de proceso.....</b>	<b>129</b>
<b>6.7.7. Análisis de costes.....</b>	<b>140</b>

6.8. Referencias bibliográficas.....	148
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
7.1. Eliminación de aceite lubricante de contactos metálicos.....	157
7.2. Eliminación de TCA contaminante en gránulos de corcho.....	159
7.3. Extracción de lípidos de microalga.....	160
7.4. Conclusiones globales.....	163
7.5. Referencias bibliográficas.....	166
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>169</b>
ANEXO I.....	171
ANEXO II.....	179
ANEXO III.....	187
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>195</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Densidad y viscosidad del CO <sub>2</sub> a distintas P y T.....	25
<b>Figura 3.2.</b> Esquema de un proceso de extracción supercrítica con recirculación del CO <sub>2</sub> .....	28
<b>Figura 3.3.</b> Lavadora fabricada por Tersus Solutions.....	36
<b>Figura 5.1.</b> Imagen de un contacto metálico y esquema con dimensiones .....	69
<b>Figura 5.2.</b> Esquema de la instalación de extracción supercrítica de sólidos de la UCM. ....	71
<b>Figura 5.3.</b> Equipo utilizado para la determinación de las propiedades mecánicas del corcho y curva característica de evolución de la fuerza de compresión con respecto al tiempo. ....	75
<b>Figura 5.4.</b> Distribución de tamaños de partícula de la microalga. ....	77
<b>Figura 6.1.</b> Perfil de concentraciones durante la extracción supercrítica de un soluto contenido en una partícula sólida.....	82
<b>Figura 6.2.</b> Ejemplo de curva de extracción. ....	85
<b>Figura 6.3.</b> Variación de la solubilidad de aceite lubricante con la presión a dos temperaturas diferentes. ....	88
<b>Figura 6.4.</b> Efecto de la temperatura en la extracción de aceite lubricante. ....	89
<b>Figura 6.5.</b> Curvas de extracción a diferentes condiciones de operación.....	90
<b>Figura 6.6.</b> Imágenes de microscópica electrónica de la superficie de los contactos superiores. ....	93
<b>Figura 6.7.</b> Curvas de extracción utilizando distintos contenidos de agua.....	98
<b>Figura 6.8.</b> Curvas de extracción con distintos métodos de ruptura celular.....	101

<b>Figura 6.10.</b> Curvas de extracción de lípidos de microalga usando distintos caudales máxicos. ....	109
<b>Figura 6.11.</b> Velocidad de extracción de lípidos de microalga para distintas ratios de disolvente a tres momentos. ....	109
<b>Figura 6.12.</b> Efecto del caudal de CO <sub>2</sub> en la extracción de aceite lubricante. ..	110
<b>Figura 6.13.</b> Concentración residual de TCA en gránulos de corcho después de extracciones con distintos t de residencia del CO <sub>2</sub> en el lecho de corcho. ....	111
<b>Figura 6.14.</b> Efecto de la relación másica CO <sub>2</sub> /corcho en el contenido residual de TCA a distintas densidades. ....	114
<b>Figura 6.15.</b> Grado de extracción del aceite respecto del extraíble en función del consumo de CO <sub>2</sub> relativo.. ....	114
<b>Figura 6.16.</b> Esquema de la instalación industrial para producción continua....	117
<b>Figura 6.17.</b> Ajuste del modelo de Sovová a los datos experimentales de extracción de aceite de microalga. ....	122
<b>Figura 6.18.</b> Representación del parámetro de transferencia de materia en fase fluida respecto a la velocidad lineal. ....	124
<b>Figura 6.19.</b> Diagrama de Mollier para el CO <sub>2</sub> . ....	127
<b>Figura 6.20</b> Instrucciones de selección de tipo de bomba en función de la presión y el caudal de operación.....	137
<b>Figura 6.21.</b> Hombre-hora por turno y día en plantas químicas. ....	143

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Propiedades físicas del CO <sub>2</sub> en sus distintas fases. ....	26
<b>Tabla 3.2.</b> Empresas fabricantes de soluciones de extracción supercrítica, su ubicación y su página web. ....	31
<b>Tabla 6.1.</b> Rendimiento de la extracción de aceite mineral cuando se añade etanol. ....	92
<b>Tabla 6.2.</b> Impacto de la presión de operación sobre las propiedades del disolvente supercrítico sobre la eliminación de TCA. ....	95
<b>Tabla 6.3.</b> Efecto de la humedad del corcho en función del tiempo contacto en la extracción de TCA a partir de gránulos de corcho. ....	99
<b>Tabla 6.4.</b> Influencia de la temperatura en la solubilidad de aceite en CO <sub>2</sub> y la difusividad de aceite en CO <sub>2</sub> . ....	105
<b>Tabla 6.5.</b> Parámetros característicos de la resistencia a la transferencia externa calculados a distintas presiones, temperaturas y caudales. ....	107
<b>Tabla 6.6.</b> Consumo de CO <sub>2</sub> en función de la concentración inicial del extracto en el sólido y de las condiciones de operación que determinan la densidad del CO <sub>2</sub> . ....	113
<b>Tabla 6.7.</b> Coeficientes de transferencia de materia ajustados a partir del modelo de Sovová en la extracción de lípidos de microalga. ....	120
<b>Tabla 6.8.</b> Parámetros de diseño de los extractores H-101/A-F. ....	131
<b>Tabla 6.9.</b> Parámetros de diseño del separador. ....	133
<b>Tabla 6.10.</b> Parámetros de diseño de los tanques de almacenamiento. ....	134
<b>Tabla 6.11.</b> Espesores de los equipos. ....	135
<b>Tabla 6.12.</b> Parámetros de diseño de bomba. ....	138
<b>Tabla 6.13.</b> Parámetros de diseño del intercambiador de calor. ....	140
<b>Tabla 6.14.</b> Coste de instalación de equipos. ....	141
<b>Tabla 6.15.</b> Determinación de la inversión mediante el método de %. ....	142

<b>Tabla 6.16.</b> Determinación del coste anual de los servicios generales .....	145
<b>Tabla 6.17.</b> Principales partidas del proceso productivo a lo largo de un año, coste total y unitario del producto. ....	147



# **1. RESUMEN**



Un componente puro está en estado supercrítico si su temperatura y presión son mayores de los valores críticos. El fluido supercrítico (sc) más empleado es el CO<sub>2</sub> ya que su punto crítico es fácilmente alcanzable (31,1 °C y 7,4 MPa), está disponible, no es tóxico ni reactivo y es barato. En esta fase, se vuelve apolar y permite extraer componentes orgánicos de matrices sólidas con facilidad.

En un proceso de extracción supercrítica (ESC) se hace pasar una corriente de CO<sub>2</sub>, a través de un extractor donde se dispone la materia prima. A su paso por el lecho y en función de las condiciones de extracción, el CO<sub>2</sub> se carga selectivamente de los compuestos más solubles. Una vez fuera del extractor, se despresuriza para recoger el extracto precipitado y recircular el disolvente.

En la introducción de esta tesis se repasa las aplicaciones comerciales de la ESC y se describen las que actualmente tienen mejores perspectivas de llevarse a cabo a escala industrial. Este estudio se realizó revisando la actividad de las ingenierías que diseñan equipos de ESC. Entre las aplicaciones de mayor interés, están las destinadas a la obtención de extractos como antioxidantes, esteroides, aromas, colorantes, etc., tanto de residuos vegetales (para su revalorización) como de nuevas materias primas: microalgas o cáñamo.

Se estudió la extracción con CO<sub>2</sub>sc de varias matrices de interés industrial incluyendo aplicaciones de eliminación de impurezas y de obtención de productos de alto valor añadido. Además, se discutieron los fenómenos que afectaron a la disolución del soluto y a su transporte. Para ello, se investigó el impacto de los parámetros de operación y la condición inicial del sólido. Las aplicaciones estudiadas fueron:

- 1- Eliminación de aceite lubricante de contactos metálicos
- 2- Eliminación de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) en gránulos de corcho

### 3- Extracción de lípidos de microalga

En los tres ejemplos, el aumento de la presión mejoró la velocidad y rendimiento de la extracción, ya que con ello aumentó la densidad del disolvente y su capacidad de disolución. Sin embargo, hubo un máximo en su incremento por el aumento en la resistencia del transporte interno, mostrado en el caso del corcho. Además, se demostró para este mismo material, que un exceso de presión (45 MPa) causaba daños estructurales. Por ello, en esta aplicación, la presión más adecuada fue de 12-14 MPa.

La temperatura tuvo efectos contrarios. Su aumento favoreció la extracción tanto en el caso de la eliminación de aceite lubricante como en el de la extracción de aceite de microalga, a pesar de causar una reducción en la densidad del CO<sub>2</sub>. Además de incrementar la presión de vapor de los solutos, en el primero de los casos favoreció la desorción del lubricante fuertemente adherido a la superficie metálica y en el segundo, facilitó la rotura de la pared celular favoreciendo la difusión intracelular y por ende, la extracción. Por ejemplo, en la extracción de lípidos de microalgas hicieron falta 70 °C para alcanzar un máximo rendimiento de extracción del 21 %; en el caso de la eliminación de aceite lubricante, se tuvieron que alcanzar 110 °C y añadir un 5 % en masa de etanol al CO<sub>2</sub> para lograr la limpieza total de los contactos metálicos. Por el contrario, en la extracción de TCA a partir de gránulos de corcho, la temperatura tuvo que mantenerse en 45 °C.

La operación se llevó a cabo con los sólidos formando un lecho fijo y pasando a través de ellos el CO<sub>2</sub>sc en flujo laminar. Por ello, el incremento del caudal redujo la resistencia al transporte externo en la fase fluida y mejoró la velocidad de extracción. Sin embargo, hubo un óptimo porque a velocidad excesiva se redujo demasiado el tiempo de residencia en el extractor. En la extracción de microalga y de los contactos metálicos,

donde el soluto estaba disponible, la máxima velocidad de extracción correspondió a un caudal de 0,2 y 0,3 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, cuando el soluto era difícilmente accesible (TCA en corcho), el caudal óptimo fue mucho más bajo 0,09 kg h<sup>-1</sup> para dar tiempo de residencia en el extractor de varios minutos.

Hizo falta similar cantidad de CO<sub>2</sub> (43 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> corcho) para la eliminación de una cantidad ínfima (8,5 10<sup>-4</sup> %) de TCA, que para la eliminación de un 0,017 % de aceites lubricantes que contaminaban los contactos (50 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> contactos), además de otros 5 kg etanol. Mientras que para extraer un 19 % de lípidos neutros que contenían las microalgas (correspondiente al periodo de extracción con velocidad máxima), se necesitaron 68 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> corcho. El coste de este proceso se estimó en 2,2 € por kg de aceite para una producción de 10.000 t por año incluyendo el crecimiento de la microalga y la amortización de la instalación.

En relación con la condición del sólido, se demostró el importantísimo impacto de la humedad inicial. En el caso de los gránulos de corcho, se consiguió eliminar el TCA con una humedad del orden del 6 %. Contrariamente, un defecto de agua (< 4 %) encogió la estructura y dificultó la extracción.

En la extracción de los lípidos de la microalga, la molienda generó partículas de 100 µm y con la humedad en equilibrio con el ambiente (7 %), la velocidad de extracción fue máxima. No obstante, el secado del cultivo es una operación muy costosa energéticamente, así que hubo que optimizar el grado de humedad de la biomasa y combinarlo con técnicas de apertura celular. Con un porcentaje de humedad de 30 % y aplicando ultrasonidos (30 min, 37 kHz) y microondas (30 s, 800 W), la velocidad de extracción fue similar a la conseguida con la microalga seca, aunque el rendimiento final fue la mitad.

En conclusión, en todos los casos estudiados, los fenómenos de transporte tuvieron una contribución relevante en la velocidad y rendimiento de la ESC. Por ello, dependiendo de la localización del soluto, estructura del sólido y de los requerimientos de la operación, fue distinto el impacto de las condiciones de operación y el consumo de disolvente.

.

## **2. ABSTRACT**



A pure component is in supercritical state if its temperature and pressure are higher than the critical values. The most commonly used supercritical (sc) fluid is CO<sub>2</sub>, as its critical point is easily reached (31.1°C and 7.4 MPa); it is readily available, cheap, non-toxic and non-reactive. At supercritical conditions, it becomes non-polar and allows to extract organic components from solid matrices with ease.

In a supercritical extraction (SCE) process, a stream of the supercritical solvent, usually CO<sub>2</sub>, is passed through an extractor where the raw material is placed. As it passes through the bed, and depending on the extraction conditions, CO<sub>2</sub> is selectively charged from the most soluble compounds. Once out of the extractor, it is depressurized to collect the precipitated extract. The fluid is then recirculated.

The introduction to this thesis briefly reviews the commercial applications of supercritical extraction and describes those that are most likely to be carried out on an industrial scale. This study was conducted by reviewing the activity of the engineering firms designing SCE equipment. Among the applications of greatest interest are those aimed at obtaining extracts as antioxidants, sterols, aromas, dyes, etc., both from biomass waste (for its revalorization) and novel raw materials: microalgae or hemp.

The extraction with CO<sub>2</sub>sc of several industrial interest matrices was studied, including applications of impurity elimination and high added value products obtaining. In addition, the phenomena that affected the dissolution of the solute and its transport were discussed. To this end, the effect of the operating parameters and the initial condition of the solid was investigated. The applications studied were:

1. Removal of lubricating oil from metal contacts
2. Elimination of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) contaminant in cork granules
3. Extraction of neutral lipids from microalgae

In all three examples, the increase in pressure improved the extraction rate and yield, as it increased the solvent density and its dissolution capacity. However, in the case of cork, there was a maximum in its increase due to the rise in the resistance of internal transport. In addition, as demonstrated for the same material, excess pressure (45 MPa) caused structural damage. Therefore, in this application, the most appropriate pressure was 12-14 MPa.

The temperature had opposite effects. Its increase favored extraction of both the removal of lubricating oil and the extraction of microalgae oil, despite causing a reduction in CO<sub>2</sub> density. In addition to increasing the vapour pressure of the extracts, the desorption of the lubricant strongly adhered to the metallic surface was favored in the first case, and in the second case, the rupture of the cell wall was facilitated, favoring intracellular diffusion and, therefore, extraction. For example, in the extraction of lipids from microalgae, 70 °C was required to achieve a maximum extraction efficiency of 21 %; in the case of the elimination of lubricating oil, it was necessary to reach 110 °C and to add 5 % ethanol by mass to the CO<sub>2</sub>, to achieve total cleaning of the metal contacts. On the contrary, in the extraction of TCA from cork granules, it was necessary to achieve high CO<sub>2</sub> densities, so the temperature had to be maintained at 45 °C.

The operation was carried out with the solids forming a fixed bed and passing through them, the CO<sub>2</sub> in laminar flow. Therefore, the increase in the flow rate reduced the resistance to external transport in the fluid phase and favored the extraction speed. However, there was an optimum because at excessive speed, the residence time in the extractor was reduced too much, preventing the CO<sub>2</sub> from being loaded into the solute. In the removal of microalgae and metal contacts where the solute was available, the maximum extraction speed corresponded to a flow rate of 0.2 and 0.3 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>, respectively.

However, when the solute was difficult to access (TCA in cork), the optimum flow rate was much lower ( $0.09 \text{ kg h}^{-1}$ ) to provide several minutes residence time in the extractor.

A similar amount of  $\text{CO}_2$  ( $43 \text{ kg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ cork}$ ) was needed for the elimination of a negligible amount ( $8.5 \cdot 10^{-4} \%$ ) of TCA than to  $0.017 \%$  of lubricating oils that contaminated the contacts (in addition to another  $5 \text{ kg ethanol}$ ). While for the extraction of  $19 \%$  of neutral lipids contained in the microalgae (corresponding to the extraction period of maximum velocity), a little more consumption ( $68 \text{ kg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$ ) was needed. The cost of this process was estimated at  $2,2 \text{ €}$  per kg of oil for a production of  $10000 \text{ t}$  per year including the growth of the microalgae and the amortization of the installation.

In relation to the condition of the solid, the very important impact of the initial humidity was demonstrated. In the case of cork granules, the TCA was removed with a moisture content of the order of  $6 \%$ . Conversely, a water defect ( $< 4 \%$ ) shrunk the structure and made extraction difficult.

In the extraction of the lipids from the microalgae, the milling generated  $100 \mu\text{m}$  particles and with the humidity in equilibrium with the environment ( $7 \%$ ), the extraction rate was maximum. Nevertheless, drying the culture is a very energy-intensive operation, so the moisture content of the biomass had to be optimized and combined with cell opening techniques. Thus, with a moisture content of  $30 \%$  and the application of ultrasound ( $30 \text{ min}$ ,  $37 \text{ kHz}$ ) and microwaves ( $30 \text{ s}$ ,  $800 \text{ W}$ ), the extraction speed was like that achieved with dry microalgae, although the final yield was half.

In conclusion, in all the studied cases, transport phenomena had a relevant contribution to the SCE rate and yield. Therefore, according to the location of the solute, the structure of the solid and the operation requirements, the impact of the operating conditions and the solvent consumption was different.



### **3. INTRODUCCIÓN**



### 3.1. Disolventes supercríticos

Un componente puro está en estado supercrítico si su temperatura y presión son mayores de los valores críticos. Si partimos de una mezcla líquido-vapor y vamos aumentando su temperatura y presión progresivamente a lo largo de la curva líquido-vapor, entonces llegará un punto en que ambas fases se hagan idénticas en todas las propiedades. Eso es el punto crítico. Por encima de este punto hay una única fase homogénea, de tal forma que el fluido no puede licuarse incrementando la presión ni puede gasificarse aumentando la temperatura.

El fluido supercrítico más empleado es el CO<sub>2</sub> ya que su punto crítico es fácilmente alcanzable (31,1 °C y 7,4 MPa), se puede obtener de forma sencilla, es barato y no es tóxico. Se trata de un disolvente “verde” que se encuentra en la atmósfera, en alimentos y bebidas y del cual no necesita fijarse ningún contenido mínimo en los extractos, por lo que se puede emplear con toda seguridad. De hecho, está considerado un disolvente GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

Las propiedades PVT de CO<sub>2</sub> se conocen desde los años 30 del pasado siglo, su presión crítica es significativamente mayor que la de sus análogos alcanos, fluoroalcanos o hidrofluoroalcano como consecuencia del fuerte momento cuadrupolar del CO<sub>2</sub>, que afecta notablemente a sus propiedades físicas [1].

La Figura 3.1 muestra la densidad y viscosidad del CO<sub>2</sub> supercrítico a distintas presiones y temperaturas. Ambos parámetros descienden a medida que aumenta la temperatura, pero aumentan considerablemente con la presión, siendo la variación más acusada entorno al punto crítico. Por ejemplo, la densidad pasa

de ser del orden de  $200 \text{ kg m}^{-3}$  a 10 MPa y altas temperaturas, a  $900\text{-}1000 \text{ kg m}^{-3}$  a 35-40 MPa y temperaturas suaves.

Este hecho es muy relevante porque con solo cambios en las condiciones de operación, se puede variar ampliamente la densidad del  $\text{CO}_2$  supercrítico ( $\text{CO}_{2sc}$ ) y consecuentemente su capacidad de disolución.

Por otro lado, la viscosidad del  $\text{CO}_2$ , aunque también aumenta notablemente con la presión, es solo 1/10 de la de los fluidos líquidos y por lo tanto los números de Reynolds para el  $\text{CO}_2$  será aproximadamente diez veces mayor que para los fluidos convencionales a una velocidad de fluido comparable [2].

En la Tabla 3.1 se resumen las propiedades del  $\text{CO}_{2sc}$  y se comparan con los valores típicos de gases y líquidos. Como se puede observar, el  $\text{CO}_{2sc}$  tiene propiedades intermedias entre las fases líquida y gas. Su densidad, y por tanto su capacidad de solvatación, se aproxima más a la de un líquido, mientras que sus propiedades de transferencia de materia (viscosidad y difusividad) son más cercanas a las de un gas. Los coeficientes de difusión binarios para mezclas de solutos de baja volatilidad y  $\text{CO}_{2sc}$  son del orden de  $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  [4].

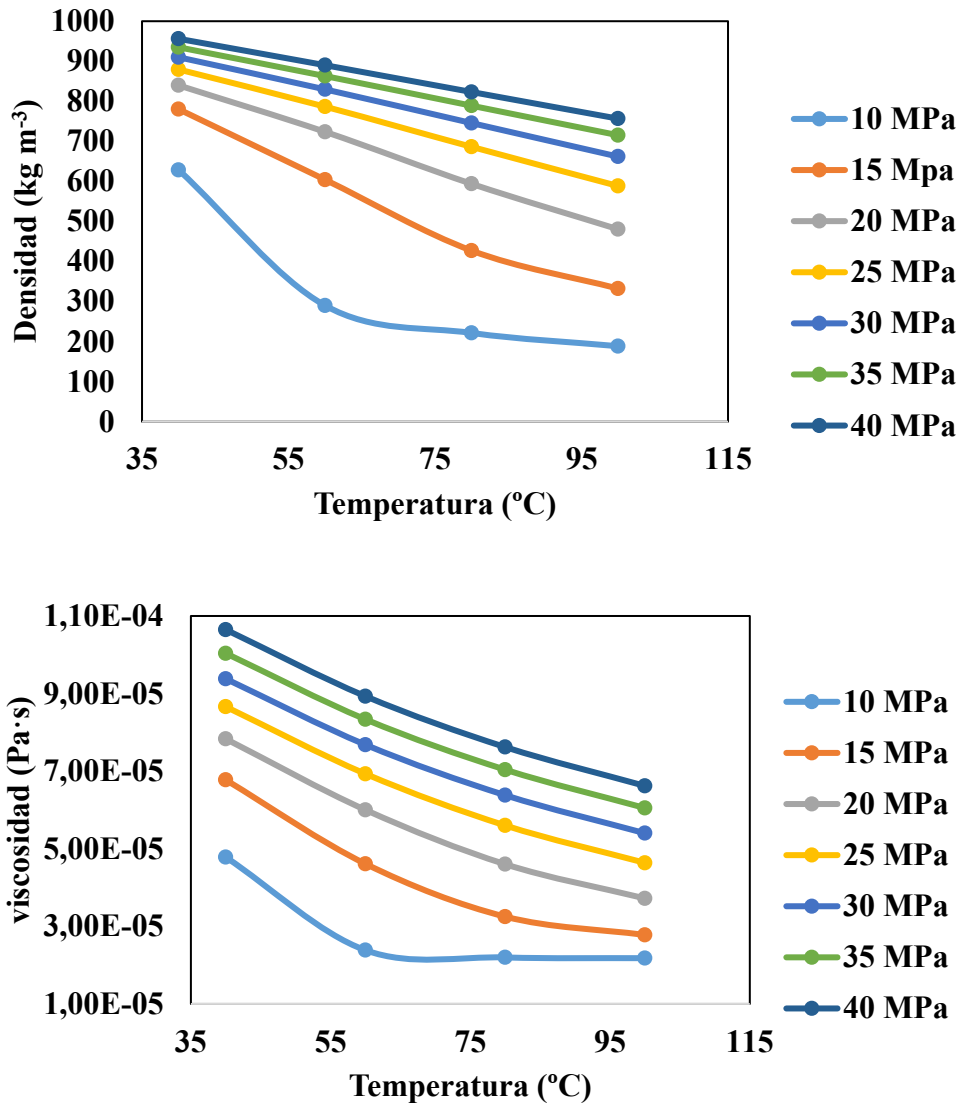


Figura 3.1 Densidad y viscosidad del CO<sub>2</sub> a distintas presiones y temperaturas [3]

La tensión superficial en el dióxido de carbono es mucho menor que la de los disolventes orgánicos convencionales y, junto a sus mejores propiedades de transporte, favorece el mojado y penetración en geometrías complejas mejor que los líquidos. Además, el CO<sub>2</sub> difunde más rápidamente dentro de los poros de los sólidos que los líquidos convencionales [1].

**Tabla 3.1.** Propiedades físicas del CO<sub>2</sub> en sus distintas fases.

Propiedad física	Estado		
	Gas	Supercrítico	Líquido
Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	100-600	600-900	800-1000
Viscosidad (mPa s)	0,01-0,04	0,02-0,1	0,1-0,2
Coefficiente de difusión (10 <sup>6</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	10-40	0,01-0,03	0,0002-0,002

Sin embargo, la constante dieléctrica del CO<sub>2</sub> es muy baja, incluso a altas presiones es menor de 1 [5], por lo que químicamente sería un disolvente considerado apolar. Medina et al. estimaron que incluso a altas presiones la delta de Hildebrand sería del orden de 8, entre la del pentano y la del tolueno. Aunque alerta el Prof. Beckman que el parámetro de solubilidad  $\delta$  de Hildebrand está sobredimensionado entre un 20 y 100 % lo que ha llevado a un exceso en su reclamo como disolvente alternativo a los disolventes orgánicos [1]. Por ello, actualmente la capacidad disolvente del CO<sub>2</sub>sc se mide más adecuadamente con los parámetros de solubilidad de Hansen que tienen en cuenta las contribuciones de energía de dispersión, polar y de puentes de hidrógeno. De tal forma que para predecir la solubilidad de un compuesto, se deben comparar con las contribuciones del soluto en concreto [6].

Como el CO<sub>2</sub> se convierte en gas en condiciones atmosféricas, no deja residuos en las materias primas tratadas con este disolvente ni en los productos.

Además, se puede utilizar el rechazo de otras industrias (térmica), permite operar en circuito cerrado y se pueden procesar sustancias termolábiles, ya que la temperatura crítica es baja.

Por todas estas ventajas, el CO<sub>2</sub>sc se ha utilizado ampliamente en procesos de extracción como se discute a continuación, por ser esta operación la que mayor grado de comercialización ha alcanzado y por ser el objetivo de esta tesis.

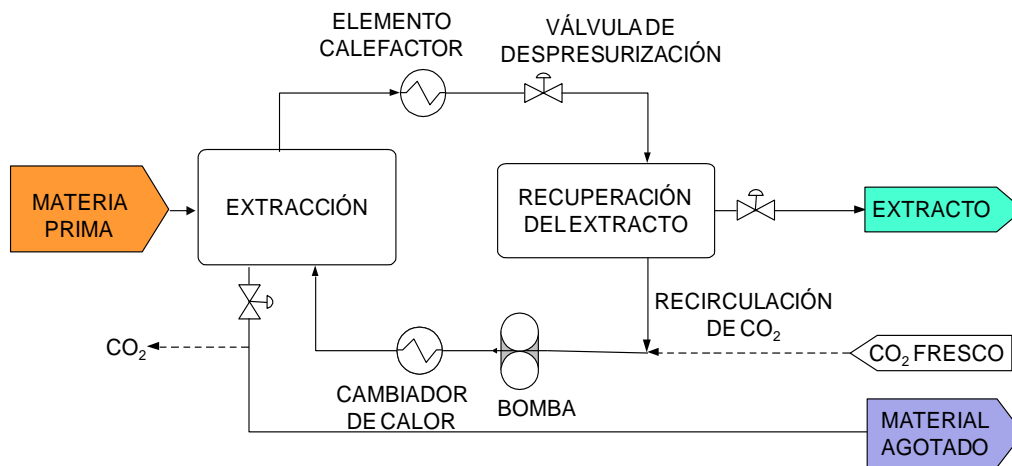
### **3.2. Extracción supercrítica**

Todos los procesos de extracción supercrítica (ESC) de sólidos consisten en dos etapas como se muestra en la Figura 3.2: la extracción y la separación del extracto del disolvente. En la extracción, el CO<sub>2</sub> supercrítico fluye a través del sólido y disuelve los componentes extraíbles. El disolvente cargado con el extracto se evacúa del extractor y se alimenta al separador, donde se reduce la presión de manera que el soluto no es soluble y precipita. Alternativamente, el soluto se puede separar del disolvente supercrítico por adsorción, absorción o con una membrana [4]. En este caso, el circuito de disolvente puede ser operado a presión casi constante.

Generalmente, se requiere una etapa de pretratamiento del material sólido. Es frecuente la adición de agua para facilitar la extracción. Esta cantidad oscila entre 10 y 40 %. Otras veces es importante ajustar el pH. Si el soluto extraído es

el producto de interés, la materia prima puede requerir molienda para aumentar el rendimiento y la velocidad de la extracción.

En cuanto a las condiciones de operación, la capacidad disolvente del CO<sub>2</sub> supercrítico depende en gran medida de la presión y la temperatura, variables que pueden ser modificadas independientemente, como se ha indicado anteriormente. En términos generales, los procesos de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico se ejecutan a temperaturas de 35-40 °C, excepto en procesos donde el soluto está fuertemente adsorbido. En esos casos, se requieren temperaturas más altas para ayudar a la desorción (hasta 70-80°C). La presión oscila entre 10,0 y 50,0 MPa, dependiendo del tipo de extracto [7,8].



**Figura 3.2.** Esquema de un proceso de extracción supercrítica con recirculación del CO<sub>2</sub>.

Después de la extracción, se puede eliminar el CO<sub>2</sub> en forma gaseosa sin dejar restos ni en la matriz ni en el extracto; el aroma y el sabor de los extractos

obtenidos es más natural; la degradación del producto se minimiza y las extracciones son más rápidas y eficaces dado que la selectividad es muy elevada. De ahí, que el proceso de purificación del extracto es muy simple o incluso no necesario, versus las extracciones convencionales con disolventes orgánicos que requieren largos y costosos procesos de concentración y purificación. El disolvente se recupera y recircula fácilmente. Por ello, la extracción supercrítica se puede considerar un proceso sostenible e intensivo [4,9,10].

La extracción mediante fluidos supercríticos está especialmente indicada para aquellos casos en que el soluto sea de alto punto de ebullición o se trate de una sustancia termolábil, porque se sustituye un proceso térmico por otro químico que puede operar a bajas temperaturas.

La extracción de solutos a partir de sustratos sólidos por medio de fluidos supercríticos se ha llevado a cabo a escala comercial durante varias décadas, aplicada fundamentalmente a la industria de alimentos, en productos tales como el descafeinado de granos de café y hojas de té, la extracción de aceites esenciales y aromas de plantas o la extracción de sabores amargos de lúpulo.

A continuación, se indica de mayor a menor facilidad de extracción que compuestos es el CO<sub>2</sub> supercrítico:

Aceites esenciales > terpenos > ésteres > ácidos grasos libres > aceites > ceras > resinas > pigmentos.

Las proteínas, almidones, azúcares y sales minerales no son solubles en ninguna condición de operación.

Para la extracción de estos compuestos para los que el CO<sub>2</sub> tiene baja afinidad se puede utilizar un codisolvente. Los efectos de los codisolventes se deben a interacciones químicas específicas (vínculos de hidrógeno e interacciones ácido-base) o físicas (dipolo dipolo-dipolo o dipolo inducido) entre el codisolvente y el soluto. Estos efectos aceleran y facilitan la extracción [11]. Los codisolventes más empleados en extracción supercrítica han sido los alcoholes de cadena corta, etanol y metanol y más recientemente, el acetato de etilo dada su aceptabilidad en el procesado de alimentos (Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009).

Dados los altos costes de inmovilizado, la extracción supercrítica es un proceso adecuado para altas producciones y/o precio de venta unitario de producto “relativamente elevada”. Las primeras aplicaciones fueron del primer tipo, hoy prácticamente todos los esfuerzos de desarrollo comercial van encaminados a productos de alto valor añadido, como se muestra a continuación.

### **3.3. Aplicaciones industriales y nuevas aplicaciones en extracción supercrítica**

Las aplicaciones industriales de la extracción supercrítica pueden dividirse en dos categorías en función de cuál sea el producto de interés. Por un lado, existen

tecnologías de limpieza o eliminación de algún contaminante cuando el objetivo sea el sólido a tratar. En cambio, existen otras aplicaciones en la que interesa obtener de una matriz sólida un producto de alto valor añadido. Desde el punto de vista conceptual ambas aplicaciones son extracciones supercríticas, pero ofrecen algunas diferencias, en función de si se trata de preservar la integridad del sólido o de la recuperación del extracto. En el primer caso, el sólido no podría molerse para aumentar la tasa de extracción. En el segundo caso, el tamaño de partícula de la matriz sólida podría optimizarse para maximizar la recuperación del soluto comercializable. En algunas materias primas, para aumentar la porosidad del lecho, se peletiza el sólido [12].

A continuación, se revisan las principales aplicaciones de la extracción supercrítica que han sido comercializadas, haciendo énfasis en las que hoy operan en España. Además, se presentan las aplicaciones que más interés despiertan actualmente desde el punto de vista de desarrollo comercial, para lo cual se ha revisado las ofertas tecnológicas de las principales ingenierías desarrolladoras de la tecnología que se muestran resumidas en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Empresas fabricantes de soluciones de extracción supercrítica, su ubicación y su página web.

<b>Empresa</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Página web</b>
NateCO <sub>2</sub>	Alemania	<a href="https://www.nateco2.de/en/">https://www.nateco2.de/en/</a>
Feyecon	Países Bajos	<a href="http://www.feyecon.com">www.feyecon.com</a>
Natex	Austria	<a href="https://www.natex.at">https://www.natex.at</a>
Chematur	Suecia	<a href="https://chematur.se/">https://chematur.se/</a>

### 3.3.1. Aplicaciones de eliminación de contaminantes o limpieza

#### ○ **Eliminación de cafeína**

La primera aplicación industrial de la extracción supercrítica fue la descafeinización del café. A finales de los años 70 del siglo pasado se instalaron plantas de tratamiento de granos de café con el fin de eliminar la cafeína de los mismos. Actualmente, más de 100.000 t de café descafeinado se obtienen anualmente por esta vía, tanto en Europa como en EEUU [13].

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide del grupo de la xantina ampliamente conocido en todo el mundo debido a su presencia en bebidas y alimentos de consumo extensivo. Las fuentes naturales de cafeína incluyen diferentes variedades de granos de café, hojas de té, semillas de guaraná, hojas de yerba mate, semillas de nueces kola y granos de cacao [14]. Numerosos estudios han reportado los efectos del consumo de cafeína en humanos, como el conocido efecto estimulante de las bajas dosis de cafeína en el sistema nervioso, que aumenta la capacidad de concentración y contrarresta el cansancio. Sin embargo, existen efectos negativos, como el insomnio, nerviosismo, irritabilidad, ansiedad o el aumento de la diuresis, que han llevado a un aumento del consumo de café descafeinado, generando el desarrollo de diversos procesos que eliminan este alcaloide de los granos de café. Entre estos procesos, se utilizan comúnmente disolventes orgánicos de alta toxicidad (cloruro de metileno), el proceso *Swiss Water* (que produce un café menos aromático que otros métodos) y el empleo de dióxido de carbono en condiciones supercríticas [15]. Este último fue desarrollado con éxito a escala industrial en la década de 1970, basado en la patente de Kurt

Zosel [16], inicialmente administrado por Café HAG y General Foods [15]. En comparación con otros métodos convencionales, este proceso ha dado mejores resultados, tanto en cuanto a la generación de un producto de mayor calidad como por ser un mejor proceso desde el punto de vista ambiental. Las ventajas del CO<sub>2</sub> como disolvente supercrítico han impulsado la investigación posterior de la extracción supercrítica de cafeína de otras fuentes naturales, como las hojas de té [17], tallos y residuos de fibra del procesamiento industrial del té [11,18], semillas de guaraná [7,19], hojas de yerba mate [19], granos de cacao [8,19], aceite de café [20] y en cáscaras de café, dada la enorme cantidad de estos residuos que se producen en la industria cafetera [21]. Entre todas las fuentes naturales anteriormente citadas, el café podría ser el más importante a nivel mundial desde el punto de vista económico. La FAO estimó su producción mundial en 2014 en casi 9 millones de toneladas [22].

- **Eliminación de pesticidas de arroz**

Además de la eliminación de la cafeína, las primeras aplicaciones industriales de la extracción supercrítica se vieron en el campo de la eliminación de pesticidas como imidacloprido, metiocarbo, clorpirifós, clorotalonil, endosulfán [23]. La ingeniería austriaca especializada en procesos de extracción supercrítica, NATEX, posee una patente basada en esta tecnología para la eliminación de pesticidas en arroz explotada en Taiwan desde 1997, bajo la propiedad de Five King Cereals. Esta planta puede tratar 24.000 toneladas anualmente en 3

extractores de 6 m<sup>3</sup>, operando a presiones superiores a 30 MPa. Mediante esta aplicación, la fábrica es capaz de utilizar una tecnología limpia que favorece que los aromas se mantengan en el arroz, mientras que minimiza o elimina los tratamientos posteriores de lavado. Además, alarga la vida útil del producto final y elimina la presencia de insectos y huevos que pueda llevar adheridos la materia prima [24].

#### ○ **Desengrasado**

La implantación de esta tecnología a nivel industrial es muy limitada y se reduce a un contado número de aplicaciones, casi todas ellas basadas en la eliminación de partículas sólidas y grasas adheridas a las superficies de distintas partículas, lo que se conoce con el nombre de desengrasado.

Zorn y Grimme mostraron la posibilidad de limpiar oquedades de piezas metálicas manchadas con aceites, grasas y partículas inyectando el fluido con una lanza en los huecos modificando repetidamente la presión de operación porque así aumentaba la eficiencia [25]. Bohnert et al. limpiaron contenedores de resina sintética que tenían adheridos restos de disolventes orgánicos mediante CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas usando agitación en cada uno de los tanques [26]. Smith et al. limpiaron depósitos de plástico manchados con aceites minerales introduciendo el CO<sub>2</sub> en condiciones sub y supercríticas [27] y Fu, partículas metálicas no porosas dispuestas en un lecho fijo [28]. A su vez, Della Porta et al. desengrasaron engranajes de máquinas de impresión, para ello combinaron el CO<sub>2</sub>

con un aditivo (N-metil pirrolidona) operando a temperaturas de 40 °C y presiones por encima de 15,0 MPa [29].

Chematur dispone en sus instalaciones en Suecia de una planta piloto con capacidad a partir de los 50 kg h<sup>-1</sup> y puede diseñar instalaciones de hasta 10 t h<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, diseñadas para operar hasta 50,0 MPa. Entre estas instalaciones destaca el equipo Rotowasher, adaptado a desengrasar partículas metálicas mediante una cesta rotatoria, que permite optimizar la transferencia de materia [30].

#### ○ **Limpieza en seco de textiles**

En limpieza en seco de fibras naturales se está empleando también tecnología supercrítica. La limpieza convencional emplea disolventes orgánicos como el percloroetileno y detergentes, supone un elevado gasto energético por la rotación del tambor y el proceso de secado. Este proceso tradicional lleva asociado problemas tanto de salud como medioambientales por el uso de disolventes orgánicos; en cambio usando CO<sub>2</sub> presurizado se pueden alcanzar los mismos resultados sin uso de productos químicos, agua o elevado gasto energético. De las propuestas comerciales que existen en el mercado, significativamente la de Tersus Solutios es la más desarrollada [31]. Sus lavadoras disponen de una cesta rotatoria en la que se introducen las prendas como la que se muestra en la Figura 3.3. Las condiciones de operación habituales de estos equipos son presiones en torno a 5-7 MPa y temperaturas próximas a la ambiente (18-22 °C) para impedir la

solidificación de las grasas, en estas condiciones el CO<sub>2</sub> se comporta como un líquido presurizado [32].



**Figura 3.3.** Lavadora para limpieza en seco de textiles con CO<sub>2</sub> líquido fabricada por Tersus Solutions [31].

#### ○ **Descontaminación de suelos**

La descontaminación de suelos mediante extracción con CO<sub>2</sub>sc es una técnica que se ha investigado por varios autores [33–35] sin llegarse de momento a ningún desarrollo comercial. Por ejemplo, se ha probado la eliminación de pesticidas del suelo usando metanol como codisolvente del CO<sub>2</sub> a presiones de entre 10 y 20 MPa y temperaturas entre 35 y 45 °C [35] y la eliminación de compuestos orgánicos volátiles, en condiciones de humedad por encima del 20 % que requiere temperaturas superiores a los 80 °C y presiones en torno a los 30 MPa [34].

- **Otras aplicaciones de limpieza**

Entre los procesos de limpieza se pueden destacar los relativos a la eliminación de los compuestos de degradación del papel para alargar la vida útil del mismo [36], los que eliminan impurezas de huesos o implantes artificiales que usan CO<sub>2</sub> además para esterilizar [37].

- **Desengrasado de cacao**

En su forma original, el grano de cacao contiene aproximadamente un 50-60 % de manteca de cacao. Cuando el grano triturado se trata mecánicamente, se forma una torta prensada con un 10-12 % de grasa. Normalmente se utiliza un disolvente orgánico para eliminar la manteca de cacao restante, pero es posible usar CO<sub>2</sub>sc para desengrasar la torta. En el trabajo de Calvo et al. [38], se demuestra que se puede extraer manteca de cacao y a la vez esterilizar la materia prima cuando se opera a temperaturas superiores a 65 °C y presiones por encima de los 30 MPa. Así, el cacao en polvo, con un contenido de materia grasa inferior al 1 %, y la manteca de cacao, exentos de residuos nocivos de disolventes, pueden utilizarse para productos dietéticos o cosméticos sin ningún otro tratamiento posterior [39].

- **Eliminación de contaminantes del corcho**

Durante siglos se han usado tapones de corcho para sellar botellas de vino. Actualmente la industria demanda 20.000 millones de tapones anuales [40]. El corcho es una espuma de un polímero natural basado en la suberina que se obtiene de la parte exterior de la corteza de los alcornoques (*Quercus suber L.*), su composición media es suberina (45 %), lignina (27 %), polisacáridos (12 %), taninos (5 %) y ceroides (12 %). Si bien pueden existir innumerables metabolitos secundarios producidos por hongos o bacterias.

La industria corchera tiene una importancia capital en países como Portugal o España, los mayores productores mundiales, si bien Córcega, Cerdeña o Turquía lo producen también [41]. Además del citado destino de este material como tapón para botellas de vino y espumosos, se usa como aislante, en embalajes o en construcción.

La contaminación del vino por aromas derivados de su tapón de corcho supone un enorme problema para la industria del vino, valorándose su impacto mundial en más de 10.000 millones de dólares [42]. Este aroma perjudicial se debe principalmente a la presencia en el corcho del compuesto 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Aunque puede haber otros compuestos responsables de la degradación de las cualidades organolépticas del vino, es el TCA el principal implicado entre el 60 y el 100 % de los análisis llevados a cabo por Fuller [42]. Este autor estima que entre el 2 y el 5 % de las botellas de vino están contaminados por TCA.

La razón más importante por la que este compuesto arruina el disfrute de una copa de vino es el bajísimo umbral de detección analítica, que está situado por debajo de  $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ . Este hecho hace que cualquier procedimiento encaminado a la eliminación de dicha contaminación tenga que ser enormemente exigente y los sistemas de análisis muy precisos.

La molécula de TCA se genera en el seno de la corteza de los alcornoques (*Quercus suber L.*) por la acción de una serie de microorganismos, principalmente hongos filamentosos, que transforman por metilación el clorofenol en un anisol [43]. Para prevenir la contaminación, los fabricantes de tapones monitorizan el nivel de TCA en los mismos así como en el agua donde hierven el material para analizarlo posteriormente [44], pero no existen técnicas implantadas industrialmente para eliminar estas moléculas una vez detectadas en el corcho, por lo que en la mayoría de los casos estas partidas tienen que ser desechadas.

La utilización de  $\text{CO}_2\text{sc}$  para la eliminación de TCA ya se aplica a escala industrial. La primera instalación a gran escala implantada a nivel mundial se instaló en 2005 en San Pedro de Alcántara (España) por la sociedad francesa OENEO para tratar su producción [42, 43] utilizando la patente del centro de energía atómica francés, CEA (FR2798879 "Procedimiento de tratamiento y de extracción de compuestos orgánicos de corcho mediante un fluido denso a presión"). Esta planta cuenta con 3 líneas, con un extractor de  $8 \text{ m}^3$  cada una de ellas y trata al año 2500 t de corcho, lo que da idea de la dimensión de la misma [47].

Además, existen otras patentes de dicho proceso:

- ES2416554 "Procedimiento para extraer del corcho compuestos indeseables diversos". Esta patente ha sido presentada por la Asociación de investigación de la industria agroalimentaria (AINIA) y la emplea en sus instalaciones para tratar gránulo de corcho [48].
- EP2404647 "Método para la extracción de compuestos orgánicos a partir de corcho granulado". Esta patente fue presentada por la sociedad Gestión Integral de la Tecnología y actualmente no está implementada en ninguna instalación industrial [49].
- WO2010PT00004 "Método para tratamiento directo de tapones de corcho mediante fluidos supercríticos" presentada por Manuel Nunes da Ponte et al. Este método es el único del mercado que trata corchos compactos en lugar de gránulos de corcho para eliminar la contaminación superficial [50].

En el Anexo II se muestra la investigación realizada para esta tesis de este proceso y en la discusión integradora los principales resultados y las conclusiones más importantes.

### **3.3.2. Aplicaciones de extracción de compuestos de alto valor añadido**

Existe una notable cantidad de compuestos químicos que pueden ser extraídos mediante tecnología supercrítica dado su alto valor añadido, que permite usar técnicas más caras para su obtención. Entre estas aplicaciones podemos citar

la extracción de antioxidantes (carotenoides, polifenoles, tocoferoles), esteroides, aromas, colorantes, etc.

Los antioxidantes son moléculas que pueden prevenir o retardar las reacciones de oxidación. Estas reacciones pueden generar radicales libres y dañar las estructuras celulares. Por todo ello, estos compuestos tienen elevado interés industrial para su incorporación a distintas aplicaciones nutraceuticas. Cabe destacar como importante familia de antioxidantes a los carotenoides que son sintetizados por organismos fotosintéticos, algunas bacterias y hongos no fotosintéticos [51]. Estos compuestos son utilizados en productos cosméticos debido a sus propiedades fotoprotectoras contra la radiación UV. Existen más de 600 carotenoides conocidos que pueden clasificarse en dos grupos: xantofilas, que contienen oxígeno como grupo funcional, incluyendo astaxantina, luteína y zeaxantina, y carotenos, que contienen solo una cadena de hidrocarburos sin ningún grupo funcional. Además de la actividad antioxidante y fotoprotectora, se está estudiando la aplicación de astaxantinas en la coloración de yemas de huevo y peces ornamentales [51]. Algunos investigadores han propuesto extraer dichos carotenoides de distintas materias primas como residuos de tomate [52,53] o microalgas [51].

Por su parte, los compuestos fenólicos tienen una ventaja importante en comparación con otros antioxidantes, ya que son sintetizados por las plantas y están ampliamente difundidos en los alimentos a base de vegetales, por lo que son ampliamente consumidos en la dieta humana. De este modo, su consumo juega un papel importante en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés

oxidativo, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y cognitivas [54]. Los polifenoles vegetales son una familia de cientos de antioxidantes compuestos por diferentes subclases (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y otros) [54]. Estos compuestos fenólicos pueden obtenerse a partir de cáscaras de cacao, ajos, plantas aromáticas como el orégano o el romero así como de semillas de sésamo entre otras materias primas [10]

Los tocoferoles son una familia de cuatro moléculas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  tocoferol) sintetizados y almacenados en hojas y semillas de plantas. Su diferencia química consiste en el número y la posición de los grupos metilos del anillo de cromanol. Estas moléculas no pueden ser sintetizadas por los animales y deben aportarse en la dieta. Su función principal es la de antioxidantes. El  $\alpha$ -tocoferol es la vitamina E, cuya insuficiente disponibilidad puede causar enfermedades. En el caso de humanos, la avitaminosis se suple administrando el citado tocoferol [55]. Estas moléculas se pueden obtener de distintos aceites vegetales como el de palma o el de oliva, así como de los distintos subproductos de estas industrias como hojas o bagazos [10].

Fuera del ámbito de los antioxidantes, merece la pena destacar el caso de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs en inglés). Las grasas poliinsaturadas son lípidos en los que la cadena de hidrocarburos constituyentes posee dos o más enlaces dobles de carbono-carbono, estas moléculas se encuentran principalmente en nueces, semillas, pescado, aceites de semillas y ostras [56].

A continuación, se describen algunas de las aplicaciones de extracción supercrítica para obtener estos compuestos que más desarrollo han alcanzado, según las ingenierías mencionadas.

- **Galantamina**

La galantamina es un alcaloide nootrópico que sirve como inhibidor reversible de la acetil colinesterasa (ACE) y se puede utilizar para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer leve a moderada. La empresa holandesa Feyecon ha probado la extracción de galantamina-HBr a partir de los bulbos de narciso, que son un recurso natural y barato [57].

- **Antioxidantes**

La *astaxantina* es un antioxidante natural que protege la piel y el envejecimiento de los tejidos. Este carotenoide de color amarillento puede encontrarse en algunas microalgas [58], levaduras o en algunos animales como crustáceos o salmón [59].

Valderrama et al. obtuvieron la astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* mediante extracción con CO<sub>2</sub> a 30,0 MPa y 60 °C, indicando que la presencia de codisolventes apenas mejoraba el bajo rendimiento de extracción [58]. Además, existen aplicaciones industriales destinadas a la obtención de este carotenoide para su uso en la industria cosmética [57].

La *quercetina* es un flavonoide conocido por su poderoso antioxidante. Se obtiene de algunas frutas, hojas o granos, siendo especialmente abundante en la cebolla. Se conoce su poder de prevención del daño oxidativo sobre la piel. FeyeCon ha desarrollado un proceso que permite aumentar la concentración de quercetina hasta 20 veces. Para ello usa un aparato que presuriza emulsiones mejorando la solubilidad de los compuestos activos [57].

Muchos carotenoides son extremadamente sensibles a la oxidación. Se pueden obtener beta carotenos a partir de *Dunaliella salina*, un alga de agua salada importante de la cocina en las culturas asiáticas. Como produce grandes cantidades de betacaroteno durante el crecimiento, se utiliza en complementos alimenticios. La concentración de esta sustancia activa con CO<sub>2</sub> es posible si se trabaja en equipos a alta presión, si bien algunos investigadores han conseguido extraerlo a presiones más bajas como 25 MPa [60] o 40 MPa [61]. Actualmente existen instalaciones industriales que obtienen carotenoides a partir de pimentón o caléndulas [39].

El *xantohumol* es un polifenol presente en el lúpulo que posee propiedades anticancerígenas. Con una tecnología especial protegida por patente, NATECO<sub>2</sub> ha sido capaz de concentrar este ingrediente para aplicaciones farmacéuticas o nutracéuticas [39].

- **Extracción de lúpulo**

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta trepadora con una importante composición en aceites esenciales y resinas amargas. Su principal uso industrial reside en aportar sabores amargos a la cerveza, además de mantener la estabilidad de la espuma. Para obtener directamente estos aromas son muchas las industrias que han implantado instalaciones destinadas a tal fin. Por ejemplo SKW/Trostberg en Munchsmester, Barth & Co. y Natural Cane en Wolnzach, Pfizer Sydney NB, Yakima VA en EEUU y Australia, utilizan CO<sub>2</sub> [13]. Las condiciones de operación para la extracción de lúpulo a 35 MPa, separando el extracto por despresurización a 4,5 MPa. La diferencia entre operar en condiciones subcríticas (0,6 MPa, 8 °C) y condiciones supercríticas (35,0 MPa y 60 °C) es notable, la solubilidad varía entre 0,8 y 3,2 % en peso, respectivamente [9].

- **Extractos de cannabis**

Los extractos procedentes de cannabis o de cáñamo (*Cannabis sativa L.*) tienen usos recreativos y medicinales. En los últimos años, estas aplicaciones han dejado de estar prohibidas en numerosos países por lo que se ha generado una fuerte demanda económica y social a las mismas. El cannabidiol (CBD) es generado por la planta para protegerse de las influencias externas dañinas. Las propiedades antiinflamatorias de este componente no psicoactivo son muy adecuadas para los cosméticos, porque calma la piel y tiene beneficios anti-edad. Para obtener estos extractos se empezaron a emplear disolventes orgánicos, pero

dado el enorme valor de los mismos (10-20 \$ g<sup>-1</sup> de cannabinoides y 40 \$ g<sup>-1</sup> de terpenos [62]) se está apostando por el uso de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico como medio para obtener dichos compuestos [63]. Además, el uso de CO<sub>2</sub>sc permite, no solo la extracción pura de los compuestos de interés con el fin de destinarlos al consumo humano por vía oral, nasal o tópica, sino también la descarboxilación al mismo tiempo del ácido cannabidólico (CBDA) y tetrahidrocannabidólico (THCA) para convertirlos en los compuestos de interés. En este sentido, las investigaciones a escala laboratorio y piloto del profesor King apuestan por extracciones entre 10 y 70 MPa y temperaturas entre 40 y 100 °C, encontrándose un máximo en la solubilidad del CBD a 24,1 MPa [61]. Por su parte, las investigaciones de Aladic et al., sugieren como óptima la extracción a 40,0 MPa y 40 °C [64] y Rovetto y Aieta demuestran que se maximiza la extracción a 34 MPa y 55 °C [65].

A nivel industrial destacan la patente de Rui [66] en la que se extrae aceite de cannabis mediante CO<sub>2</sub>sc a 25 MPa y entre 35 y 40 °C con una separación posterior a 12 MPa y la patente de Muller [67], en la que se afirma que las condiciones óptimas de extracción de tetrahidrocannabinol (THC) son 25 MPa y 60 °C. También FeyeCon ha desarrollado una técnica de extracción de CBD que permite extraerlo con un 100 % de pureza para usarlo directamente en la industria cosmética [68].

- **Extractos de omega 3**

Los ácidos grasos omega 3 son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que pueden tener efectos beneficiosos tanto cardiovasculares como cognitivos al incluirlos en la dieta humana. Este interés nutracéutico ha llevado a numerosos investigadores y empresas a desarrollar métodos para su obtención a partir de fuentes naturales. Además, este tipo de compuestos se deterioran en presencia de oxígeno o altas temperaturas por lo que la extracción supercrítica se considera adecuada para alcanzar el objetivo dejando de lado las complicaciones citadas. Se puede producir a partir de semillas de chía a 40,8 MPa y 80 °C [56] o de *Ficus pumila*, operando a 37,0 MPa y 62 °C [69]. A nivel industrial destaca en el ámbito internacional la apuesta de la empresa española Solutex como productor de ácidos omega 3 altamente purificados a partir de aceite de pescado mediante extracción supercrítica [70].

- **Fitoesteroles**

NATECO<sub>2</sub> ha conseguido extraer industrialmente aceite de las bayas de palma, interesantes por su alto contenido en fitoesteroles, capaces de reducir el riesgo de hiperplasia benigna de próstata. Al usar CO<sub>2</sub> el componente activo se encuentra en alta composición en el aceite y puede usarse como aditivo en la industria nutracéutica [39].

- **Aceites esenciales**

Los procesos convencionales de extracción por arrastre de vapor y extracción con disolventes no pueden realizarse en un único proceso. Por el contrario, la extracción realizada a presiones entre 10 y 12 MPa con temperaturas cercanas al punto crítico del CO<sub>2</sub> permite obtener aceites esenciales equivalentes a los obtenidos por arrastre de vapor. Se emplean instalaciones de tamaño medio que tienen dos o tres extractores con volúmenes entre 0,2 y 0,8 m<sup>3</sup> y operan a presiones entre 30 y 50 MPa. Se diseñan para trabajar con distintos tipos de plantas, con el fin de que operen durante el mayor tiempo posible y cubrir la estacionalidad en la recolección. Por su parte, suelen estar equipadas con varios separadores, permitiendo obtener distintos extractos a partir de una misma materia prima [13].

La extracción de resinas, colorantes, ácidos grasos y ceras se puede llevar a cabo en un único paso, por lo que se minimizan los costes del proceso [13].

Natex ha desarrollado tecnología capaz de extraer la mayor parte de los aceites esenciales presentes en la matriz sólida (mientras que la compresión en frío puede dejar entre un 20 y un 40 % de los aceites en la torta, la extracción supercrítica rebaja estas cifras hasta el 0,5 % en un solo paso y sin pérdida de aromas). Entre los aceites esenciales que se están extrayendo actualmente se pueden citar los de nueces, almendras, nueces de macadamia, aguacate, o sésamo, además los aceites que se obtienen de cereales, con altas concentraciones en tocoferoles. Otros de los aceites extraíbles mediante tecnología supercrítica son los de las semillas de melocotones y cerezas, destinados a las industrias cosmética y

alimentaria. La extracción supercrítica de aceites de madera también resulta interesante ya que estos compuestos tienen altos puntos de ebullición y su destilación con vapor puede dañar las moléculas, sin embargo utilizando CO<sub>2</sub> se puede evitar la degradación térmica y la hidrólisis [71].

En España, la empresa Súper Extractos, S.L. situada en Cabezo de Torres, Murcia, (<http://www.superextract.es/>) está comercializando oleorresina de pimentón extraída a 50,0-55,0 MPa y extracto de *Boletus Edulis*.

### 3.4. Referencias bibliográficas

- [1] E. J. Beckman, Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing, *J. Supercrit. Fluids*. 28 (2004) 121–191. doi:10.1016/S0896-8446(03)00029-9.
- [2] J. M. H. Levelt Senges, Supercritical Fluids: Their properties and applications, en: E. Kiran, P.G. Debenedetti, C.J. Peters (Ed.), *Supercritical Fluids - Fundamentals for Application*, Klumar Academic Publisher, Kemer, 2000: pp. 1–31.
- [3] NIST, Propiedades de fluidos, <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/> (accedido en noviembre 2017).
- [4] G. Brunner, *Gas Extraction*, Springer, New York, 1994.
- [5] J. L. Medina, I. Suárez, J.J., Martínez J.L., Bueno, Fluidos supercríticos: propiedades, *Afinidad L*. 443 (1993) 40–46.
- [6] D. F. Tirado, M. J. Tenorio, A. Cabañas, L. Calvo, Prediction of the best cosolvents to solubilise fatty acids in supercritical CO<sub>2</sub> using the Hansen solubility theory. *Chem Eng Sci*. 190 (2018) 14-20.
- [7] C. B. Mehr, R. N. Biswal, J. L. Collins, H D. Cochran, Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from guaraná, *J. Supercrit. Fluids*. 9 (1996) 185–191. doi:10.1016/S0896-8446(96)90031-5.
- [8] R. S. Mohamed, M. D. A. Saldaña, P. Mazzafera, C. Zetzl, G. Brunner, Extraction of caffeine, theobromine, and cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO<sub>2</sub> and ethane, *Ind. Eng. Chem. Res*. 41 (2002) 6751–6758. doi:10.1021/ie0203936.
- [9] E. Lack, B. Simándi, Supercritical Fluid Extraction and Fractionation from Solid Materials, in: A. Bertucco, G. Vetter (Ed.), *High Press. Process Technol. Fundam. Appl.*, Elsevier, 2001: pp. 537–575. doi:10.1016/S0926-9614(01)80032-0.

- [10] M. A. Meireles, *Extracting bioactive compounds for food products*, CRC Press, Boca Raton, 2009.
- [11] H. İçen, M. Gürü, Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes, *J. Supercrit. Fluids.* 55 (2010) 156–160. doi:10.1016/j.supflu.2010.07.009.
- [12] A. Bertucco, G. Vetter, *High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2001.
- [13] M. J. Cocero, *Procesos comerciales de extracción con fluidos supercríticos*, Ing. Química. 441 (2006) 144–157.
- [14] P. Nawrot, S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz, M. Feeley, Effects of caffeine on human health, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 1–30. doi:10.1080/0265203021000007840.
- [15] B. Ramalakshmi, K., Raghavan, Caffeine in coffee: its removal. Why and how?, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39 (1999) 441–456.
- [16] K. Zosel, *Process for recovering caffeine*, U.S. 3.806.619, 1974.
- [17] W. J. Kim, J. D. Kim, J. Kim, S. G. Oh, Y. W. Lee, Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction, *J. Food Eng.* 89 (2008) 303–309. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.05.018.
- [18] H. İçen, M. Gürü, Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids.* 50 (2009) 225–228. doi:10.1016/j.supflu.2009.06.014.
- [19] M. D. A. Saldaña, C. Zetzl, R. S. Mohamed, G. Brunner, extraction of methylxanthines from guaraná seeds, maté leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4820–4826. doi:10.1021/jf020128v.

- [20] Á. B. A. de Azevedo, T. G. Kieckbusch, A. K. Tashima, R. S. Mohamed, P. Mazzafera, S. A. B. V. de Melo, Supercritical CO<sub>2</sub> recovery of caffeine from green coffee oil: new experimental solubility data and modeling, *Quim. Nova.* 31 (2008). 1319-1323. doi:10.1590/S0100-40422008000600009.
- [21] J. Tello, M. Viguera, L. Calvo, Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, 59 (2011) 53-60. doi: 10.1016/j.supflu.2011.07.018
- [22] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accedido en octubre 2017).
- [23] A. Valverde-García, A. R. Fernández-Alba, M. Contreras, A. Agüera, Supercritical fluid extraction of pesticides from vegetables using anhydrous magnesium sulfate for sample preparation, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1780–1784. doi:10.1021/jf9504374.
- [24] Natex, Rice treatment, new application for supercritical extraction, [https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/rice\\_treatment.pdf](https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/rice_treatment.pdf) (accedido en enero 2018).
- [25] C. Zorn, R. Grimme, Method and tool for cleaning cavities, WO2007012364, 2007.
- [26] G. Bohnert, T. Hand, H. de Laurentis, Method for removing contaminants from plastic resin, US20060223981, 2006.
- [27] H. M. Smith, G. Bohnert, R. Olson, T. E Hand, Method to separate and recover oil and plastic from plastic contaminated with oil, US5711820.
- [28] H. Fu, M. A. Matthews, Comparison between supercritical carbon dioxide extraction and aqueous surfactant washing of an oily machining waste, *J. Hazard. Mater.* 67 (1999) 197–213. doi:10.1016/S0304-3894(99)00037-0.

- [29] G. Della Porta, M. C. Volpe, E. Reverchon, Supercritical cleaning of rollers for printing and packaging industry, *J. Supercrit. Fluids*. 37 (2006) 409–416. doi:10.1016/j.supflu.2006.01.018.
- [30] Chematur, (2017). <https://chematur.se/process-areas/supercritical-co2/> (accedido en noviembre 2017).
- [31] Tersus, (2017). <http://www.tersussolutions.com/lco2solution/> (accedido en noviembre 2017).
- [32] G. Stewart, Dry cleaning with liquid carbon dioxide, in: O.U. Press (Ed.), *Green Chem. Using Liq. Supercrit. Carbon Dioxide*, Nueva York, 2003: pp. 215–227.
- [33] M. D. A. Saldaña, V. Nagpal, S. E. Guigard, Remediation of contaminated soils using supercritical fluid extraction: a review (1994-2004), *Environ. Technol.* 26 (2005) 1013–1032. doi:10.1080/09593332608618490.
- [34] M. N. Baig, G. A. Leeke, P. J. Hammond, R. C. D. Santos, Modelling the extraction of soil contaminants with supercritical carbon dioxide, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1802–1809. doi:10.1016/j.envpol.2011.03.037.
- [35] J. R. Forero-Mendieta, H. I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso, J. A. Guerrero-Dallos, Extraction of pesticides from soil using supercritical carbon dioxide added with methanol as co-solvent, *J. Supercrit. Fluids*. 68 (2012) 64–70. doi:10.1016/j.supflu.2012.03.017.
- [36] A. Perre, C., Beciat, A., Carlès, M., Brandt, Neutralization and strengthening of papers with supercritical CO<sub>2</sub>, in: 3rd Int. Symp. Supercritical Fluids, Inst. Nat. Polytechnique de Lorraine, Estrasburgo, 1994: pp. 19–24.
- [37] J. Fages, J., Marty, A., Condoret, Processing of bone substitute with supercritical carbon dioxide, in: 3rd Int. Symp. Supercritical Fluids, Inst. Nat. Polytechnique de Lorraine, Estrasburgo, 1994: pp. 253–259.

- [38] L. Calvo, B. Muguerza, E. Cienfuegos-Jovellanos, Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids*. 42 (2007) 80–87. doi:10.1016/j.supflu.2007.01.009.
- [39] Nateco2, <https://www.nateco2.de/en/extraktion-2.html> (accedido en noviembre 2017).
- [40] H. Lack, E. Seidlitz, Industrial cleaning of cork with supercritical CO<sub>2</sub>, in: 3rd Int. Meet. High Press. Chem. Eng., Erlangen (Germany), 2006.
- [41] V. Castola, B. Marongiu, A. Bighelli, C. Floris, A. Lai, J. Casanova, Extractives of cork (*Quercus suber L.*): Chemical composition of dichloromethane and supercritical CO<sub>2</sub> extracts, *Ind. Crops Prod.* 21 (2005) 65–69. doi:10.1016/j.indcrop.2003.12.007.
- [42] P. Fuller, Cork taint: Closing in on an industry problem, *Wine Ind. J.* 10 (1995) 58–60.
- [43] T. H. Lee, R. F. Simpson, Microbiology and chemistry of cork taints in wine. In G. H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and bio/technology*. G. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. (1993) 353–372.
- [44] A. M. Peres, P. Freitas, L. G. Dias, M. E. B. C. Sousa, L. M. Castro, A. C. A. Veloso, Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process, *Talanta*. 117 (2013) 438–444. doi:10.1016/j.talanta.2013.09.039.
- [45] Commissariat Énergie Atomique, Method for treating cork and extracting organic compounds from cork, with a dense fluid under pressure, FR2798879, 1999.
- [46] DIAM, (2017). <http://www.diam-closures.com/medias/brochure/475-Brochure-Diam-cork-for-still-wine.pdf> (accedido en enero 2017).

- [47] M.J. Cocero, D. Rincón, La extracción de fluidos supercríticos, una nueva tecnología consolidada, *Tecnología del vino: tratamientos y equipos para viticultura y enología*. 23 (2005) 87–92.
- [48] AINIA, Procedimiento para extraer del corcho compuestos indeseados diversos, ES2416554 A1, 2011.
- [49] G. Sanjuán, Method for extraction organic compounds from granulated cork, EP2404647, 2012.
- [50] M. L. Nunes da Ponte, J. A. da Silva, V. Najdanovic-Visak, M. Marina, A. C. de Avelar, R. P. Moreina, I. M. de Queiroz, Method for direct treatment of cork stoppers, using supercritical fluids, WO2010PT00004, 2013.
- [51] R. K. Saini, Y.-S. Keum, Carotenoid extraction methods: A review of recent developments, *Food Chem.* 240 (2018) 90–103. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.099.
- [52] S. Machmudah, Zakaria, S. Winardi, M. Sasaki, M. Goto, N. Kusumoto, K. Hayakawa, Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide, *J. Food Eng.* 108 (2012) 290–296. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.012.
- [53] M. Kehili, M. Kammlott, S. Choura, A. Zammel, C. Zetzl, I. Smirnova, N. Allouche, S. Sayadi, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and antioxidant activity of lycopene and β-carotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicon esculentum L.*) peels by-product of a Tunisian industry, *Food Bioprod. Process.* 102 (2017) 340–349. doi:10.1016/j.fbp.2017.02.002.
- [54] G. Domínguez-Rodríguez, M. L. Marina, M. Plaza, Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants, *J. Chromatogr. A.* 1514 (2017) 1–15. doi:10.1016/j.chroma.2017.07.066.
- [55] A. Azzi, Many tocopherols, one vitamin E, *Mol. Aspects Med.* (2017). doi:10.1016/j.mam.2017.06.004.

- [56] J. A. R. Uribe, J. I. N. Perez, H. C. Kaul, G. R. Rubio, C. G. Alcocer, Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids*. 56 (2011) 174–178. doi:10.1016/j.supflu.2010.12.007.
- [57] Feyecon, Algae products, <http://www.feyecon.com/products> (accedido en noviembre 2017).
- [58] J. O. Valderrama, M. Perrut, W. Majewski, Extraction of astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Data*. 48 (2003) 827–830. doi:10.1021/je020128r.
- [59] Y. M. A. Naguib, Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1150–1154. doi:10.1021/jf991106k.
- [60] A. C. Guedes, M. S. Gião, A. A. Matias, A. V. M. Nunes, M. E. Pintado, C. M. M. Duarte, F. X. Malcata, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing, *J. Food Eng.* 116 (2013) 478–482. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.015.
- [61] M. Macías Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. Lubian, O. Montero, Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*, *Talanta*. 77 (2009) 948–952. doi:10.1016/j.talanta.2008.07.032.
- [62] J. W. King, Capturing markets with critical fluid technology a case study in its application and development in the cannabis industry in North America, in: 16th Eur. Meet. Supercrit. Fluids, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2017.
- [63] J. W. King, G. Smith, C. Jackson, Extracting and processing of medicinal cannabinoids from hemp, in: 16th Eur. Meet. Supercrit. Fluids, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2017: p. 30.

- [64] K. Aladić, K. Jarni, T. Barbir, S. Vidović, J. Vladić, M. Bilić, S. Jokić, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa L.*) seed oil, *Ind. Crops Prod.* 76 (2015) 472–478. doi:10.1016/j.indcrop.2015.07.016.
- [65] L. J. Rovetto, N. V. Aieta, Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa L.*, *J. Supercrit. Fluids.* 129 (2017) 16–27. doi:10.1016/j.supflu.2017.03.014.
- [66] L. Rui, Process of extracting fructus cannabis oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction, CN103289819, 2013.
- [67] A. Muller, Method for producing an extract from cannabis plant matter, containing a tetrahydrocannabinol and a cannabidiol and cannabis extracts, NZ525118, 2004.
- [68] H. Perrotin-Brunel, M.C. Kroon, M.J.E. Van Roosmalen, J. Van Spronsen, C.J. Peters, G.J. Witkamp, Solubility of non-psychoactive cannabinoids in supercritical carbon dioxide and comparison with psychoactive cannabinoids, *J. Supercrit. Fluids.* 55 (2010) 603–608. doi:10.1016/j.supflu.2010.09.011.
- [69] Y. J. Cheng, C. J. Shieh, Y. C. Wang, S. M. Lai, C. M. J. Chang, Supercritical carbon dioxide extraction of omega-3 oil compounds from *Ficus awkeotsang* Makino achenes, *Sep. Purif. Technol.* 98 (2012) 62–68. doi:10.1016/j.seppur.2012.06.030.
- [70] Solutex, <https://www.solutex.es/es/> (accedido en enero de 2017).
- [71] Natex <https://www.natex.at/industries/> (accedido en octubre de 2017).



## **4. OBJETIVOS**



El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar detalladamente de los parámetros operacionales y de la condición del sólido que afectan a la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de distintas matrices sólidas.

Para alcanzar dicho objetivo se seleccionaron varios tipos de aplicaciones de interés comercial. Tal y como se ha expuesto en el capítulo precedente, las extracciones supercríticas pueden estar enfocadas a la eliminación de algún compuesto indeseable de la matriz sólida, siendo esta el objeto de interés, o bien para la extracción de algún compuesto o fracción de alto valor añadido.

Para cada aplicación, se siguieron las siguientes etapas:

- Estudiar la fenomenología de transporte de distintos sistemas sólido-soluto-CO<sub>2</sub>.
- Analizar el impacto que tienen las distintas condiciones de operación en los sistemas elegidos (presión, temperatura, caudal).
- Comprobar el grado de afección que la cantidad de disolvente tiene sobre la extracción.
- Explorar cómo afecta a la extracción la condición del sólido, especialmente su grado de humedad y de fragmentación.

Consecuentemente, los parámetros analizados fueron, por un lado, los operacionales, entre los que destaca la presión, la temperatura, el caudal de disolvente, el tiempo de contacto o el consumo de disolvente; y por otro lado, la condición del sólido, destacando el grado de humedad o el tipo de pretratamiento de las muestras.

A lo largo de la investigación de esta tesis doctoral se exploraron dos sistemas del primer grupo y uno del segundo:

○ **Eliminación**

Extracción de aceite lubricante depositado sobre superficies metálicas (Anexo I).

El objetivo principal era la eliminación total de aceite lubricante adherido a la superficie de contactos metálicos de plata y cobre usados para fabricar microchips, sustituyendo los disolventes orgánicos utilizados hasta la fecha por una tecnología más verde.

En el proceso de conformado en frío de contactos metálicos hay una etapa en la que se impregnan con aceite lubricante. Estos elementos, como piezas de precisión, deben tener sus superficies limpias y pulidas, por lo que la eliminación de aceites es esencial.

En la actualidad, los disolventes a base de benceno se están utilizando para eliminar este aceite, pero el proceso es caro debido al alto coste asociado con la recuperación del disolvente, generalmente por destilación. Además, los disolventes orgánicos están empezando a ser abandonados debido a sus nocivos efectos sobre el medio ambiente.

En este sentido, es interesante modificar el proceso sustituyendo el disolvente por un disolvente menos nocivo que pueda separar los aceites

lubricantes con facilidad. Una opción es la aplicación de CO<sub>2</sub>sc, ya que no deja residuos después de la despresurización.

Para alcanzar ese objetivo fue necesario estudiar el impacto sobre la extracción de los parámetros operacionales como la presión, la temperatura y el caudal másico de CO<sub>2</sub>, así como el uso de codisolventes. Entre los parámetros del sólido se estudió el tipo de metal, ya que se producía una interacción química entre éste y el aceite lubricante.

#### Extracción de 2,4,6-tricloroanisol a partir de partículas de corcho (Anexo II).

El objetivo de esta investigación fue estudiar la eliminación de tricloroanisol contenido en gránulos de corcho dado que esta molécula es la responsable de pérdidas millonarias en la industria de embotellado como consecuencia de aportar malos olores a los vinos.

La corteza del alcornoque (*Quercus suber*) se contamina con una serie de microorganismos entre cuyos deshechos metabólicos destaca el 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Cuando el corcho se utiliza como tapón de botellas, el TCA pasa a vinos y espumosos. Dado su bajísimo límite de detección olfativa: 5 µg L<sup>-1</sup> causa el rechazo de los consumidores, afectando muy negativamente a las industrias corcheras y vinícolas.

Hasta hace unos años el único método industrial de limpieza del corcho era el arrastre con vapor de agua que conseguía reducir significativamente la cantidad de TCA, pero no aseguraba su total eliminación. De forma paralela se hacían

análisis aleatorios para descartar posibles partidas contaminadas y destinarlas a otros segmentos como el aislamiento de edificios.

En este trabajo se estudió la extracción de TCA con CO<sub>2</sub>sc en gránulos de corchos. Este proceso está patentado por varias entidades con ligeras modificaciones en las condiciones o el uso de codisolventes, pero no publicado con rigurosidad. Los parámetros explorados en esta investigación fueron la presión, la temperatura y el caudal másico de disolvente además de otros derivados de la condición del sólido como el contenido en humedad de los gránulos. Por la importancia en la posterior aplicación del corcho para producir tapones, se investigó el impacto del tratamiento a alta presión en el grado de compactación y propiedades mecánicas del mismo.

○ **Obtención de fracciones de alto valor añadido**

Extracción de lípidos a partir de microalgas (Anexo III)

La biorrefinería a partir de microalgas es una industria con enorme potencial. Durante los últimos años esta materia prima ha suscitado gran interés tanto en la investigación como en la industria, especialmente en aplicaciones alimentarias, de salud y energéticas. Esto se debe a que las microalgas son organismos fotosintéticos, capaces de adaptarse a innumerables entornos, incluso los más extremos, y son capaces de sintetizar moléculas de alto valor añadido o acumular altas concentraciones de grasas.

Desde el punto de vista operativo es necesario superar obstáculos importantes antes de que la producción de lípidos de microalgas pueda ser efectiva. Entre otros factores, se requiere una gran cantidad de nutrientes para el crecimiento de microalgas y altas productividades selectivamente dirigidas a la acumulación de lípidos. Para preparar la materia prima, la extracción de microalgas debe seguir una serie de pasos como deshidratación, ruptura celular, secado y reducción del tamaño de partículas. Estos procesos consumen altos niveles de energía.

El contenido de agua es uno de los parámetros más complejos que influyen en la eficacia de la extracción supercrítica, especialmente en las materias primas que se obtienen de un cultivo celular. La deshidratación puede lograrse mediante floculación, flotación por aire, filtración y centrifugación, y aunque la filtración y la centrifugación pueden producir cerca del 100 % de la cosecha, ambos métodos son económicamente inviables. Por el contrario, la floculación y la flotación por aire parecen representar las técnicas más escalables. Para reducir el esfuerzo de secado necesario, es necesario explorar la mínima cantidad de agua que se requeriría en la materia prima para realizar la extracción supercrítica y aplicar un método de ruptura celular para mejorar la eficiencia de la extracción posterior.

La mayoría de las microalgas verdes, incluyendo *Chlorella*, almacenan lípidos neutros (triacilgliceroles) dentro del citoplasma, formando cuerpos redondos de lípidos (aceite). Su membrana y su pared celular actúan como barrera que impide la penetración de dióxido de carbono y la oilidifusión. Los métodos actuales de ruptura celular pueden clasificarse en dos grupos: mecánicos y no mecánicos.

En este capítulo se analizó cómo extraer lípidos a partir *Chlorella protothecoides*. Para ello, además de explorar los parámetros operacionales propios de la extracción (presión, temperatura, caudal de CO<sub>2</sub>), se estudiaron otros relativos a la condición de las microalgas tales como su contenido en humedad o grado de apertura celular a partir de molienda u otras técnicas como los ultrasonidos o microondas.

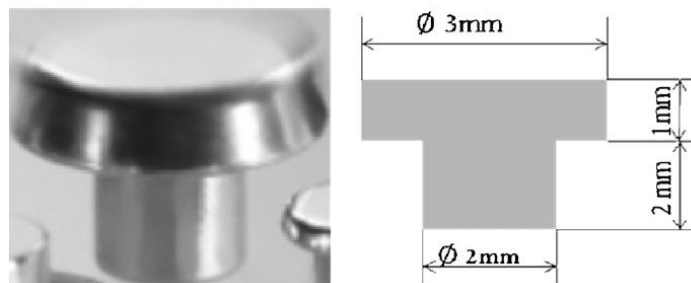
## **5. MATERIALES Y METODOLOGÍA**



## 5.1. Materiales

El disolvente fue CO<sub>2</sub> premier, (pureza >99.995 %), suministrado por Carburos Metálicos, Air Products Group.

Los contactos metálicos fueron amablemente proporcionados por la empresa Ami Doduco. La Figura. 5.1 muestra un contacto y sus dimensiones. Está formado por una superficie activa sobre un soporte. La superficie superior siempre está compuesta de plata, aunque puede tener pequeñas adiciones de otros metales o de óxidos metálicos para modificar sus propiedades. El cuerpo de los contactos puede ser de plata, pero para reducir costos esta parte puede ser reemplazada por cobre. La conformación del contacto entre la superficie de plata y el cuerpo de cobre se realizaba por presión frío, un método que garantizaba la ausencia de poros superficiales. Finalmente, el aceite lubricante que impregnaba los contactos fue el aceite de motor 12, suministrado por Cogelsa (España). Este producto es una mezcla de hidrocarburos (aceites minerales parafínicos), espesantes (mezcla de copolímero etileno-propileno y etileno-propileno-etilideno) y un muy pequeño porcentaje de antioxidantes a base de aminas.



**Figura 5.1.** Imagen de un contacto metálico (izquierda) y esquema con sus dimensiones (derecha).

En la extracción de TCA a partir de corcho se utilizó corcho granulado de tamaño estándar 2-3 mm de diámetro con una humedad en equilibrio con el medio ambiente de  $6 \pm 1$  % dependiendo de la estación, y una densidad de  $55 \text{ kg m}^{-3}$ . Contenía una carga de TCA de  $8,5 \pm 0,5 \text{ ng L}^{-1}$  (ppt).

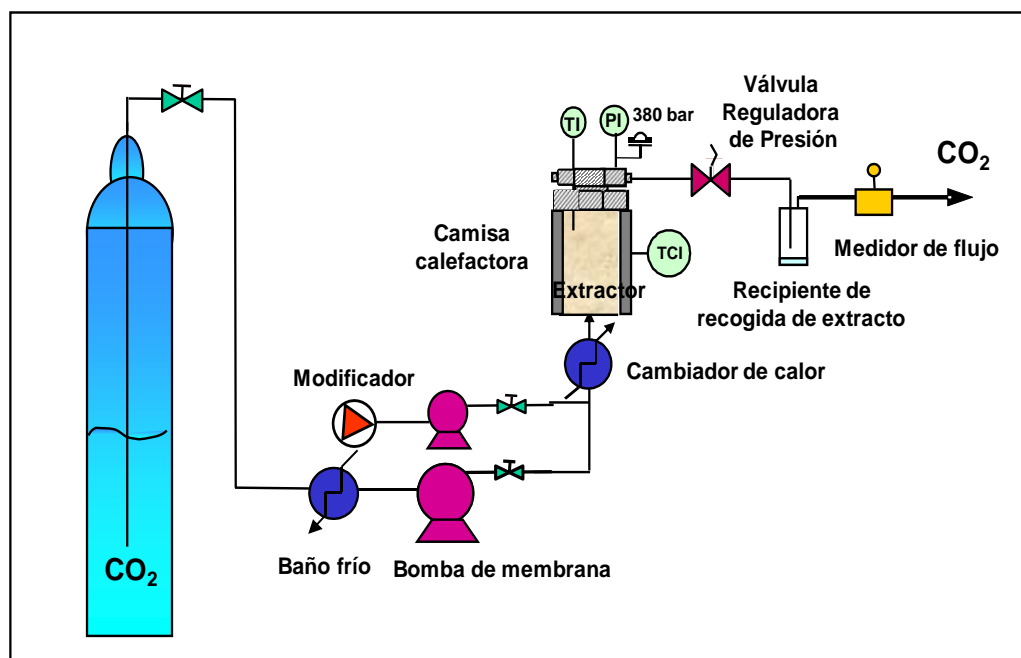
Respecto a la extracción de lípidos a partir de microalgas, la cepa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 249) se compró a The Culture Collection of Algae de la Universidad de Texas en Austin. Los componentes del medio basal fueron adquiridos a Scharlau Chemie, S. A., distribuida por Scharlab, S.L., España, y se emplearon de la siguiente manera (por litro): 0,7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg de vitamina B1 (tiaminohidrocloreuro) y 1 mL de solución A5, formada por 2,9 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1,8 g de  $\text{MnCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,22  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,08  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,0039 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Este medio se complementó con glucosa a  $15 \text{ g L}^{-1}$  y  $4 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura. Las células de microalgas se cultivaron en placas de Petri en el medio de cultivo sólido con 15 g de agar bacteriológico (Agar bacteriológico, Scharlau Chemie, S. A., Scharlab, S.L., España). Para controlar la acidez del medio se utilizó una disolución de KOH 0,1M.

## **5.2. Metodología**

En este apartado se describe de forma detallada la metodología común empleada en los tres artículos que forman parte de esta tesis doctoral y se resume

las particularidades de cada uno de ellos, emplazando al lector a profundizar en las mismas en cada artículo correspondiente.

El extractor empleado era de acero inoxidable 316ss. Dependiendo del trabajo se usó uno de 10 mL u otro de 100 mL, el primero con una relación longitud/diámetro de 10 y el segundo de 8. Se colocó una camisa calefactora a su alrededor para controlar la temperatura interior. El caudal de CO<sub>2</sub> se fijó con una bomba de diafragma (MD23G6M250, DOSAPRO MILTO ROY, Francia), mientras que la presión fue controlada por una válvula reguladora de presión (BPR, 26-1761-24-161, TESCOM Europa, Alemania). La cantidad de CO<sub>2</sub> se midió con un medidor de flujo másico que se colocó al final de la línea (M-10 SLPM-D, Alicat Scientific, USA). Un esquema del equipo se muestra en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Esquema de la instalación de extracción supercrítica de sólidos de la UCM.

En cada una de las extracciones se pesó una cantidad de materia prima y se depositó en el interior del extractor formando un lecho fijo. Después, el CO<sub>2</sub> fue bombeado y, una vez alcanzada la presión deseada, se abrió la BPR para proporcionar un flujo continuo del CO<sub>2</sub>sc a través del lecho. Después de la BPR, el CO<sub>2</sub> se despresurizaba; el poder disolvente del fluido supercrítico descendía y el extracto precipitaba en un frasco de vidrio previamente tarado. La cantidad de CO<sub>2</sub> circulada fue leída por el medidor de flujo másico. Las curvas de extracción se construyeron representando la cantidad de soluto extraído frente a la cantidad de CO<sub>2</sub> que pasaba por el lecho a intervalos de tiempo constantes.

Para el cálculo de la solubilidad en CO<sub>2</sub>sc de los aceites lubricantes y de microalga, se utilizó un procedimiento similar. El recipiente fue llenado con algodón impregnado con una cantidad conocida de aceite. El CO<sub>2</sub> fue bombeado a través del lecho a la velocidad óptima para asegurarse de alcanzar el equilibrio. Los valores de solubilidad se obtuvieron como la pendiente máxima de las curvas de extracción construidas.

Los datos presentados son el promedio de al menos dos experimentos. El error experimental fue deducido de pruebas seleccionadas que fueron repetidas seis veces.

A continuación, se describen las peculiaridades metodológicas de las distintas aplicaciones:

Extracción de aceite lubricante depositado sobre superficies metálicas (Anexo I).

En algunos de los experimentos se utilizó un codisolvente (etanol) del CO<sub>2</sub> que fue impulsado paralelamente al CO<sub>2</sub> en cantidades constantes, utilizándose una bomba de membrana (Jasco, PU 2080, India) sin enfriamiento de los cabezales. Ambos fueron mezclados en una pieza en forma de "T" antes de ser introducidos en el extractor (ver Figura 5.2).

En las muestras de los contactos se realizaron fotografías de microscopía electrónica en un equipo JEOL 6400 con EDX (Link-Oxford) para ver la presencia de trazas de aceite en la superficie metálica.

Extracción de 2,4, 6-tricloroanisol a partir de partículas de corcho (Anexo II).

*Humidificación del corcho.* Para obtener corcho con diferentes humedades, se introdujo el corcho en un baño termostático a 60 °C, colocándolo en una bandeja perforada por encima del nivel del agua. Esto se mantenía hasta que se alcanzó la humedad deseada. Luego se recogía y se dejaba enfriar antes de la extracción en un recipiente cerrado para mantener la humedad alcanzada.

El contenido de agua del corcho antes y después del tratamiento se midió por la pérdida de peso. Se colocaron muestras de 5 g de corcho en un vaso de precipitados y se introdujeron en un horno previamente calentado a 105 °C, manteniéndolos hasta alcanzar un peso constante. Las mediciones se realizaron en un mínimo de seis muestras.

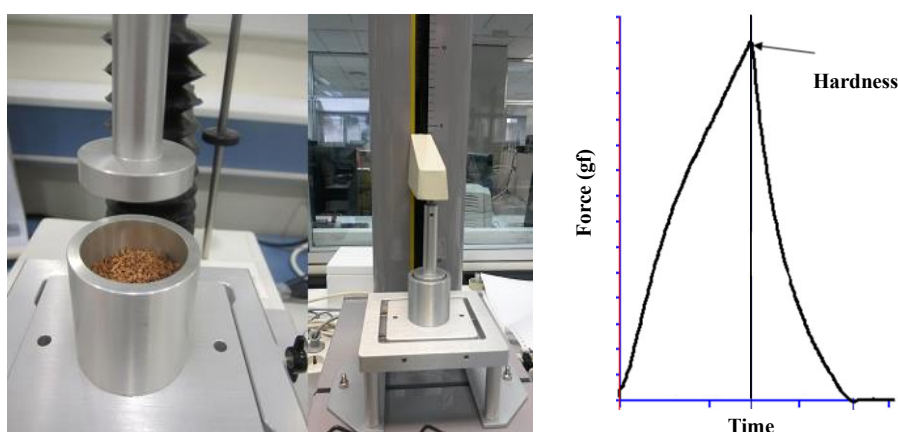
El comportamiento de la mezcla CO<sub>2</sub>-corcho en condiciones supercríticas fue visualizado en una célula de alta presión de volumen variable. La celda consistía en una cámara cilíndrica de acero inoxidable que contenía un pistón móvil que permitía variar el volumen interno de la célula. El contenido de la celda se iluminó y se vio a través de una ventana de zafiro utilizando un boroscopio y una cámara digital conectada a un ordenador. La celda se pudo calentar a 100 °C con una cinta calefactora de silicona. La temperatura en el interior de la célula fue controlada y medida por un termopar tipo J alojado en el interior. La muestra se podía comprimir (hasta 30 MPa) y descomprimir moviendo el pistón con un generador de presión manual que utiliza agua como fluido hidrostático. La presión se midió directamente en la parte de la celda que contenía la muestra mediante un transductor de presión.

Por otra parte, para determinar el grado de compactación que se producía en el lecho durante las extracciones supercríticas, se evaluaron diferentes condiciones de operación y despresurización. Los experimentos se llevaron a cabo con cantidades crecientes de gránulos de corcho, ocupando entre el 70 y el 100 % del volumen del extractor; mientras que la despresurización se realizó con diferentes velocidades. Después de la despresurización total, se abrió el extractor para comprobar el estado de compactación y deformación de los gránulos de corcho mediante inspección visual.

*Análisis del contenido de impurezas en el corcho.* El 2,4,6-tricloranisol del corcho se analizó mediante un procedimiento basado en la norma UNE 56930:2005. La maceración se realizó sumergiendo la muestra en una solución

hidroalcohólica al 12 % en un recipiente de 2 L. El líquido se analizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y el análisis de cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS/MS) con inyección automática. El límite de detección fue de  $0,4 \text{ ng L}^{-1}$  (ppt). Los ensayos se realizaron en el Centro Tecnológico da Cortiça de Portugal.

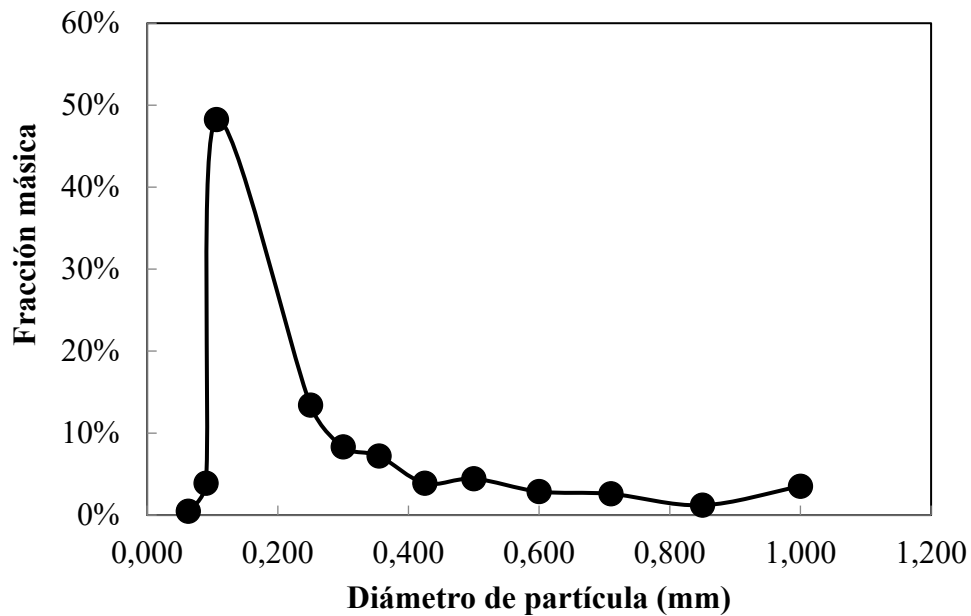
*Determinación de las propiedades mecánicas del corcho.* La dureza del corcho después de la extracción supercrítica se determinó mediante un texturómetro. La prueba consistió en la compresión de las muestras de corcho con un émbolo de sección plana a una velocidad definida y con una distancia de compresión fija. Una vez alcanzada la distancia de compresión, el émbolo ascendió a la posición inicial. El equipo registró la curva de fuerza de compresión. La dureza está relacionada con la fuerza requerida para lograr una cierta deformación, en este caso una cierta altura, por lo que se midió como la altura del pico en la curva de compresión, como se muestra en la Figura 5.3.



**Figura 5.3.** Equipo utilizado para la determinación de las propiedades mecánicas del corcho (izquierda) y curva característica de evolución de la fuerza de compresión con respecto al tiempo (derecha).

Extracción de ácidos grasos a partir de microalgas (Anexo III)

*Crecimiento, recolección, secado y molienda de las microalgas.* Se tomaron las colonias de microalgas a partir de placas Petri. Las colonias fueron entonces suspendidas en 100 mL medio líquido. Los cultivos fueron incubados a 28 °C en oscuridad en una incubadora orbital (Gallenkamp, Reino Unido) a una velocidad de agitación de 200 rpm. Después de un periodo de incubación de cuatro días, estos cultivos se utilizaron para inocular 400 mL de medio en frascos Erlenmeyer de 1 L. El cultivo *fed-batch* se realizó mediante la adición diaria de una solución madre que contenía 100 g L<sup>-1</sup> glucosa para mantener la concentración de glucosa a 15 g L<sup>-1</sup>. Para controlar el pH y mantener su valor por encima de 6,0 se utilizó una solución de KOH 0,1 M. La cantidad añadida cada día fue determinada por la acidez del medio de cultivo. Ambas soluciones fueron alimentadas con una jeringa estéril y el proceso se realizó en una cámara de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR, TELSTAR, España). Al final del período de incubación, las microalgas fueron recolectadas y centrifugadas a 9000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (Centrifugadora Sigma 4-16K, Sigma, Alemania). La biomasa húmeda tenía un contenido de agua aproximado del 400 % en peso. Luego se secó en un horno (Digiheat, J. P. Selecta, S. A., España) a 50 °C hasta alcanzar la humedad deseada. La humedad de equilibrio en condiciones de laboratorio se determinó en el mismo horno a 105 °C hasta alcanzar un peso constante de 7 % ± 1 %. Finalmente, la biomasa seca se molió en el molinillo comercial de café durante tres ciclos de 15 s evitando su calentamiento. La descripción granulométrica obtenida viene expresada en la Figura 5.4. El tamaño predominante fue de 100 µm.



**Figura 5.4.** Distribución de tamaños de partícula de la microalga

*Operaciones de pretratamiento.* Se llevaron a cabo diferentes técnicas para romper la pared celular de la microalga. En todos los tratamientos se utilizaron como material de partida microalgas centrifugadas. Para la ruptura celular en microondas, la muestra se introdujo en un microondas a 800 W durante 30 s. La sonicación se realizó en baño de ultrasonido (Elmasonic S15H, ELMA, Alemania) durante 30 min a 37 kHz. La esterilización en autoclave se realizó con la muestra introducida en una botella cerrada con vapor a 121 °C durante 20 minutos en autoclave (MED12, J. P. Selecta S. A., España).



**6. DISCUSIÓN INTEGRADORA:  
ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS QUE  
AFECTAN A LA EXTRACCIÓN  
SUPERCRÍTICA**



En esta tesis, la extracción supercrítica se llevó a cabo disponiendo el sólido como un lecho fijo en el extractor sobre el cual el CO<sub>2</sub>sc fluyó continuamente a diferentes condiciones de operación y caudales hasta que el sólido se agotó en el soluto de interés. El curso de la extracción se siguió determinando la cantidad de extracto frente al tiempo o la cantidad de CO<sub>2</sub> empleado.

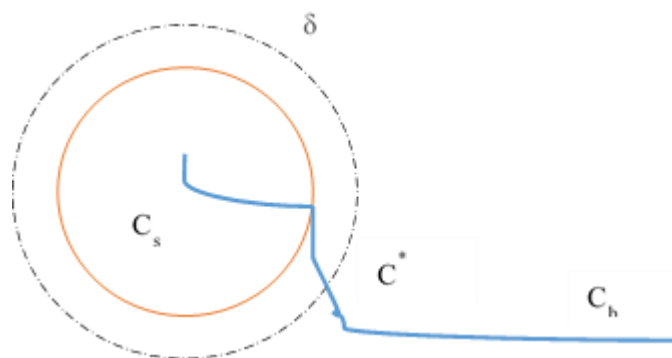
Durante esta operación, ocurrieron varias etapas [1]:

- La matriz absorbió el disolvente supercrítico.
- Los compuestos se disolvieron en el disolvente pudiendo ocurrir reacciones químicas.
- Los compuestos disueltos salieron hacia la superficie del sólido siendo la difusión interna el principal mecanismo.
- Los compuestos fueron transportados desde la superficie del sólido hacia el seno del disolvente atravesando la capa límite.
- Disolvente y soluto se separaron tras una despresurización.

Todas estas etapas generaron un perfil de composición del soluto desde el sólido hacia la fase global supercrítica que se muestra en la Figura 6.1.

Son muchos los parámetros que afectan al proceso de extracción. Brunner identifica varios [1]. Por un lado, aquellos parámetros que afectan a la fase fluida como pueden ser la concentración de extracto a lo largo del lecho por unidad de tiempo, la composición del extracto o las consideraciones de flujo (pistón ideal, dispersión axial, etc.). Por otro lado, los parámetros que afectan a la fase sólida como la concentración de soluto en las partículas individuales con sus problemas

derivados de transferencia de materia, geometría y tamaño; el pretratamiento del sólido, como puede ser la lisis celular en caso de operar con material biológico, la humectación o las reacciones químicas que se pueden llevar a cabo para facilitar la extracción. Además, la tasa y rendimiento de la extracción está afectada por los factores operativos como la presión, temperatura, densidad, etc.



**Figura 6.1.** Perfil de concentraciones durante la extracción supercrítica de un soluto contenido en una partícula sólida.

Los distintos sistemas soluto-sólido explorados a lo largo de esta tesis representan modelos característicos de extracción y permiten entender de forma omnicomprendensiva el funcionamiento de la extracción supercrítica sobre partículas sólidas.

En este sentido, la eliminación de aceites lubricantes de la superficie de partículas metálicas supone la extracción del soluto depositado en el exterior de la partícula, aunque fuertemente adsorbido a la misma. En la extracción de lípidos a partir de microalgas, estos están fácilmente accesibles debido a los tratamientos

físicos y térmicos a los que se somete a las microalgas. El tercer modelo es la eliminación de TCA a partir de gránulos de corcho, en este caso el soluto no está disponible y las partículas son grandes, del orden de 2-3 mm.

A continuación, se exponen los parámetros operacionales y de la condición del sólido que afectaron al rendimiento de extracción en los tres casos concretos que se investigaron en esta tesis doctoral.

### **6.1. Tipos de materia prima y localización del soluto**

En este trabajo se utilizaron tres tipos de materia prima. Primero, contactos metálicos contaminados con aceites lubricantes e hidráulicos. A pesar de ser una contaminación superficial, los aceites estaban fuertemente adsorbidos.

En segundo lugar, se utilizaron gránulos de corcho contaminados con TCA. Los gránulos tienen porosidad de 0,155 [2] siendo los poros tortuosos. El TCA estaba muy ligado y contaminaba en profundidad y homogéneamente a los mismos.

Finalmente, se exploró la extracción de aceite de microalgas. Los lípidos neutros (triacilgliceroles) fabricados en su metabolismo por las células vegetales de las microalgas verdes, tales como la *Chlorella*, están localizados en el citoplasma, formando cuerpos grasos redondos [3]. Los lípidos se sitúan en grandes vacuolas en el interior de la célula como muestran las imágenes al microscopio obtenidas por Yan et al. [4].

De tal forma que, para su extracción, el CO<sub>2</sub> debe atravesar la membrana (hecha de una capa de fosfolípidos) y la pared celular. En este trabajo se exploró el uso de diversas técnicas de apertura de la pared celular, tales como microondas, autoclavado y ultrasonidos.

También en esta materia prima se investigó la molienda con el fin de reducir el tamaño de partícula y así el camino difusional de acceso del CO<sub>2</sub> a los solutos. La ingeniería Natex recomienda tamaños de entre 0,4 y 0,8 mm para favorecer la extracción [5]. Menores tamaños de partícula pueden impulsar la canalización del CO<sub>2</sub> en el lecho de sólidos del extractor, reduciendo la eficacia de extracción y el arrastre de partículas por las conducciones que podrían llevar a un taponamiento de las mismas. El tamaño de partícula también afecta a la densidad aparente del lecho que tiene un importante impacto en la capacidad de producción y por tanto, en la economía del proceso [5]. Por otro lado, la molienda es una operación muy costosa energéticamente; consecuentemente debe ser optimizada.

En el caso de los gránulos de corcho y de los contactos metálicos, no fue posible moler puesto que el producto final del proceso eran estos materiales intactos.

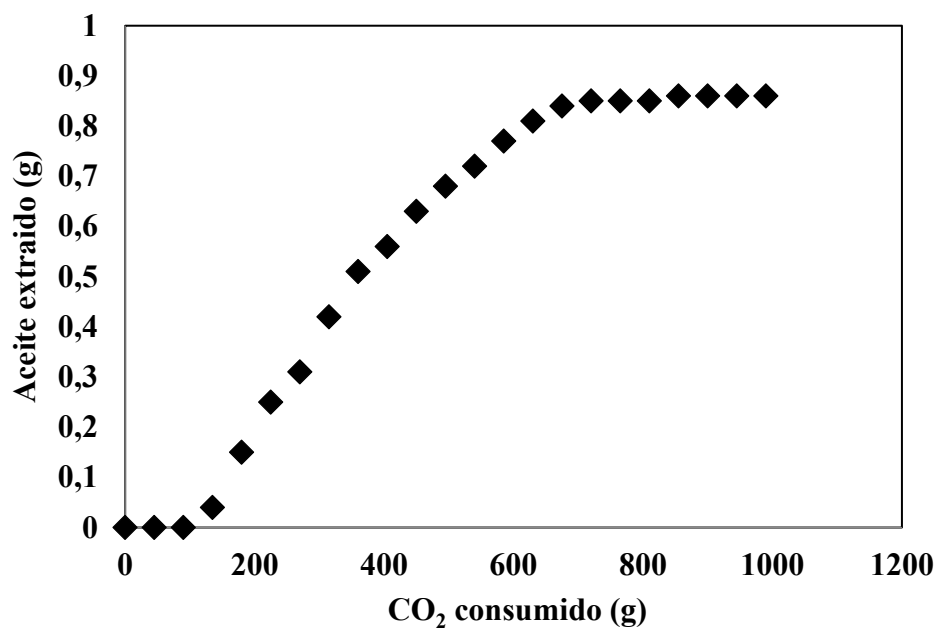
## **6.2. Etapas de la extracción supercrítica**

Las curvas de extracción tienen típicamente una forma sigmoideal. En las etapas iniciales, el extractor se llena con el CO<sub>2</sub>, por lo que apenas se extrae soluto (período I), luego la pendiente de la curva se hace más pronunciada y constante

(período II). Esta pendiente tiene, en todos los casos, un valor máximo que corresponde con la solubilidad del soluto en  $\text{CO}_2\text{sc}$ . Por último, la curva disminuye asintóticamente, acercándose al límite de rendimiento de extracción (período III).

En la extracción de aceites de matrices vegetales, esta última etapa está asociada con el inicio del control interno de transferencias al extraerse inicialmente el aceite fácilmente disponible, pero no el situado en el interior de células. En el caso de la eliminación de aceite lubricante, la disminución de la pendiente se debió a la fracción de aceite que estaba fuertemente adherida a la superficie metálica.

La Figura 6.2 muestra un ejemplo de curva de extracción, separando los tres periodos especificados.



**Figura 6.2.** Ejemplo de curva de extracción. En este caso se extrajo aceite lubricante de contactos metálicos a 30 MPa, 110 °C con un caudal de 3 g  $\text{CO}_2 \text{ min}^{-1}$

### 6.3. Equilibrio

Además de los factores de transferencia de materia interna y externa, la tasa de extracción tiene como límite máximo la solubilidad en el CO<sub>2</sub>sc. Para evaluar el impacto de las variables de operación en la solubilidad, Chrastil, en 1982, propuso la siguiente correlación inicialmente utilizada para explicar la solubilidad de grasas en CO<sub>2</sub>sc:

$$s = \rho^k \exp\left(\frac{a}{T} + b\right) \quad [6.1]$$

Donde la solubilidad ( $s$ ) depende de la densidad ( $\rho$ ) elevada a una constante  $k$ , así como de la inversa de la temperatura, siendo  $a$  y  $b$  constantes.

#### 6.3.1. Presión

En línea con lo indicado en la ecuación de Chrastil, la presión afecta directamente a la densidad, por lo que la densidad del CO<sub>2</sub> mejora siempre la solubilidad.

Así ocurrió en todos los ejemplos investigados en este trabajo. Además, estos resultados son consecuentes con lo observado en bibliografía para sistemas similares.

En cambio, en el estudio de eliminación de TCA a partir de gránulos de corcho se constató que operar a presiones superiores a 45 MPa era más perjudicial para el rendimiento de extracción que hacerlo a presiones más bajas; sin embargo, este fenómeno no se debe a cómo afecta este al equilibrio sino a la difusión interna, por lo que se la explicación al mismo se desarrolla más adelante.

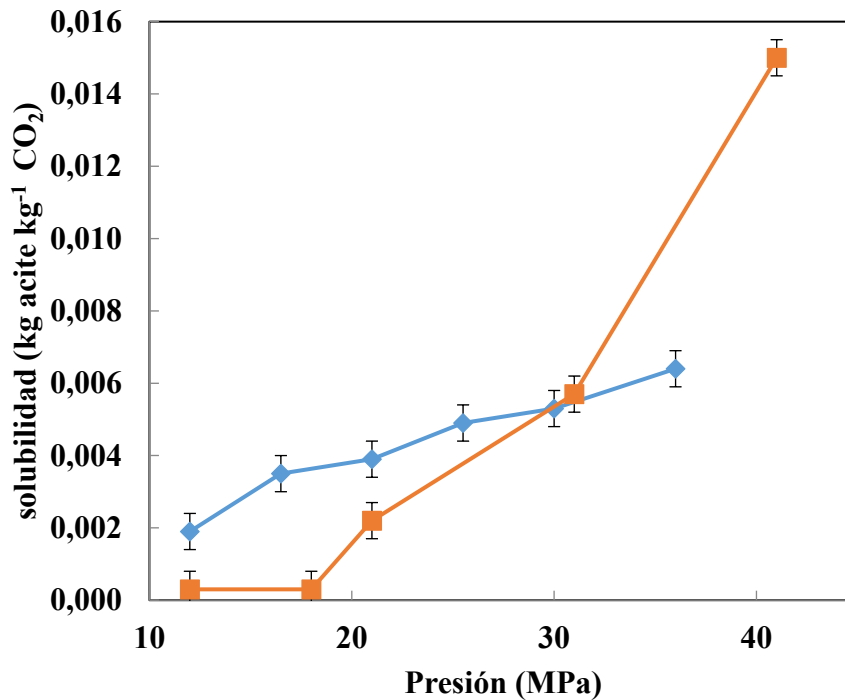
### **6.3.2. Temperatura**

La temperatura tiene un doble impacto en la solubilidad, ya que por un lado hace descender la densidad del  $\text{CO}_2\text{sc}$ , mientras que su aumento hace crecer la presión de vapor del soluto según la ecuación de Antoine y por tanto mejorar la concentración del soluto en la fase supercrítica.

La Figura 6.3 representa la solubilidad del aceite lubricante que contaminaba los contactos metálicos a dos temperaturas distintas mientras se aumenta la presión. Las isothermas en los diagramas solubilidad-presión se cruzaron en el punto cruce, que representa la presión en la que el aumento de la temperatura de funcionamiento benefició a la extracción. En este caso fue de aproximadamente 28 MPa.

Consecuentemente, en la eliminación del aceite lubricante de las superficies metálicas de los contactos, se observó que, por encima de esa presión, operar a alta temperatura beneficiaba la extracción. En la Figura 6.4 se muestran las curvas de extracción a 30 MPa y dos temperaturas, 110 y 37 °C. La pendiente de las curvas en la zona de velocidad máxima fue mayor a la mayor temperatura logrando un 90

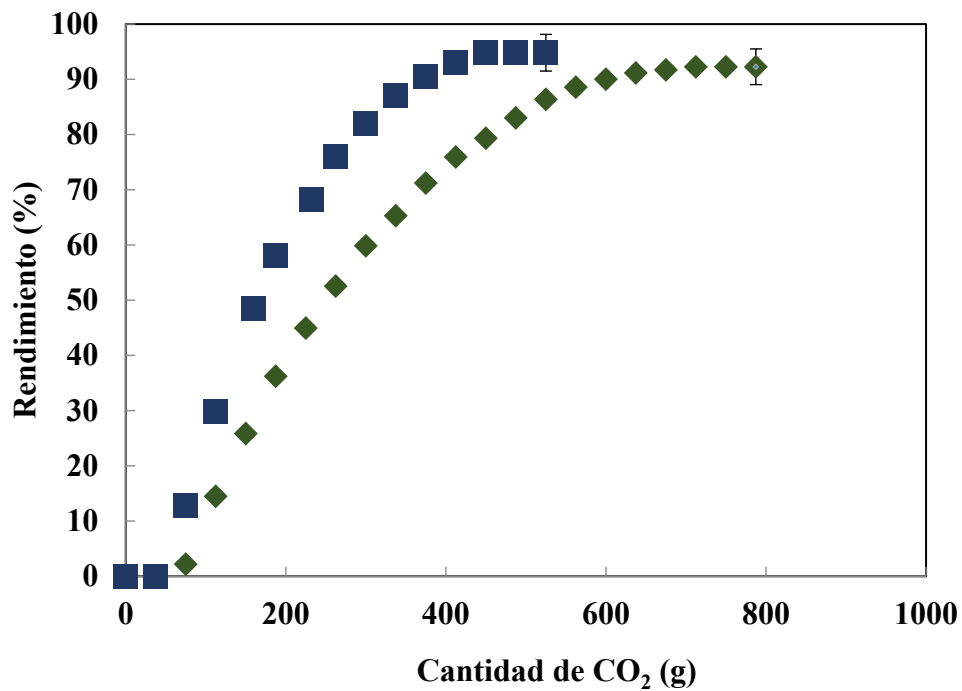
% de eliminación del aceite lubricante con 15 kg de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de contactos, mientras que a 37 °C, hicieron falta 20 kg de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de contactos.



**Figura 6.3.** Variación de la solubilidad de aceite lubricante con la presión a dos temperaturas diferentes. ■ 110 °C; ◆ 37 °C). Flujo másico de CO<sub>2</sub>: 2 g·min<sup>-1</sup>.

En ningún caso se pudo superar el rendimiento de eliminación del 95 % debido a la existencia de una capa de aditivos o a la presencia de fracciones pesadas fuertemente adheridas a la superficie de los contactos, cuya eliminación (desorción), de carácter endotérmico, también se vio favorecida por el aumento de la temperatura. Porta et al. [8] hallaron resultados similares en el desengrasado de

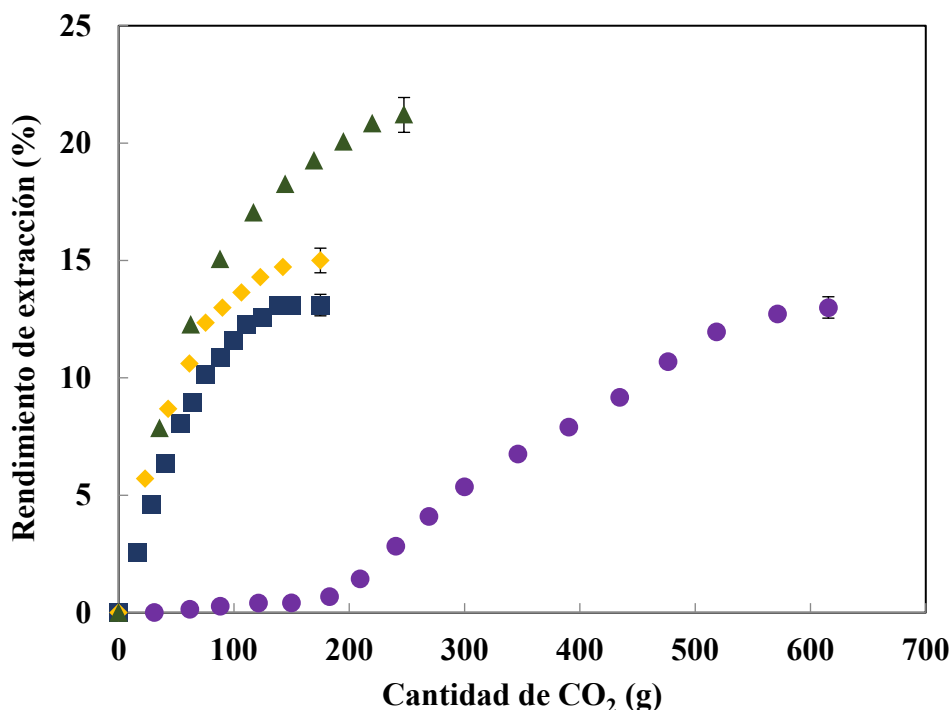
piezas metálicas, teniendo que aumentar la temperatura hasta 100 °C mientras la presión se mantenía constante en 15 MPa.



**Figura 6.4.** Efecto de la temperatura en la extracción de aceite lubricante a 30 MPa con un flujo másico de 3 g·min<sup>-1</sup> ■ 110 °C ◆ 37 °C.

En la extracción de aceite a partir de microalga también se exploró el impacto de las condiciones de operación. La presión se probó desde 15 MPa hasta 30 MPa a 35 °C; los resultados se muestran en la Figura 6.5. El rendimiento de extracción se incrementó notablemente con la presión debido al consiguiente aumento de la densidad del disolvente y, por lo tanto, de la capacidad de disolución. Además, la Figura 6.5 también muestra las curvas de extracción a tres temperaturas diferentes (35, 55 y 70° C) y 30 MPa. El aumento de la temperatura

a 70 °C mejoró la extracción; por lo tanto, el rendimiento de extracción de aceite a esta temperatura fue ligeramente superior al 21 %, pero menos de la mitad del obtenido en un equipo Soxhlet (46 %).



**Figura 6.5.** Curvas de extracción a diferentes condiciones de operación: 15 MPa, 35°C (●); 30 MPa, 35°C (■); 30 MPa, 55 °C (◆); 30 MPa, 70 °C (▲). El contenido en agua de la microalga era del 7 % y el caudal de CO<sub>2</sub>, 3 g min<sup>-1</sup>.

El mayor rendimiento de extracción a 70 °C fue inicialmente inesperado, ya que una temperatura más alta suele provocar una menor velocidad de extracción si la presión es relativamente baja debido a la densidad del CO<sub>2</sub>sc, que reduce su poder disolvente. Por ejemplo, la densidad del CO<sub>2</sub>sc a 30 MPa y 35 °C es superior a 70 °C. Sin embargo, resultados similares se obtuvieron en investigaciones

anteriores [9,10]. En el trabajo de Bjornsson et al. [10], se reportó que el rendimiento de los lípidos aumentó significativamente de 15,6 a 28,5 g kg<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> cuando la temperatura se incrementó de 50 a 70 °C a 35,0 MPa.

### **6.3.3. Adición de codisolvente**

En el caso de la extracción de aceites lubricantes depositados sobre la superficie de los contactos metálicos no fue posible eliminar el último residuo de aceite adherido solo con la utilización de CO<sub>2</sub>. Algunos autores exploraron la posibilidad de emplear codisolventes como los tensioactivos [8], la N-metil pirrolidona o el agua [11].

En este trabajo se estudió la adición de un disolvente común. Como los contactos no son productos de consumo, la introducción de un modificador no suponía problemas de toxicidad, aunque era necesaria la recuperación del codisolvente. En este sentido, el etanol era el mejor candidato porque su capacidad como modificador en la extracción de aceites vegetales está plenamente demostrado, no es un compuesto tóxico, y es fácil de usar y recuperarse. Además, en un ciclo cerrado, el etanol podría ser recirculado con el CO<sub>2</sub>, dejando poco o ningún residuo sobre los contactos.

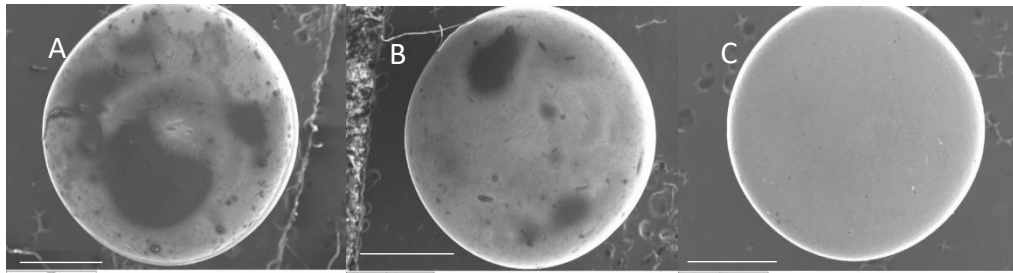
La Tabla 6.1 muestra una comparación entre las eficiencias de eliminación del aceite lubricante con extracciones realizadas mediante la introducción de distintas cantidades de etanol (hasta un 10 %) en masa a dos temperaturas.

**Tabla 6.1.** Rendimiento de la extracción de aceite mineral cuando se añade etanol a 30 MPa y con un caudal másico de etanol+ CO<sub>2</sub> de 3 g min<sup>-1</sup>.

<b>Temperatura</b>	<b>Etanol</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>(°C)</b>	<b>(%)</b>	<b>(h)</b>	<b>(%)</b>
37	0,0	5,0	87
37	2,5	4,0	88
37	5,0	4,0	95
37	10,0	4,0	99
110	0,0	4,0	95
110	5,0	3,5	100

La introducción del etanol en la mezcla de disolventes claramente mejoró el rendimiento de extracción. Por ejemplo, trabajando a 37 °C, con una adición de etanol del 10 % la eficacia de la extracción pasó de un 87 a un 99 %. En cambio, la cantidad necesaria de etanol necesaria para eliminar totalmente el aceite lubricante a 110 °C fue del 5 %.

En la Figura 6.6 este hecho se demuestra mediante microfotografías electrónicas. Cuando el efecto de las altas temperaturas se combinó con la adición de una pequeña cantidad de etanol como disolvente, la extracción de aceite fue completa, dejando la superficie de contacto libre de manchas residuales. Sin embargo, el contacto se oscureció levemente, probablemente debido a la oxidación por el etanol. Sin embargo, este efecto no es un problema, ya que el procesamiento de los contactos incluye una etapa de pulido posterior.



**Figura 6.6.** Imágenes de microscópica electrónica de la superior superficie de los contactos. La imagen A muestra el experimento realizado a 37° C con etanol al 10 %. La imagen B muestra el resultado a 110° C cuando no se introdujo el codisolvente. En la imagen C se combinaron la temperatura y la adición de etanol (110° C, 5 % de etanol).

#### 6.4. Transferencia interna

Fundamentalmente, el mecanismo de transporte dentro del sólido es la difusión, estableciéndose un gradiente de concentración del soluto dentro de la partícula sólida durante la extracción. Este fenómeno se puede representar con la segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial c_p}{\partial t} + \frac{1}{\varepsilon_p} \frac{\partial c_s}{\partial t} = \frac{D_{AB}}{r^2} \frac{\partial}{\partial t} \left( r^2 \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) \quad [6.2]$$

Donde  $c_p$  es la concentración en los poros y  $c_s$  la concentración en el sólido,  $r$  es el radio de la partícula,  $\varepsilon_p$  es la porosidad de la partícula y  $D_{AB}$  la difusividad del soluto en el CO<sub>2</sub>. Esta difusividad se ve corregida cuando el disolvente tiene que atravesar una partícula porosa.  $D_{eff}$  es el coeficiente de difusión efectiva dentro

del sólido, que resulta de corregir el coeficiente de difusión molecular por las características del sólido: porosidad y tortuosidad de poro (típicamente de 2 a 3) que es la relación entre la longitud del poro y la que tendría si fuera recto

$$D_{eff} = \frac{D_{AB}\varepsilon_p}{\tau} \quad [6.3]$$

Habitualmente el coeficiente de difusión se obtiene con modelos por ajuste de datos experimentales de curvas de extracción, pero para comprender el impacto que en el mismo tienen las condiciones de operación, se podría utilizar la ecuación de Vaz, aplicada con éxito en extracción supercrítica [25]:

$$D_{AB} = A \cdot \frac{\left(\frac{T}{\eta_1}\right)^\alpha}{(M_2 V_{bp,2})^b} + \frac{k_B T}{6\pi\eta_1\sigma_{12}} \left[ \frac{1}{1 + \theta \left(1 - \frac{1}{2}\Gamma^\infty\right)^{\frac{1}{2}}} \right] \quad [6.4]$$

donde  $A$  es una constante universal,  $\eta_1$  es la viscosidad  $\text{CO}_{2sc}$ ,  $M_2$  es el peso molecular del soluto,  $V_{bp,2}$  es el volumen molar en el punto de ebullición normal del soluto,  $k_B$  es la constante de Boltzmann =  $1,38065 \cdot 10^{-16}$  erg  $\text{K}^{-1}$ ,  $\sigma_{12}$  es el diámetro binario,  $\theta$  es una constante universal y  $\Gamma^\infty$  es un factor termodinámico a dilución infinita.

Según esta expresión, la difusión es inversamente proporcional a la presión (porque afecta negativamente al volumen molar del soluto), aumenta significativamente con la temperatura y es prácticamente independiente de la concentración.

**Tabla 6.2.** Impacto de la presión de operación sobre la eliminación de TCA. La temperatura fue de 40 °C. El caudal de CO<sub>2</sub> fue 4 g min<sup>-1</sup>. El tiempo de extracción, 60 min.

<b>Densidad</b>	<b>Presión</b>	<b>Viscosidad</b>	<b>TCA residual</b>
<b>(kg m<sup>-3</sup>)</b>	<b>(MPa)</b>	<b>(Pa s 10<sup>-5</sup>)</b>	<b>(ng L<sup>-1</sup>)</b>
37	2	2	5
580	9,5	4	<0,4
736	14	7	<0,4
975	45	11	1

El negativo impacto de la presión en la difusión se vio claramente en la eliminación de TCA a partir de gránulos de corcho; el transporte del TCA de los gránulos al seno del fluido se retrasó a presiones muy altas a pesar de la mayor densidad (capacidad de disolución) del CO<sub>2</sub>. Como se puede observar en la Tabla 6.2, a la presión más elevada de operación de 45 MPa, empeoró la eficiencia de extracción aumentando la concentración residual de TCA en los gránulos de

corcho. Esto pudo deberse también a que el corcho a esas altas presiones se compactó permanentemente, dificultando la circulación del fluido supercrítico.

#### **6.4.1. Humedad**

La humedad inicial de la materia prima es otro parámetro importante que afecta el transporte interno. Cuando la estructura celular tiene poca agua, esta se contrae y, consecuentemente, se dificulta la difusión, lo que reduce el rendimiento [1,13]. Sin embargo, el exceso de agua puede crear una barrera adicional al transporte y puede generar la coextracción de sustancias polares, reduciendo así la selectividad. Por ambas razones, el contenido de agua debe optimizarse en las extracciones supercríticas. Por ejemplo, a escala industrial, el mejor contenido de humedad para la descafeinización del café verde se sitúa entre el 35 % y el 45 %, y para la eliminación de plaguicidas del arroz, entre el 15 % y el 20 % [13].

En esta tesis se analizó el contenido en agua de las materias primas tanto en la extracción de aceite a partir de microalgas como en la eliminación de TCA a partir de gránulos de corcho.

En el proceso de tratamiento de las microalgas, la recolección es un paso crítico por tener estas un alto contenido de agua y ser el secado una operación costosa. La deshidratación puede lograrse mediante floculación, floculación de aire, filtración y centrifugación, y aunque la filtración y la centrifugación pueden producir cerca del 100 % de rendimiento, ambos métodos son económicamente

inviabiles [14,15]. Por el contrario, la floculación [16] y la flotación por aire parecen representar las técnicas más escalables [17].

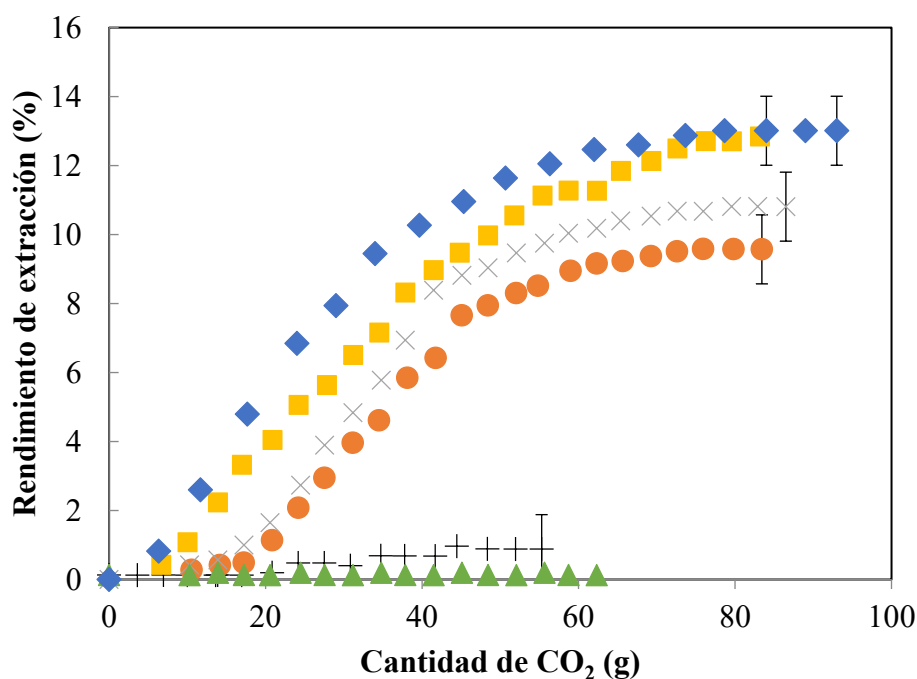
Para reducir el esfuerzo de secado necesario, en este trabajo se exploró cuál era la mínima cantidad de agua que se requiere en la materia prima para realizar la extracción supercrítica.

Así, las curvas de extracción fueron comparadas en diferentes contenidos de agua, comenzando por la biomasa totalmente seca hasta el 400 %. Este mayor contenido de agua es la que contiene la biomasa después de la centrifugación. En la Figura 6.7 se muestran los resultados. Con humedades crecientes a partir del 7 % se alcanzaron menores rendimientos, llegando a un rendimiento 0 % cuando se trabajó con microalga no sometida a ningún proceso de secado. Con una humedad del 400 %, prácticamente no se extrajo aceite; sin embargo, con humedades en torno al 50 % la reducción de la velocidad de extracción no fue significativa. De hecho, Chen et al. [18] alcanzaron un rendimiento de extracción superior al 90 % en operación continua a contracorriente utilizando lodos con contenidos en agua próximos al 85 %.

En la extracción de TCA a partir de gránulos de corcho, la humedad inicial de la matriz sólida también afectó significativamente a la transferencia interna. La Tabla 6.3 muestra el resultado de la extracción cuando se utilizaron gránulos de corcho de diferentes grados de humedad. El corcho seco tenía un contenido medio de humedad inferior al 4 %, el corcho natural tenía un equilibrio de humedad de aproximadamente el 6 %, mientras que el contenido de agua de corcho húmedo era

superior al 12 %. Con este último producto se reprodujo la humedad que tenían los gránulos de corcho tras un lavado por arrastre de vapor.

En las mismas condiciones de densidad y tiempo de contacto, la extracción del corcho húmedo fue mucho más efectiva que con el corcho seco. En este último material, fue necesario operar con altos tiempos de residencia en el extractor (47 min) para eliminar el TCA. Contrariamente, la eliminación total del TCA se logró con el corcho húmedo (12 %) cuando el tiempo de residencia fue de 8 minutos. El fenómeno de mejora del rendimiento de extracción cuando los gránulos estaban húmedos se debe probablemente al hinchamiento de los mismos por el agua, lo que permitió una mejor penetración del  $\text{CO}_2\text{sc}$  y, por lo tanto, una mayor eficiencia de extracción.



**Figura 6.7.** Curvas de extracción utilizando distintos contenidos de agua. Las condiciones de operación fueron 30,0 MPa, 3 g min<sup>-1</sup> and 35 °C. Contenido en agua: (■) 0 %, (◆) 7 %, (x) 30 %, (●) 50 %, (+) 200 % y (▲) 400 %.

Como conclusión común a ambos procesos puede afirmarse que, en la extracción de sustancias situadas en el interior de matrices vegetales, la humectación de la materia prima es fundamental para garantizar el adecuado transporte interno del CO<sub>2</sub>sc y su posterior salida cargado con el soluto.

**Tabla 6.3.** Efecto de la humedad del corcho en función del tiempo contacto en la extracción de TCA a partir de gránulos de corcho. Densidad CO<sub>2</sub> = 326 kg m<sup>-3</sup>.

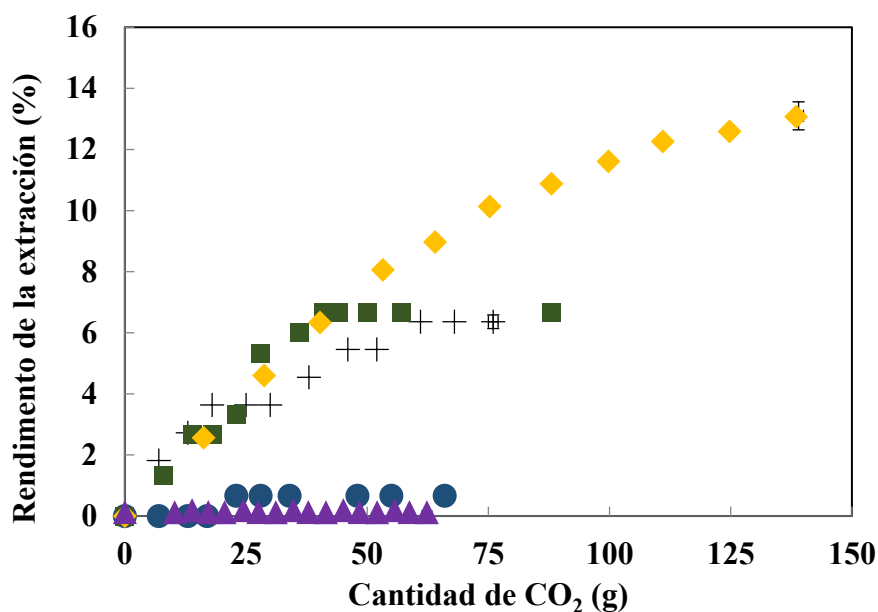
	<b>Caudal CO<sub>2</sub> (g min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Relación disolvente (kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> corcho)</b>	<b>Tiempo residencia (min)</b>	<b>Tiempo operación (min)</b>	<b>TCA residual (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	8	120	4	30	3
Corcho seco	4	60	8	60	2
(< 4 %)	1,5	23	22	160	1
	0,7	23	47	340	<0,4
Corcho con	8	120	4	30	2
humedad en	4	60	8	60	1
equilibrio con el	3	42	12	80	<0,4
ambiente (6 %)					
Corcho húmedo	8	120	4	30	1
(12 %)	4	60	8	60	<0,4

#### **6.4.2. Impacto de la aplicación de técnicas de apertura celular**

Los métodos actuales de ruptura celular pueden clasificarse en dos grupos: mecánicos y no mecánicos [19]. Las sustancias químicas, como los detergentes, las enzimas líticas o los choques osmóticos se han utilizado con éxito en estudios a escala de laboratorio; sin embargo, solo unos pocos métodos mecánicos, ya sea de forma autónoma o con la intervención de enzimas u otros agentes químicos, pueden emplearse en aplicaciones industriales [20]. La liofilización también es ampliamente utilizada para la apertura y secado simultáneo de células [21]. Sin embargo, este procedimiento no puede emplearse a escala comercial. Entre las diversas técnicas mecánicas disponibles, destaca la molienda; sin embargo, este procedimiento requiere una gran cantidad de energía. En este sentido, las soluciones alternativas, tales como ultrasonido, microondas, autoclave, homogenización a alta presión y combinaciones de varias de ellas, han sido objeto de investigaciones recientes. Nuestro trabajo analizó el efecto que algunas de estas técnicas tenían sobre los lodos de microalgas centrifugadas. El fin fue explorar la posibilidad de minimizar el secado de la microalga para la extracción, dado el elevado coste de esta operación.

Así, se exploraron varias técnicas, tales como microondas, sonicación y autoclave. Se emplearon en microalgas húmedas (400 % de agua). En la Figura 6.8 se muestran las curvas de extracción de estos experimentos. Por fines comparativos, también se trazaron las curvas de extracción obtenidas con las microalgas después de la centrifugación y con las microalgas húmedas.

En ella se observa que el pretratamiento con microondas o ultrasonidos no permitió alcanzar el rendimiento máximo que se alcanza con la microalga al 7 % de humedad, aunque aumentó notablemente el rendimiento de extracción con respecto a la microalga húmeda no pretratada. En este sentido, el uso de técnicas de pretratamiento de microalga húmeda permitió alcanzar rendimientos del 7 % frente al 14 % conseguido con microalga seca. Aunque pueda parecer una cantidad baja de aceite, lo cierto es que los costes energéticos del proceso seguramente disminuyan, por lo que se debería encontrar un óptimo económico entre secado-pretratamiento-rendimiento.



**Figura 6.8.** Curvas de extracción utilizando distintos métodos de ruptura celular. Condiciones de operación: 30,0 MPa, 3 g min<sup>-1</sup> y 35 °C. Microondas (■), Autoclave (●), Ultrasonidos (+). En estos ensayos, el contenido en agua de la microalga era del 400 %. Para comparar se dibuja también la curva con microalga seca y molida (humedad: 7%) (◆), y microalga después de la centrifugación (humedad: 400%) (▲).

El calentamiento de los lodos de microalgas en un autoclave no se consideró eficiente porque el rendimiento de extracción fue del 1 %. Contrariamente, Dejoye et al. [22] combinaron la extracción supercrítica con un tratamiento de microondas previo y, al hacerlo, aumentaron el rendimiento de aceite del 25 % al 150 % dependiendo de las condiciones. Asimismo, García et al. [23] combinaron la extracción supercrítica con sonicación para mejorar el rendimiento de desgrasado de las almendras en un 37 % y reducir el tiempo de operación en un 50 %. Ambos trabajos se realizaron con materia prima seca. En nuestro trabajo, estas técnicas fueron exitosas en romper la pared celular, sin embargo, el alto exceso de agua impidió el transporte de aceite desde la superficie celular y probablemente la penetración de CO<sub>2</sub>sc.

### **6.5. Transferencia externa**

La transferencia del soluto desde el sólido hasta la fase supercrítica se puede describir en términos de un coeficiente de transferencia y de la diferencia de concentración (fuerza impulsora):

$$n_i = k_c A [c^* - c_b] \quad [6.5]$$

Donde  $n_i$  es la velocidad de transferencia,  $k_c$  es el coeficiente de transferencia de materia,  $A$  es el área de la partícula,  $c^*$  es la concentración de equilibrio en la superficie y  $c_b$  la concentración del extracto en el fluido.

La estimación del coeficiente de transferencia se puede realizar mediante correlaciones empíricas del tipo de Wakao y Kagui en función de varios números adimensionales [24]:

$$\frac{Sh}{\sqrt[3]{Sc}} = \frac{2}{\sqrt[3]{Sc}} + 1.1Re^{0.6} \quad [6.6]$$

donde  $Sh$  es el número Sherwood;  $Sc$  es el número Schmidt y  $Re$ , el número Reynolds. La densidad y viscosidad de  $CO_2$  se tomaron del NIST Chemistry WebBook. El coeficiente de transferencia externa,  $k_c$  en  $m\ s^{-1}$ , se obtiene así a partir del número de  $Sh$ :

$$Sh = \frac{k_c \cdot d_p}{D_{AB}} \quad [6.7]$$

donde  $d_p$  es el diámetro de partícula suponiendo que la geometría es esférica y  $D_{AB}$  es el coeficiente de difusión binaria.

De esta expresión se puede inferir que la velocidad de transferencia externa en el disolvente supercrítico dependerá sobre todo de las propiedades de dicha fase fluida: densidad y viscosidad, así como de la difusividad del soluto en el fluido supercrítico.

### **6.5.1. Temperatura**

La viscosidad del CO<sub>2</sub> varía ampliamente al variar la presión y la temperatura de operación. Tal y como se muestra en la Figura 1.1, la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura por lo que, atendiendo a la ecuación precedente un aumento de temperatura siempre maximiza el coeficiente de difusión binario entre el CO<sub>2</sub> y el soluto.

En paralelo y tal y como se ha venido describiendo a lo largo de este capítulo, la temperatura hace disminuir la densidad, perjudicando la transferencia externa, mientras que hace disminuir la viscosidad, favoreciendo dicha transferencia. En este caso también se produce un efecto cruzado que debe analizarse para cada sistema.

La Tabla 6.4 muestra la difusión molecular binaria del aceite de microalga en función de la temperatura con la temperatura estimada a partir a partir de la ecuación de Vaz (Eq. 6.4). Se utilizó el peso molecular del ácido oleico, ya que es el principal componente del aceite de microalgas, 282,46 g mol<sup>-1</sup> y los valores de viscosidad de CO<sub>2</sub>sc obtenidos del NIST Chemistry WebBook.

El aumento de la temperatura de 35 °C a 70 °C favoreció el aumento de la difusión del aceite en el CO<sub>2</sub>sc y consecuentemente la velocidad de extracción como se demuestra en el aumento de la pendiente en las curvas.

**Tabla 6.4.** Influencia de la temperatura en la solubilidad de aceite en CO<sub>2</sub> y la difusividad de aceite en CO<sub>2</sub>.

T (°C)	Densidad (kg m <sup>-3</sup> )	Solubilidad (mg g <sup>-1</sup> )	Máxima pendiente en curvas (g kg <sup>-1</sup> )	D <sub>AB</sub> (10 <sup>7</sup> m s <sup>-1</sup> )
35	929	7,4 ± 0,7	4,2 ± 0,4	7,2
55	870	5,6 ± 1,8	4,8 ± 0,8	7,5
70	787	5,1 ± 0,7	4,9 ± 0,6	7,9

### 6.5.2. Presión

Según la ecuación de Wakao y Kaguei, la presión afecta a  $k_c$  al incidir sobre la densidad y la viscosidad, aumentando en paralelo a la primera y de forma inversa con la segunda, por lo que el impacto de esta variable tiene efectos cruzados.

### 6.5.3. Caudal

El caudal afecta a la velocidad lineal del fluido y por tanto tiene una afección directa en el coeficiente de transferencia externa. Además, un aumento del caudal de disolvente aumenta la velocidad de extracción y, por lo tanto, reduce el tiempo de extracción necesario. Esto se debe a que el gradiente de concentración media se mantiene más alto porque la concentración de equilibrio es constante a

una presión y temperatura dadas; sin embargo, la carga del fluido supercrítico es menor [13]. Aunque este incremento de la tasa de extracción con el aumento en la velocidad de paso del CO<sub>2</sub>sc tiene un límite que viene dado por la necesidad de aportar un tiempo de contacto mínimo con la materia prima.

Por otro lado, el caudal de CO<sub>2</sub> tiene un impacto significativo en los costes operativos y de inversión. Perrut [26] demostró que el precio (*PI*) de una instalación supercrítica llave en mano varía linealmente con una pendiente de 0,24 frente al logaritmo del producto del volumen total  $V_T$  por el caudal de diseño  $Q$ .

$$PI = A(10 \cdot V_T \cdot Q)^{0,24} \quad [6.8]$$

Esto revela que el coste de una unidad de fluido supercrítico aumenta aproximadamente a medida que aumenta la raíz cuadrada del caudal de disolvente. Por lo tanto, es necesario optimizar este parámetro para diseñar y ejecutar una instalación rentable.

En este trabajo el caudal de CO<sub>2</sub> se varió el caudal entre 1 y 7 g min<sup>-1</sup>. Los parámetros característicos de transferencia externa para esta configuración se muestran en la Tabla 6.5 concretando para la extracción de lípidos, en el máximo intervalo de presiones y temperaturas utilizado en esta tesis.

Por un lado, las velocidades espaciales oscilaron entre 0,02 y 0,42 kg h<sup>-1</sup> que significan 0,1 y 5,8 kg h<sup>-1</sup> por cada litro de extractor. Con estas velocidades bajas,

los Re (asumiendo lecho vacío) fueron muy bajos como se observa en la Tabla 6.5, por lo que la transferencia de materia ocurrió fundamentalmente en flujo laminar; consecuentemente, un aumento en el caudal de disolvente debería reducir la resistencia al transporte en la fase supercrítica. Sin embargo, hay un máximo en la velocidad de paso del CO<sub>2</sub> en el extractor relacionado con un tiempo de residencia que maximiza la carga en el extracto.

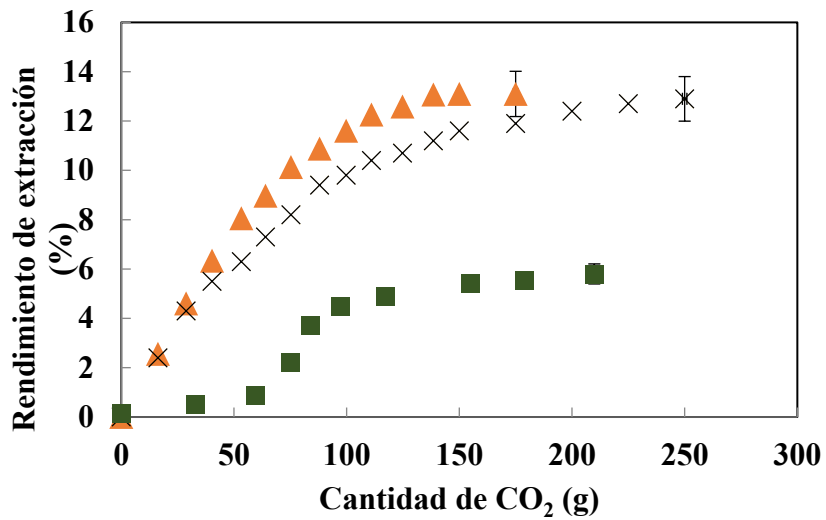
**Tabla 6.5.** Parámetros característicos de la resistencia a la transferencia externa calculados a distintas presiones, temperaturas y caudales. El coeficiente de transferencia de materia,  $k_c$ , se estimó utilizando los coeficientes de difusión para la extracción de lípidos de la microalga.

Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Caudal (g min <sup>-1</sup> )	Re	Tiempo de residencia (min)	$k_c$ E08 (m s <sup>-1</sup> )
30	40	1	0,008	86	2,6
		3	0,022	29	3,1
		5	0,038	17	3,4
		7	0,053	12	3,6
30	110	1	0,014	74	2,8
		3	0,042	25	3,4
		5	0,071	15	3,9
		7	0,099	11	4,3
12	40	1	0,012	68	2,8
		3	0,036	23	3,3
		5	0,060	14	3,7
		7	0,085	10	4,1
12	110	1	0,030	21	3,2
		3	0,090	7	4,2
		5	0,151	4	4,9
		7	0,211	3	5,5

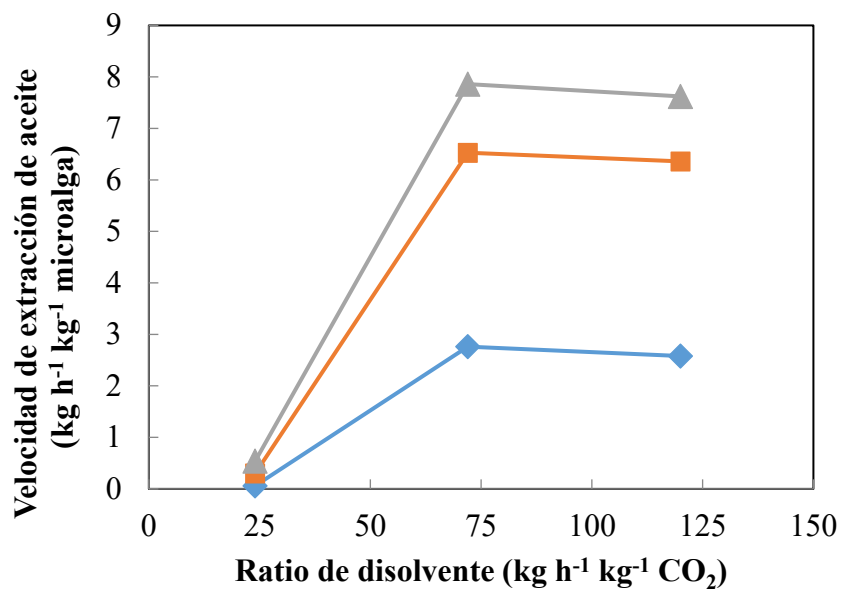
En la extracción de aceite a partir de microalgas se emplearon tres caudales de CO<sub>2</sub> que oscilaron entre 1 g min<sup>-1</sup> y 5 g min<sup>-1</sup>, operando a 30 MPa y 35 °C.

También en este caso, el aumento del caudal se tradujo en un mayor rendimiento de extracción y en tiempos de extracción más cortos, aunque el rendimiento y la velocidad de extracción fueron máximos cuando se trabajó con  $3 \text{ g min}^{-1}$  (Figura 6.10). Estos resultados se confirman en la Figura 6.11; con la ratio de disolvente de  $72 \text{ kg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  de biomasa, que corresponde a  $3 \text{ g min}^{-1}$ , la tasa de extracción fue la más alta en todo momento.

Por su parte, en los ensayos de extracción de aceite lubricante de la superficie de contactos metálicos se investigó si la capa de aceite (los aditivos o fracciones pesadas) podrían eliminarse favoreciendo velocidades de fluidos más altas en el lecho por simple arrastre. Para ello, también se realizaron experimentos con diferentes caudales de  $\text{CO}_2$ , como se muestra en la Figura 6.12. Si el caudal másico era bajo ( $1 \text{ g min}^{-1}$ ), la velocidad de extracción del aceite era máxima. Sin embargo, el rendimiento final de extracción era muy bajo, menos del 80 %. Por el contrario, cuando se trabajó con caudales más altos, la pendiente de las curvas de extracción correspondientes era menor, aunque se alcanzaron rendimientos altos, cerca del 95 %, demostrando que efectivamente a altos caudales, existía un efecto de barrido de la capa adherida a los contactos.



**Figura 6.10.** Curvas de extracción de lípidos de microalga a 30 MPa y 35 °C usando distintos caudales máxicos: 1 g min<sup>-1</sup> (■), 3 g min<sup>-1</sup> (▲), 5 g min<sup>-1</sup> (×).



**Figura 6.11.** Velocidad de extracción de lípidos de microalga para distintos ratios de disolvente a tres momentos: 10 min (◆), 30 min (■), 50 min (▲). Condiciones de operación 30 MPa, 35 °C.

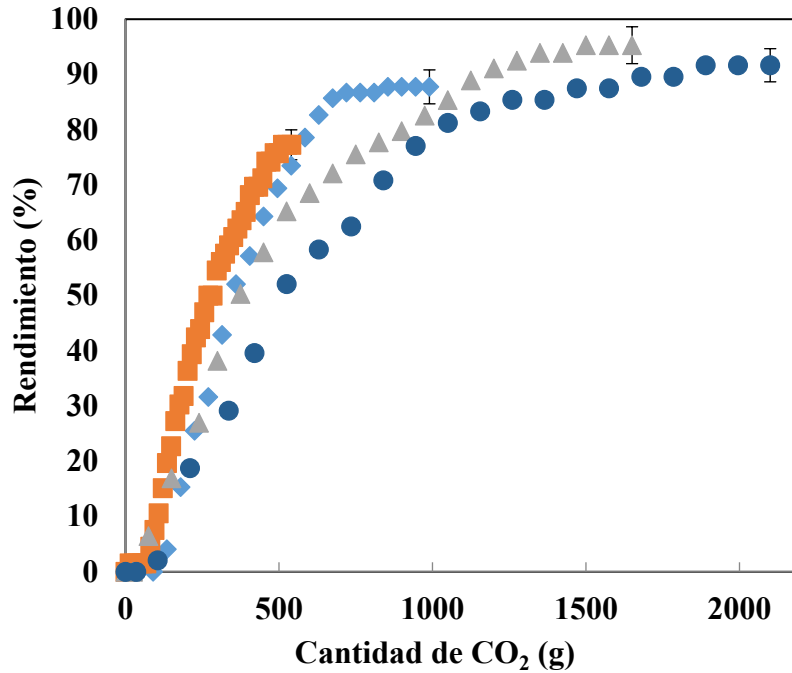


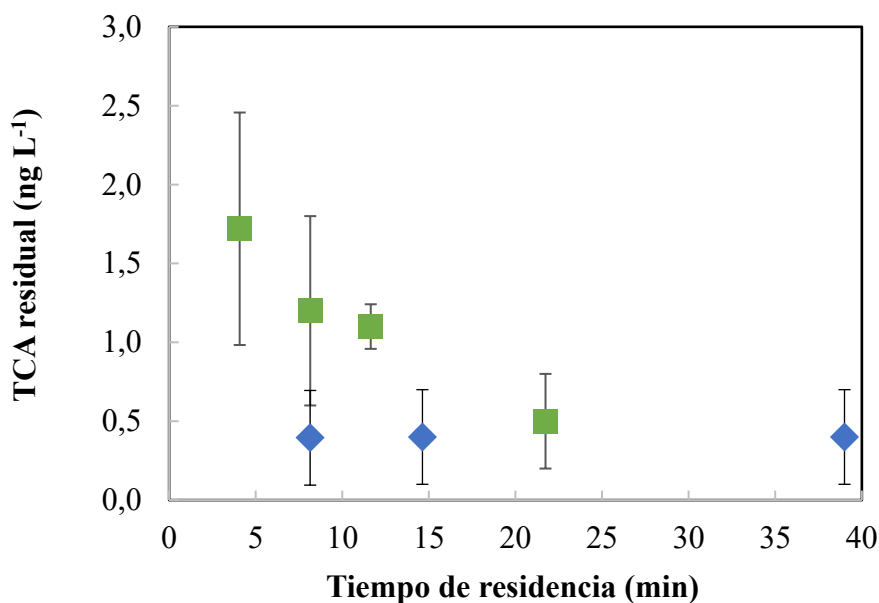
Figura 6.12. Efecto del caudal de CO<sub>2</sub> en la extracción de aceite lubricante a 30 MPa y 37 °C.

■ 1 g·min<sup>-1</sup> ◆ 3 g·min<sup>-1</sup>, ▲ 5 g·min<sup>-1</sup> ● 7 g·min<sup>-1</sup>.

En el caso de la eliminación de TCA del corcho no se pudieron obtener curvas de extracción, pero se pudo investigar el impacto del aumento del caudal en la eficacia de la eliminación a un consumo de CO<sub>2</sub> constante (60 kg kg<sup>-1</sup>). La Figura 6.13 muestra los resultados en términos de tiempo de residencia a expensas de reducir el caudal de disolvente, a dos densidades diferentes. A alta densidad, el contenido de TCA residual objetivo se alcanzó en 8 minutos de tiempo de residencia, correspondiente a un caudal de 108 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> de corcho. Por el contrario, con una baja densidad de CO<sub>2</sub> de 326 kg m<sup>-3</sup>, para lograr una eficacia de extracción satisfactoria, se requirieron más de 22 minutos de tiempo de residencia.

Esto implicaba caudales de disolvente relativamente bajos ( $23 \text{ kg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  de corcho).

Analizando los tres sistemas estudiados se puede ver cómo en las dos aplicaciones donde el sólido estaba disponible, la velocidad y rendimiento de extracción más elevados correspondieron a caudales de  $\text{CO}_2$  altos, en concreto a un caudal de  $0,3 \text{ kg h}^{-1}$  para la extracción de aceite lubricante y  $0,2 \text{ kg h}^{-1}$  para la obtención de lípidos de microalga. Sin embargo, cuando el soluto era difícilmente accesible (TCA en corcho), el caudal óptimo (a densidad de  $326 \text{ kg m}^{-3}$ ) fue bajo  $0,09 \text{ kg h}^{-1}$ . A densidad alta, no se pudo comprobar el impacto del caudal.



**Figura 6.13.** Concentración residual de TCA en gránulos de corcho después de extracciones con distintos tiempos de residencia del  $\text{CO}_2$  en el lecho de corcho. ■  $\rho=326 \text{ kg m}^{-3}$  (70 °C, 11,5 MPa), ♦  $\rho=585 \text{ kg m}^{-3}$  (50 °C, 12 MPa). El caudal de  $\text{CO}_2$  fue 1,5, 3, 4 y  $8 \text{ g min}^{-1}$ . El consumo de  $\text{CO}_2$  fue de  $60 \text{ kg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de corcho.

## 6.6. Consumo de disolvente

La relación entre la cantidad de CO<sub>2</sub> utilizada en la extracción y la cantidad de materia prima es un parámetro fundamental a escala industrial, ya que determina la viabilidad económica del proceso en términos de consumo de materias primas, tiempo de operación y costes de compresión.

La Figura 6.14 muestra el efecto de la relación de masa disolvente-materia prima en la extracción del TCA de los gránulos de corcho con CO<sub>2</sub> a dos densidades diferentes (326 kg m<sup>-3</sup> y 585 kg m<sup>-3</sup>). Con una alta densidad, la eliminación total del TCA se logró en ratios bajos, 43 kg de CO<sub>2</sub> por kg de corcho; al contrario, con una baja densidad (326 kg m<sup>-3</sup>) se requirió un alto consumo de CO<sub>2</sub>, > 80 kg de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de corcho, para reducir el TCA por debajo del límite de detección.

En la Tabla 6.6 se muestra un resumen del consumo de CO<sub>2</sub> para las otras dos materias primas en función del grado de extracción. Está calculado en las condiciones de presión y temperatura más favorables para cada caso. En la segunda columna se indica la cantidad inicial de extracto en la materia prima. Es muy reveladora la cifra pues oscila en varios órdenes de magnitud. Mientras que en el corcho, la contaminación inicial de TCA era de 8,5 10<sup>-4</sup> %, en los contactos metálicos era de 0,017 % y la cantidad de aceite en la microalga extraíble por CO<sub>2</sub> era del 21 %, aproximadamente. Sin embargo, no hubo tanta diferencia en el consumo de CO<sub>2</sub>. Así, para alcanzar un rendimiento de extracción del 100 % hicieron falta 43, 50 y 99 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> materia prima para el corcho, contactos metálicos y microalgas, respectivamente. De nuevo, estos datos se pueden explicar

por el distinto tamaño de las partículas de la materia prima y la diferente localización e interacción del soluto; amén de las mejores condiciones para la extracción que fueron distintas en cada caso.

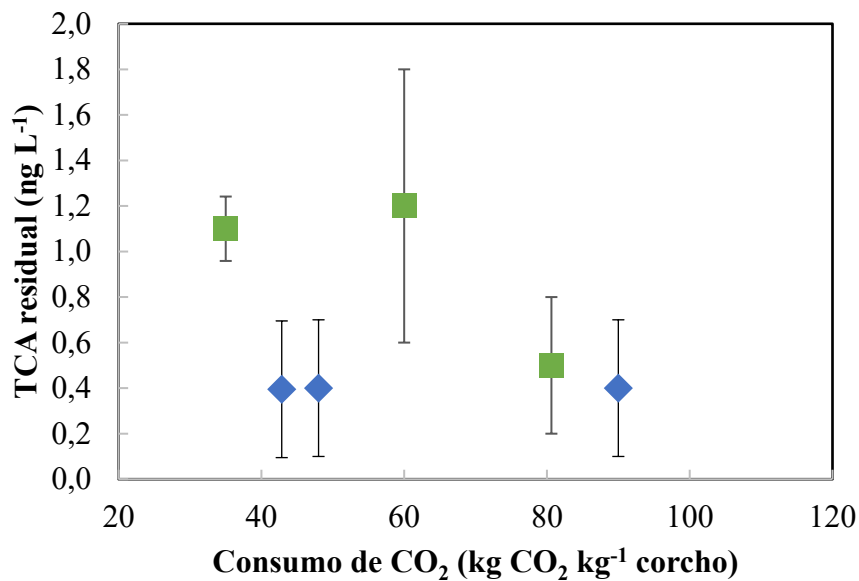
**Tabla 6.6.** Consumo de CO<sub>2</sub> en función de la concentración inicial del extracto en el sólido y de las condiciones de operación que determinan la densidad del CO<sub>2</sub>.

<b>Materia prima</b>	<b>Concentración inicial (%)</b>	<b>Rendimiento de extracción (%)</b>	<b>Densidad de CO<sub>2</sub> (kg m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Consumo de CO<sub>2</sub> (kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> materia prima)</b>
<b>Corcho</b>	8,5·10 <sup>-4</sup>	100*	585	43
		100		50+5 etanol
<b>Contactos metálicos</b>	0,017	95	922	50
		91		40
		80		30
<b>Microalgas</b>	21	100	788	99
		95		78
		91		68
		80		47

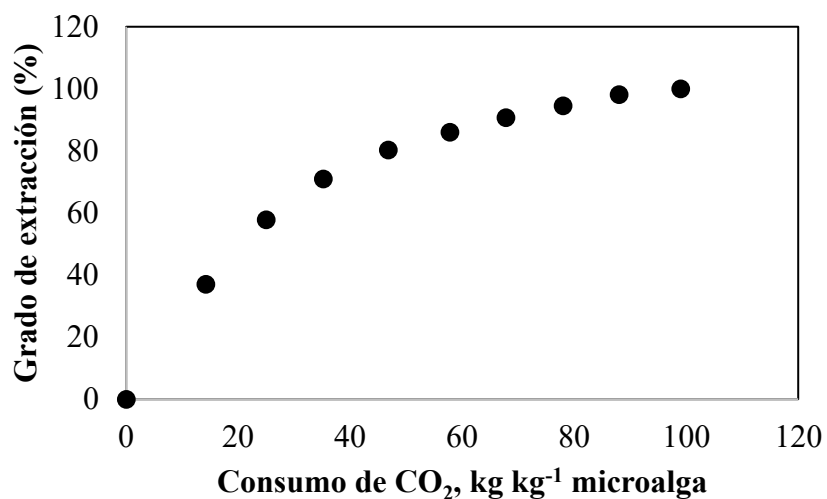
\*por debajo del límite de detección de TCA

Por otro lado, en la extracción de lípidos de microalgas, al contrario que en las otras materias primas, el consumo de CO<sub>2</sub> más adecuado no sería aquel con el que se conseguiría extraer todos los lípidos, sino el que proporcionase mayor grado de extracción a una velocidad elevada para reducir el tiempo de operación y por ende el tamaño de los equipos. En la Figura 6.15 se muestra el grado de extracción respecto al máximo posible (21 %) al caudal más adecuado de 3 g min<sup>-1</sup> (0,18 kg h<sup>-1</sup>) operando a 30 MPa y 70 °C. La velocidad de extracción se curva mucho a un rendimiento de extracción del 91 %, correspondiente a un consumo de CO<sub>2</sub> de 68

kg kg<sup>-1</sup> microalga. Para extraer el 9 % restante, harían falta otros 31 CO<sub>2</sub> kg kg<sup>-1</sup> microalga.



**Figura 6.14.** Efecto de la relación másica CO<sub>2</sub>/corcho en el contenido residual de TCA a distintas densidades: ■  $\rho=326$  kg m<sup>-3</sup> (70 °C, 11,5 MPa), ♦  $\rho=585$  kg m<sup>-3</sup> (50 °C, 12 MPa). El caudal másico de CO<sub>2</sub> fue 4 g min<sup>-1</sup>. El tiempo de extracción se incrementó de 35 a 90 min para aumentar consumo de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.15.** Grado de extracción del aceite respecto del extraíble en función del consumo de CO<sub>2</sub> relativo. Condiciones de operación: 30 MPa, 70 °C.

## **6.7. Cambio de escala**

Como corolario a todo lo descrito y discutido a lo largo de la presente memoria, es importante incidir en la problemática del cambio de escala ya que todos los sistemas estudiados en el desarrollo de este trabajo tienen un notable interés industrial. En esta tesis se eligió estudiar el cambio de escala de la extracción de lípidos de microalga, que es el proceso menos desarrollado de los tres investigados.

Para llevar a cabo el escalado industrial pueden modelarse los resultados experimentales con el fin de obtener una serie de ecuaciones que permitan predecir el comportamiento del proceso a gran escala. También pueden elegirse una serie de parámetros clave que permanecen invariables sea cual sea la escala. En este sentido, las variables intensivas: presión y la temperatura, se mantienen constantes a cualquier tamaño del equipo. En el campo de las variables extensivas, Oliveira [27] afirma que, para mantener la fluidodinámica del sistema y alcanzar resultados equivalentes de eficacia de extracción, debe mantenerse constante la relación geométrica del extractor ( $L/D$ ), el consumo de disolvente y el caudal de disolvente.

### **6.7.1. Definición de las condiciones iniciales.**

Para diseñar el sistema de extracción es necesario definir el tamaño nominal de la planta. Dado que se carece de datos económicos y financieros y que no existen plantas industriales de producción de biodiesel o de ácidos grasos a partir

de microalgas cuyo aceite haya sido obtenido a partir de extracción supercrítica, se buscó en la bibliografía cuál es el tamaño habitual de las plantas que producen biodiésel a partir del aceite de semillas. Aparecen, por un lado, grandes plantas como las que tiene Green Fuel en Extremadura [28], con un tamaño nominal de 78.000 t año<sup>-1</sup>. Por otro lado, la US Energy Information Administration afirma que en el año 2018 hay en todo EEUU 95 instalaciones de producción de biodiésel con una capacidad media de en torno a 67.000 t año<sup>-1</sup> [29].

Sin embargo, se eligió diseñar una instalación más pequeña, para una producción de 10.000 toneladas al año porque se necesitarían a día de hoy grandísimas producciones de microalga, que todavía no están en marcha. De forma similar, en el análisis que hicieron Taberero et al. [30] sobre el diseño de una planta de transesterificación de aceite de microalga eligieron una planta de 10.000 t anuales de capacidad de tratamiento de biodiesel, que con la relación de conversión de aceite a biodiesel arrojó una capacidad de tratamiento de aceite de microalga de 10.880 t año<sup>-1</sup>.

### **6.7.2. Proceso**

La opción más eficaz para llevar a cabo una extracción supercrítica a nivel industrial es la operación a contracorriente simulada en la cual se sitúan dos lechos fijos en serie y el disolvente entra por el más agotado de ambos. En el momento en que el segundo lecho está completamente agotado se conecta otro lecho fresco al final de la línea. De esta manera se consigue mantener la fuerza impulsora

constante para la extracción y la producción continua de aceite. La Figura 6.16 muestra el esquema de la instalación industrial de extracción supercrítica en la que uno de los lechos está siempre en recarga.

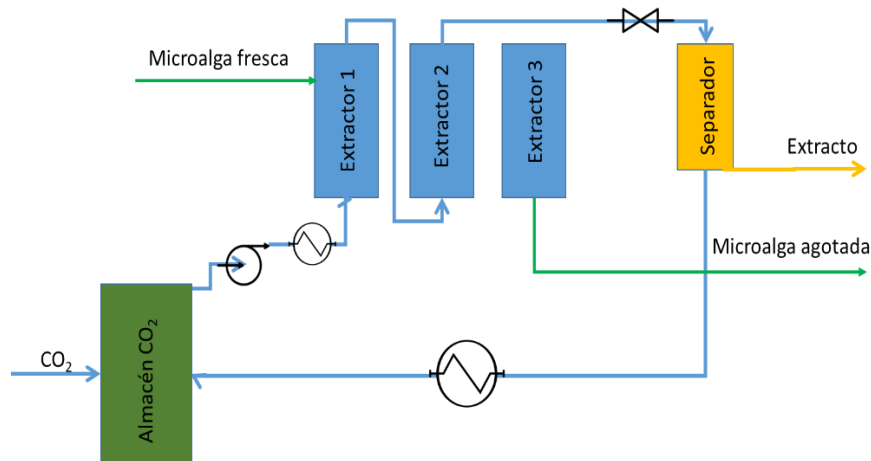


Figura 6.16. Esquema de la instalación industrial para producción en continuo.

### 6.7.3. Modelado

Para conseguir el escalado industrial se escogió el desarrollado por Sovová [31], porque demostró ser eficaz y sencillo en la descripción de los fenómenos de extracción supercrítica de aceites de sólidos molidos. En la extracción de aceite de microalgas, al igual que en semillas molidas, la velocidad de extracción es inicialmente constante y máxima; después de un período de transición, sigue una extracción mucho más lenta. Por lo tanto, el modelo de Sovová se basa en la existencia de dos zonas en las partículas: la primera cerca de la superficie, donde las células que contienen aceite se han abierto por molienda o calentamiento

(pretratamiento) y el aceite es fácilmente accesible, y la segunda región con células intactas dentro de las partículas. Cuando el aceite de las células abiertas se agota, se produce una extracción más lenta de las células intactas, controlada por la difusión a través de paredes celulares de baja permeabilidad.

De esta forma, el modelo tiene en cuenta dos parámetros para explicar los fenómenos de transferencia de materia que son: el coeficiente de transferencia en la fase disolvente y el coeficiente de transferencia en la fase sólida, además del parámetro de carga máxima del aceite en el CO<sub>2</sub>.

Por otro lado, este modelo describe el proceso teniendo en cuenta que el disolvente fluye axialmente, con velocidad superficial  $u$ , a través del lecho fijo de la materia prima en el extractor cilíndrico. El disolvente está libre de soluto a la entrada del extractor, y se consideran constantes la presión y la temperatura. El lecho sólido es homogéneo respecto al tamaño de partícula y a la distribución inicial de soluto. La masa de aceite contenida inicialmente en la fase sólida (microalga),  $O$ , está constituida por la masa de soluto fácilmente accesible,  $P$ , y la masa inaccesible de aceite dentro de las partículas de fase sólida,  $K$ .

$$O = P + K \quad [6.9]$$

La masa de fase sólida sin soluto,  $m_{SI}$ , permanece constante durante la extracción. Las cantidades de soluto están relacionadas con esta cantidad.

El soluto fácilmente accesible, es extraído primero, cruzando la interfase lo suficientemente rápido como para mantener el disolvente saturado en este tramo.

Cuando la concentración de la fase sólida disminuye hasta  $x_k$  la transferencia de materia es retardada por la difusión en la fase sólida. El soluto fácilmente accesible se agota a la entrada de disolvente para el punto en que la cantidad adimensional de  $\text{CO}_2$ ,  $q$ , toma el valor  $q_m$ ; en este momento comienza un período de transición entre la extracción rápida y lenta. El soluto fácilmente accesible es extraído aún en una sección del lecho fijo, mientras que la extracción del soluto que se encuentra en el interior de las partículas tiene lugar en otra sección.

Para la evaluación de los datos experimentales debe expresarse la curva de extracción en términos de cantidad de extracto adimensional,  $e$  y disolvente consumido,  $q$ . De este modo pueden estimarse los coeficientes de transferencia de materia para cada una de las condiciones y características del sólido a extraer disponibles.

El modelo de Sovová se describe con las siguientes ecuaciones:

$$e = q \cdot y_r [1 - \exp(-Z)] \text{ si } q \leq q_m$$

$$e = y_r(q - q_m)\exp(-Z) \text{ si } q_m \leq q \leq q_n \quad [6.9]$$

$$e = x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \exp \left( W \cdot \frac{x_0}{y_r} - 1 \right) \cdot \exp [W \cdot (q - q_m)] \frac{x_k}{x_0} \right\}$$

$$\text{si } q > q_n$$

Donde  $q_m$  es el punto final de la primera etapa de extracción y el comienzo de la segunda y  $q_n$  el final de la segunda y comienzo de la tercera.

$$z_w = \frac{Z \cdot y_r}{W \cdot x_0} \ln \left[ \frac{x_0 \exp \left[ \frac{W \cdot Q_{CO_2} (q - q_m)}{N} \right] - x_k}{x_0 - x_k} \right] \quad [6.10]$$

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y_r} Z \quad [6.11]$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp \left( \frac{W x_0}{y_r} \right)}{x_0} \right] \quad [6.12]$$

Los parámetros  $Z$  y  $W$  son directamente proporcionales a los coeficientes de transferencia externa para las fases fluida y sólida respectivamente:

$$Z = \frac{k_f a_0 \rho}{\left[ \frac{Q_{CO_2}}{m_{SI} (1 - \varepsilon) \rho_s} \right]} = \frac{F m_{SI}}{Q_{CO_2}} \quad [6.13]$$

$$W = \frac{k_s a_0}{\left[ \frac{Q_{CO_2}}{m_{SI}} (1 - \varepsilon) \right]} = k \frac{Z y_r}{x_k} \quad [6.14]$$

Donde  $k_f$  y  $k_s$  son los coeficientes de las fases fluida y sólida respectivamente,  $a_0$  es el área específica,  $\rho_s$  es la densidad del sólido y  $\varepsilon$  es la porosidad del lecho.

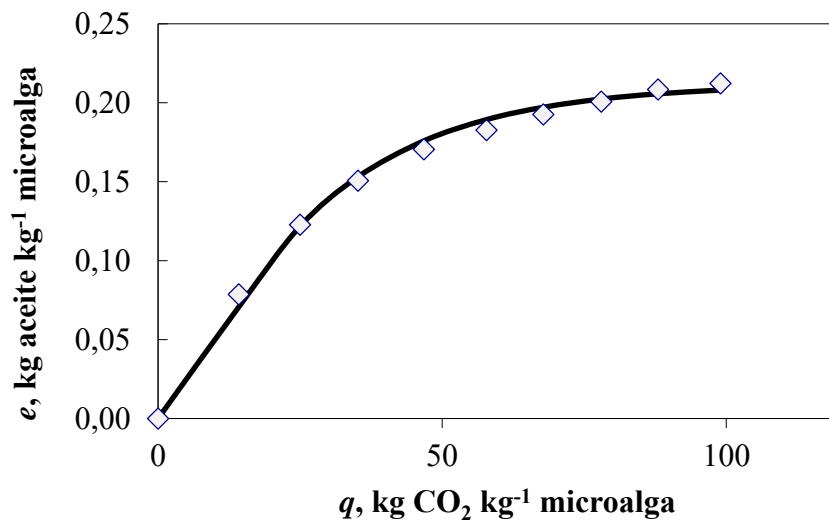
El ajuste se ha realizado mediante la minimización desviación relativa promedio absoluta:

$$AARD (\%) = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{e_{exptal} - e_{modelo}}{e_{exptal}} \quad [6.15]$$

Para el ajuste de las curvas de extracción de los lípidos de microalga, se hicieron dos modificaciones en el modelo. El primero se hizo para dar cuenta de la distinta carga del CO<sub>2</sub> en función del tiempo de residencia en el extractor. Por un lado, el modelo original consideraba  $y_r$  como la solubilidad a cada condición, por tanto, constante. En este caso, se modificó de tal forma que era la carga máxima del CO<sub>2</sub> (máxima pendiente de las curvas, según Tabla 6.4). Por otro lado, y debido a que el rendimiento final de extracción también variaba con las condiciones de operación, también se cambió el parámetro  $x_o$ , que originalmente representaba la concentración total inicial de aceite en las microalgas, por la cantidad máxima que se podía extraer en cada condición.

En la Figura 6.17 se muestra el ajuste mediante este modelo modificado de la curva de extracción experimental obtenida a 30 MPa y 70 °C. La Tabla 6.7

recoge los distintos parámetros calculados a partir de este mismo modelo para las otras condiciones de operación y para los tres caudales de CO<sub>2</sub> explorados.



**Figura 6.17.** Ajuste del modelo de Sovová a los datos experimentales de extracción de aceite de microalga a 30 MPa, 70 °C y un caudal de CO<sub>2</sub> de 3 g min<sup>-1</sup>.

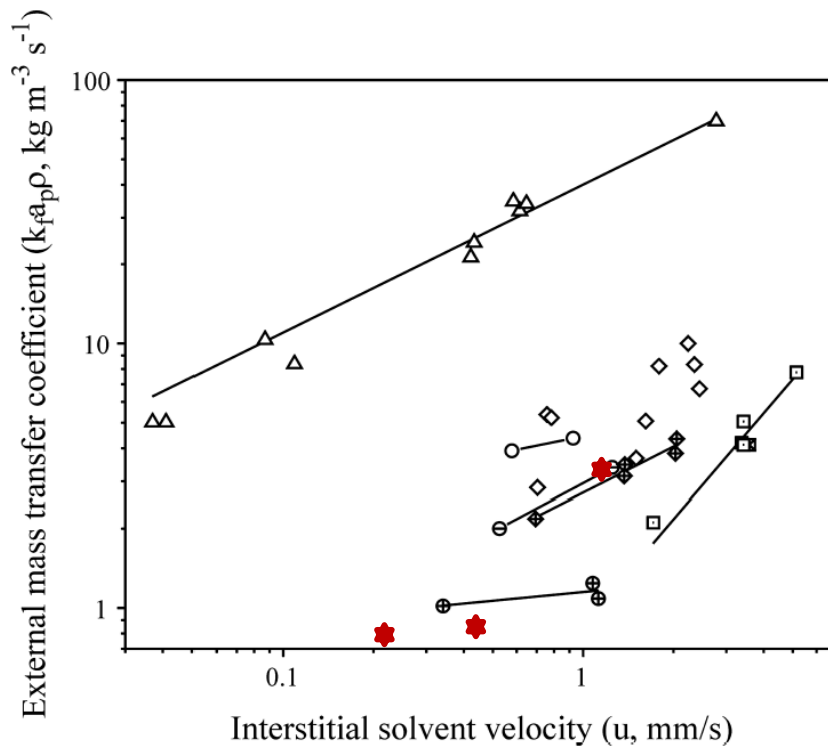
En primer lugar, se observa que al aumentar la temperatura desde 35 a 70 °C, se incrementó en más del doble el coeficiente de transferencia en la fase fluida debido fundamentalmente al incremento en el coeficiente de difusión molecular (ver Tabla 6.4) y la reducción de la densidad del CO<sub>2</sub>. En cualquier caso, es similar a los reportados para la extracción de aceites de otras microalgas [32]. En la Figura 6.18 se comparan con los coeficientes deducidos en la extracción de aceites a partir de distintas semillas resumidos en la revisión de del Valle y de la Fuente [33]. Para la comparación, se eliminó el impacto de las condiciones de operación utilizando un

coeficiente modificado. La modificación realizada fue multiplicar el valor obtenido de  $k_f a_0$  por la densidad del  $\text{CO}_2$  ( $\rho = 929 \text{ kg CO}_2 \text{ m}^{-3}$ ) en las condiciones de operación en las que se estudiaron las diferentes velocidades de paso,  $u$  ( $\text{mm s}^{-1}$ ). Como se observa, el orden de magnitud también coincide para los reportados en la extracción supercrítica de aceites de semillas molidas, sobre todo, a la mayor velocidad de paso explorada ( $1,1 \text{ mm s}^{-1}$ ).

**Tabla 6.7.** Coeficientes de transferencia de materia ajustados a partir del modelo de Sovová en la extracción de lípidos de microalga *C. prothotecoides*.  $\rho_s = 1100 \text{ kg m}^{-3}$ ,  $\varepsilon = 0,4$ . Presión, 30 MPa. El parámetro AADR muestra la desviación relativa promedio absoluta en porcentaje.

T (°C)	Caudal $\text{CO}_2$ ( $\text{g min}^{-1}$ )	Densidad ( $\text{kg m}^{-3}$ )	$x_0$ ( $\text{kg kg}^{-1}$ )	$u$ ( $\text{mm s}^{-1}$ )	$k_f a_0$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$ksa_0$ ( $\text{s}^{-1}$ )	AADR (%)	
35	1	1,7	929	0,06	0,23	2,4E-04	2,0E-04	8,9
	3	5,0	929	0,13	0,69	5,3E-04	3,8E-04	0,7
	5	8,3	929	0,13	1,14	3,6E-03	1,3E-04	0,2
35		5,0	929	0,13	0,69	5,3E-04	3,8E-04	0,7
55	3	5,0	850	0,15	0,75	1,0E-03	2,0E-04	1,8
70		5,0	788	0,21	0,81	1,3E-03	8,5E-05	-0,3

Lógicamente, el aumento del caudal incrementó la velocidad de paso y el Re, así que la resistencia a la transferencia en la fase fluida se redujo, como se demuestra en el aumento de los coeficientes en 1,5 veces al pasar de 1 a 5  $\text{g min}^{-1}$ . Similares resultados se obtuvieron en la estimación de los coeficientes mostrados en la Tabla 6.5.



**Figura 6.18.** Representación del parámetro de transferencia de materia en fase fluida respecto a la velocidad lineal. Los datos representados con  $\star$  son de este trabajo y el resto fueron recopilados por del Valle y de la Fuente [33].

Por otro lado, en todas las condiciones, el coeficiente de transferencia de materia en la fase fluida era al menos de un orden de magnitud mayor que el correspondiente al sólido, por lo que la velocidad de extracción estuvo claramente más limitada por la difusión dentro de la partícula.

Sin embargo, los coeficientes de transferencia en el sólido resultaron del orden de  $10^{-4}$ , que es un orden de magnitud mayor que los reportados para otras microalgas [32, 34]. La razón podría estribar en el tamaño de partícula promedio, que en este trabajo era mucho menor. Mientras que el diámetro de partícula

mayoritario era de 0,1 mm, en los trabajos realizados en otras microalgas, el tamaño de partícula oscilaba entre 0,5 y 1 mm. Un menor diámetro reduce los caminos difusionales y aumenta el área superficial, reduciendo así la resistencia a la transferencia interna.

Los coeficientes de transferencia interna fueron sensiblemente menores a medida que aumentó la temperatura, hecho que inicialmente era contrario a lo esperado. Mismos resultados se obtuvieron en la extracción supercrítica de aceite de *Scenedesmus obliquus* en el intervalo entre 55 y 65 °C [32]. Ello podría ser debido a otros mecanismos distintos a la transferencia a través del sólido. Por un lado, se ha reportado la posibilidad de que la porosidad del sólido se reduzca con la temperatura favoreciendo migraciones superficiales no tenidas en cuenta en el modelo [35]; aunque podría ser atribuido a la menor fuerza impulsora que hay para la transferencia interna a medida que aumenta la temperatura, puesto que la cantidad de aceite remanente en las células rotas es mucho menor. Este hecho se demuestra en el parámetro  $x_o$  (cantidad máxima extraíble) que es casi el doble a 70 °C que a 35 °C, lo que reduce la concentración de aceite remanente en el sólido.

#### 6.7.4. Balance de materia

Un año industrial tiene 8.000 horas útiles por lo que habría que producir 1,25 toneladas de aceite cada hora. Teniendo en cuenta que el rendimiento máximo de la extracción está ligeramente por encima del 21 %, pero que solo se extrae el 90 % del máximo, se asume que se necesitan procesar 6,6 toneladas de microalga

secada y molida cada hora. La densidad global de la microalga seca se estima en torno a  $400 \text{ kg m}^{-3}$ .

Multiplicando la ratio optimizada en el laboratorio ( $72 \text{ kg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  microalga) por la cantidad de biomasa a procesar, se llega a una necesidad de fluido supercrítico de en torno a 450 toneladas de  $\text{CO}_2$  por hora.

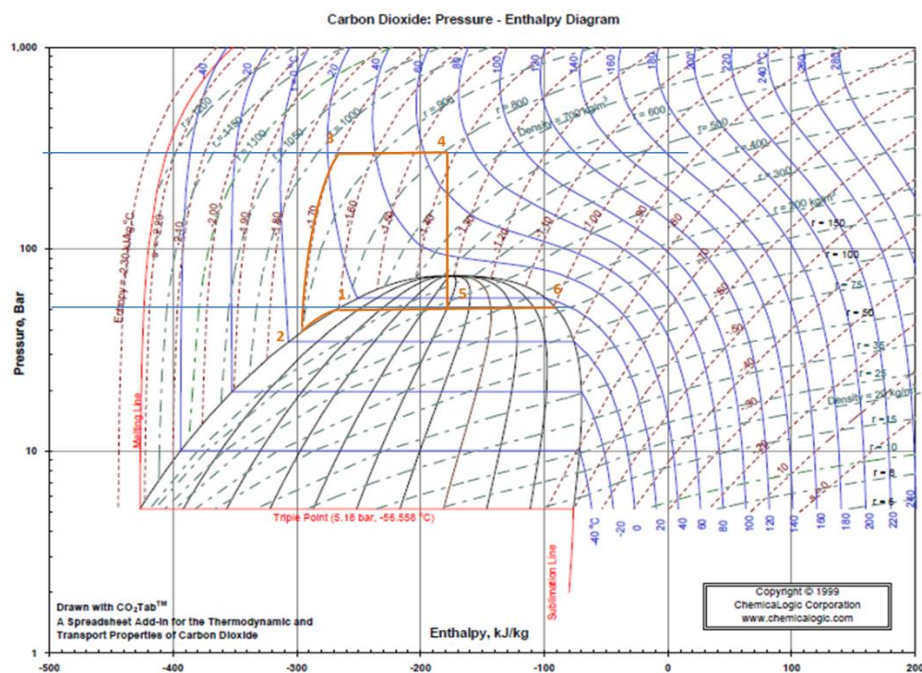
#### **6.7.5. Balance de energía**

Para conocer el balance entálpico del proceso es muy útil emplear el diagrama de Mollier del  $\text{CO}_2$  (presión-entalpía) con el fin comprobar sobre el mismo cuáles son las necesidades energéticas del sistema y, a partir de ahí, conocer las demandas de calefacción, enfriamiento y bombeo del mismo. La Figura 6.19 muestra dicho diagrama para el  $\text{CO}_2$  puro considerando que la presencia del aceite disuelto no modifica sustancialmente el mismo.

En él se han representado las condiciones de extracción a 30 MPa y  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Este punto está representado por una estrella. Tras la extracción vendrá una expansión isoentálpica, debido a que se produce en una válvula de estrangulamiento en el separador flash. A pesar de que el  $\text{CO}_2$  es inocuo en pequeñas cantidades y es bastante barato, en el diseño del proceso el  $\text{CO}_2$  se recircula porque el elevado consumo haría inviable económicamente el proceso a escala industrial. Para ello, se reduce la presión hasta 5 MPa para asegurar la total separación del aceite, pero no se reduce hasta presión atmosférica porque no

aportaría valor a la separación y encarecería los posteriores costes de recompresión.

En este momento el CO<sub>2</sub> estaría en la región de equilibrio líquido-vapor. La fracción vapor se condensaría y la corriente líquida se subenfriaría hasta unos - 5 °C. Para volver a alcanzar las condiciones de operación, el fluido se comprimiría mediante una bomba, ya que la compresión es isentrópica, hasta llegar a 30 MPa. Posteriormente el CO<sub>2</sub> se calentaría hasta los 70 °C de temperatura de operación.



**Figura 6.19.** Diagrama de Mollier para el CO<sub>2</sub>. En este diagrama se muestra el ciclo del CO<sub>2</sub> propuesto para la extracción supercrítica de aceite de microalga.

Por lo tanto, el ciclo del disolvente parte del punto (1) representado en el diagrama de Mollier y se subenfía hasta  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar problemas de cavitación en las bombas (2). Posteriormente el fluido se comprime isentrópicamente hasta la presión de extracción (3) Más tarde, el fluido se calienta hasta alcanzar la temperatura de operación (4). Después de la extracción, el fluido se expande en una válvula de estrangulamiento de forma isentálpica hasta alcanzar la línea de equilibrio líquido-vapor (5-6) a 5 MPa. Por último, todo el  $\text{CO}_2$  vapor se condensa hasta el punto (1), cerrándose así el ciclo.

Existen otras alternativas para cerrar el ciclo de disolvente, ya que se puede operar en modo bombeo (líquido) o en modo compresor (gas) pero para la operación a más de 30 MPa, el uso de bombas es más barato que los compresores y el flujo másico se controla mejor [1].

Además, es necesario tener en cuenta en la instalación industrial las instalaciones para acondicionar la materia prima, tal y como llega a la planta, para su uso en el proceso.

Por su parte, el  $\text{CO}_2$  que se pierde en cada ciclo debe ser repuesto al sistema. Se puede estimar pues es lo que queda en cada extractor cuando se abre. Normalmente menos de 1 % de lo que hay en circulación y consistiría en la fracción de  $\text{CO}_2$  que ocupa los poros del lecho y el  $\text{CO}_2$  disuelto en el aceite [36].

La energía calorífica necesaria se puede calcular a partir del diagrama. Por otro lado, para condensar todo el  $\text{CO}_2$  vapor producido tras la expansión es necesario extraer de la corriente  $180\text{ kJ kg}^{-1}$ . A partir de este diagrama puede

observarse cómo el bombeo calienta el CO<sub>2</sub> por lo que, una vez alcanzada la presión de operación, solo es necesario aportar con un cambiador de calor unos 80 kJ kg<sup>-1</sup>.

Aplicando la regla de la palanca se puede determinar qué cantidad de CO<sub>2</sub> se encuentra en fase vapor y en fase líquida. De estas medidas, resulta que coexisten en equilibrio un 16 % de vapor y un 84 % de líquido respecto al CO<sub>2</sub> total.

#### **6.7.6. Ingeniería de proceso**

En esta sección se procede a establecer los parámetros de diseño más significativos de cada uno de los equipos empleados en este proceso industrial.

##### Diseño de los extractores

La operación en los extractores es por cargas en periodos establecidos, por lo que el diseño dependerá de la cantidad de materia prima que quiera cargarse, de la densidad del lecho que se forme, del número de extractores que quieran emplearse y del caudal de paso de CO<sub>2</sub>. Este último parámetro configura definitivamente el tamaño de los equipos pues hace variar significativamente el tiempo de cada ciclo y consiguientemente la carga de microalga.

Se ha decidido emplear nueve extractores de idéntico tamaño. El objetivo es emplear tres líneas de extracción para que los equipos no sean demasiado grandes y los espesores de los mismos disparen el precio de los equipos. De esta manera se dispone en cada línea dos extractores en serie mientras el tercero se mantiene en proceso de descarga de la microalga consumida y carga de la materia prima fresca. Al operar con dos extractores en serie se posibilita sustituir el más agotado por el que ya ha sido recargado y de esta manera maximizar la eficacia utilizando el menor número de equipos.

Siempre se opera simulando operación en contracorriente, es decir, que el disolvente entre por el fondo del lecho fijo más gastado, pasando posteriormente al lecho fijo más fresco.

Esta opción tiene la ventaja de mantener la fuerza impulsora (diferencia entre capacidad de solvatación del CO<sub>2</sub> y cantidad de aceite disponible) constante. En este sentido, se coloca dos extractores en serie y uno más en reserva, cada uno de ellos deberá procesar 8 m<sup>3</sup> de microalga cada hora. Hay que hacer notar que el extractor debe tener un volumen libre de en torno a un 20 % para evitar problemas de sobrepresiones en puntos concretos del lecho, así como para evitar que éste se compacte aumentando la pérdida de carga.

La Tabla 6.8 muestra los parámetros de diseño de los 9 extractores empleados obtenidos, teniendo en cuenta que se trata de lechos fijos verticales cilíndricos. A partir del dato de la cantidad de biomasa que debe procesarse cada hora, así como del tiempo por ciclo que se necesita a partir de la definición de la ratio de CO<sub>2</sub>, se sabe la cantidad de biomasa por ciclo. Conociendo la densidad del

lecho se conoce el volumen del mismo, asumiendo que el extractor debe estar sobredimensionado un 20 %.

El tiempo de procesado por cada extractor es 1 h para recuperar el 90 % del aceite si se usa el caudal de  $72 \text{ kg h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  biomasa. Pero hay que sumar aproximadamente 0,5 h cada cambio de entrada de  $\text{CO}_2$ . En total para agotar los tres extractores por ciclo harían falta 3 h de extracción + 1 h de carga y descarga. Por tanto, cada ciclo de producción dura 4 h. Dado que hay tres conjuntos de extractores operando en paralelo y si se opera 8.000 h año, entonces habría que hacer 1.000 ciclos en cada conjunto para cumplir con la producción. De esta forma, se obtiene que cada extractor debe tener un volumen de  $16 \text{ m}^3$  aproximadamente, como se muestra en la Tabla 6.8.

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot L \quad [6.16]$$

$$\frac{L}{D} = 8 \quad [6.17]$$

**Tabla 6.8.** Parámetros de diseño de los extractores.

$V$	$V_{\text{diseño}}$	$D$	$H$
( $\text{m}^3$ )	( $\text{m}^3$ )	(m)	(m)
13,8	16,6	1,38	11,07

Diseño del separador

El separador es un depósito vertical donde se lleva a cabo una separación flash mediante una reducción brusca de la presión. Después de la válvula de despresurización, el CO<sub>2</sub> deja de estar en condiciones supercríticas y por lo tanto disminuye drásticamente su poder de solvatación. En este punto se generan dos corrientes, por un lado, una corriente líquida que contiene dos fases parcialmente miscibles de CO<sub>2</sub> y de aceite y por otro lado, una gaseosa que contiene principalmente CO<sub>2</sub> aunque pueda llevar restos de aceite. Para evitar este fenómeno se debe colocar en la parte superior del depósito un desnieblador que retiene las pequeñas gotas que puedan ser arrastradas. A la hora de diseñar el equipo se considera un factor de sobredimensionamiento del 20 % para tener en cuenta dicho desnieblador, así como una serie de deflectores dispuestos para reducir la velocidad del CO<sub>2</sub>. El diseño de este equipo es sencillo, porque ni el CO<sub>2</sub> es muy soluble en los aceites ni estos lo son en CO<sub>2</sub> a baja presión. El separador puede disponerse en horizontal o vertical y el fluido debe tener un tiempo de residencia de entre 80 y 200 s [37]. En este trabajo se han considerado 100 s. Además del tiempo de residencia hay que tener en cuenta la relación longitud-diámetro del depósito, esta tiene que ser entre 3 y 5 [37]. En este caso se ha elegido una L/D de 4. La Tabla 6.9 muestra los parámetros de diseño del separador.

**Tabla 6.9.** Parámetros de diseño del separador

<i>V</i>	<i>D</i>	<i>L</i>
(m <sup>3</sup> )	(m)	(m)
0,12	0,35	1,35

Diseño de los tanques de almacenamiento de CO<sub>2</sub>.

Se ha diseñado dos tanques para almacenar temporalmente el CO<sub>2</sub>. Se sitúan a la salida de la unidad de separación y sirven para recuperar la fase vapor que sale del separador. A estos equipos se le añade CO<sub>2</sub> fresco para reponer las pérdidas ocasionadas en las aperturas de los extractores o en otras pequeñas fugas del sistema.

Para diseñar el equipo se ha tenido en cuenta que el CO<sub>2</sub> que en cada momento está en circulación puede calcularse groseramente como la suma del CO<sub>2</sub> en los extractores más la del separador, despreciando por tanto el fluido que circula por las tuberías o los cambiadores de calor. Teniendo en cuenta que cada extractor tiene un volumen de unos 16 m<sup>3</sup> y que la porosidad del lecho es del 40 %, los seis extractores en funcionamiento contienen, en cada momento de la operación 96 m<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub>, que dada su densidad (787 kg m<sup>-3</sup>) supone una cantidad de 75 toneladas. En caso de parada de seguridad es posible que CO<sub>2</sub> no pueda licuarse se estima que se necesita almacenar la mitad del CO<sub>2</sub> contenido en los extractores. Esto supone, en condiciones de almacenamiento ( $\rho=125 \text{ kg m}^{-3}$ ), un volumen de 302 m<sup>3</sup>, que se

divide en dos tanques en paralelo de 101 m<sup>3</sup>. La Tabla 6.10 recoge los parámetros de diseño de los depósitos.

**Tabla 6.10.** Parámetros de diseño de los tanques de almacenamiento de CO<sub>2</sub>

<i>V</i>	<i>D</i>	<i>L</i>
(m <sup>3</sup> )	(m)	(m)
101	3,2	12,7

#### Diseño mecánico de equipos. Determinación del espesor

En primer lugar, el material que se ha elegido para todas las tuberías y equipos del proceso es acero inoxidable SS 316 porque sus características mecánicas soportan perfectamente las condiciones de operación del proceso y las relativas condiciones moderadas del proceso.

Cada equipo o tubería tendrá un espesor nominal en función de la presión y de la temperatura que soporten sus paredes, así los extractores trabajan a 30 MPa

Para los cálculos de los espesores se ha empleado el código ASME Sección VII División 1 para recipientes a presión y el código ASME B31 para tuberías de proceso. El espesor de los cuerpos cilíndricos se calcula en base a la siguiente ecuación, donde  $t$  es el espesor en pulgadas,  $P$  es la presión de diseño en psi,  $R$  es el radio interno en pulgadas,  $E$  es la eficacia de la soldadura en tanto por 1 y  $S$  es el esfuerzo máximo admisible en psi.

$$t = \frac{P \cdot R}{S \cdot E - 0,6 \cdot P} \quad [6.18]$$

A partir de esta exigencia normativa, la presión de diseño del extractor es de 33 MPa y la del separador 6,6 MPa. El esfuerzo máximo admisible depende del tipo de material con que están contruidos los equipos, así como de la temperatura de operación. El código ASME (Sección VII División 1) recoge que para un acero inoxidable 316 y para una temperatura de hasta 200 °F (93 °C) que el esfuerzo máximo admisible es de 16100 psi, equivalente a unos 111 MPa.

La eficacia de la soldadura se va a considerar 1 porque por razones de seguridad, ya que se trata de elementos a presión, se va a radiografiar el 100% de las soldaduras.

**Tabla 6.11.** Espesores de los equipos.

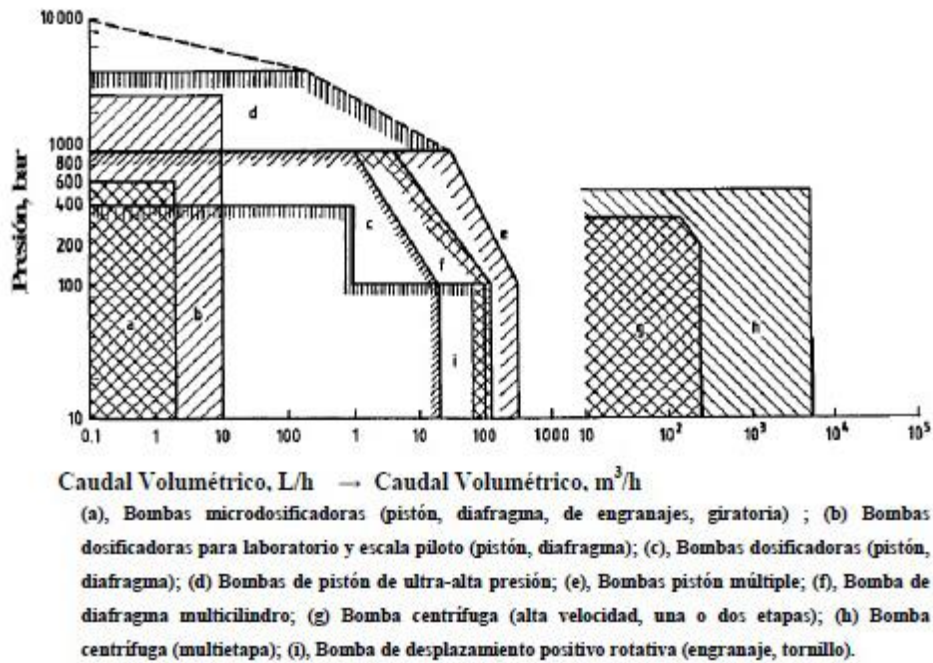
<b>Equipo</b>	<b>Espesor calculado (Pulgada)</b>	<b>Espesor fabricación (Pulgada)</b>	<b>Espesor (mm)</b>
Extractores	8,53	9	228,6
Separador	0,41	7/16	11,1
Tanques	3,29	3 ½	88,9

Diseño de equipos de bombeo

Dado que se debe operar en modo bombeo, tal y como se ha comprobado en el diagrama de Mollier (ver Figura 6.19), es necesario elegir qué tipo de bomba es mejor para trabajar en las condiciones de presión y caudal que se diseña esta instalación. Para ello es muy interesante el diagrama que se ofrece en la monografía editada por Bertuccio y Vetter, 2001 [5], mostrado en la Figura 6.20.

Por lo tanto, dado que el caudal de CO<sub>2</sub> a impulsar, sobre todo en las condiciones de almacenamiento es muy alto y que el bombeo es uno de los puntos más críticos del sistema se ha decidido diseñar la instalación con tres bombas que funcionan en paralelo, gestionando la mitad del caudal y una más, igual que las anteriores, manteniéndose en reserva. Operando con la ratio de CO<sub>2</sub> descrita con anterioridad y dadas las condiciones de salida del intercambiador de calor ( $\rho = 966 \text{ kg m}^{-3}$ ) el caudal a procesar es de  $459 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ . Por lo tanto, el caudal de operación de cada una de las bombas diseñadas es de  $153 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ . Por su parte, la bomba tiene que aumentar la presión del CO<sub>2</sub> hasta la presión de extracción de 30 MPa.

Entonces, teniendo en cuenta tanto la norma API-610 como la monografía de Bertuccio y Vetter [5], la bomba más indicada para este proceso es una bomba centrífuga multietapa, representada en la Figura 6.19 por la letra h. Se supone una eficacia típica del 80 %.



**Figura 6.20** Instrucciones de selección de tipo de bomba en función de la presión y el caudal de operación [5].

En la Tabla 6.12 se muestran los parámetros necesarios para su diseño y las siguientes ecuaciones describen los pasos para llegar a dichos parámetros.

$$H = \frac{P_D - P_A}{\rho \cdot g}; W = H \cdot g \quad [6.19]$$

$$P_{teórica} = W \cdot Q \cdot \rho \quad [6.20]$$

$$P_{accionamiento} = \frac{P_{teórica}}{\eta} \quad [6.21]$$

Tabla 6.12. Parámetros de diseño de las bombas.

Parámetro	Valor
$\rho$ (kg m <sup>-3</sup> )	751-994
T operación °C	-5
P admisión (MPa)	5
P descarga (MPa)	30
Q (m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )	2,55
H (m)	2565
W (J kg <sup>-1</sup> )	25167
P teórica (W)	6,2 10 <sup>7</sup>
P accionamiento (W)	7,7 10 <sup>7</sup>
Tipo de bomba	Centrifuga multietapa

### Diseño de los cambiadores de calor

Se deben diseñar dos cambiadores de calor. Uno para condensar la fracción de vapor y enfriar todo el CO<sub>2</sub> hasta condiciones de bombeo y el otro para llevar el CO<sub>2</sub> bombeado hasta la temperatura de operación. El principal parámetro de diseño de un cambiador o intercambiador de calor es el área de intercambio de energía y para ello es necesario conocer entre qué fluidos se transmite el calor, mediante qué material y por último el calor intercambiado. Las siguientes ecuaciones describen los pasos necesarios para obtener el área de intercambio igualándolas entre sí. Donde  $m$  es el caudal másico,  $c_p$  es el calor específico,  $T_1$  y  $T_2$  las temperaturas de entrada y salida del fluido a calentar o enfriar,  $U$  el coeficiente global de transmisión de calor,  $A$  el área de intercambio y  $\Delta T$ , el

incremento de temperatura. Este  $\Delta T$  se refiere a la diferencia entre la temperatura del  $\text{CO}_2$  y la temperatura del fluido calefactor o refrigerante. A mayor amplitud del rango térmico, menor será el área de intercambio.

$$Q = m \cdot c_p \cdot (T_2 - T_1) \quad [6.22]$$

$$Q = U \cdot A \cdot \Delta T \quad [6.23]$$

El calor puesto en juego se obtiene a partir de la Figura 6.18 y toma el valor de 110 kJ por cada kg de  $\text{CO}_2$  empleado en la refrigeración y de 80 kJ  $\text{kg}^{-1}$  en la calefacción.

El parámetro  $U$  depende del material de contacto entre las fases que intercambian calor, en este caso acero inoxidable, así como de las características de los distintos fluidos y de la geometría del equipo. En este caso se propone el diseño de un cambiador de calor tubos concéntricos en el que el  $\text{CO}_2$  va por dentro de los tubos y el agua por el exterior, ya que de esta manera el espesor de fabricación de los tubos sería menor. El valor de  $U$  se supone  $500 \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$ . [5]

El fluido con el que se intercambia el calor puede ser, por un lado vapor de agua a baja presión ( $134 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y, para refrigerar, fluido refrigerante a  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ . La Tabla 6.13 muestra los parámetros de diseño de los distintos cambiadores de calor empleados.

**Tabla 6.13.** Parámetros de diseño del intercambiador de calor.

Equipo	Servicio	Calor intercambiado (MJ h <sup>-1</sup> )	$\Delta T$ (°C)	Área (m <sup>2</sup> )
Condensador	Refrigeración	49,5	20	4950
Cambiador de calor	Calefacción	36	45	1600

### 6.7.7. Análisis de costes

El capital que debe invertirse en una planta industrial está compuesto por el capital inmovilizado y el capital circulante. El primero se refiere a los equipos y la infraestructura de la planta mientras que el circulante se destina a la producción, pero cambia constantemente de forma. Este capital debe estimarse en función del inmovilizado.

La estimación del coste de los equipos se ha hecho a través de la aplicación web de la editorial Mc Graw Hill [38] y para la actualización de los valores se ha empleado la relación del *Índice de Coste de Plantas de Ingeniería Química* que publica la revista *Chemical Engeneering*, su valor para 2002 fue 395,6 y para 2017 es 567 [39]. Además, se ha realizado la conversión dólar euro con una relación de 1 \$ = 0,84 €.

La Tabla 6.14 muestra el coste estimado de los equipos y su actualización al valor real en 2017.

**Tabla 6.14.** Coste de instalación de equipos.

<b>Equipo</b>	<b>Precio unitario en EEUU (2012) (\$)</b>	<b>Precio unitario en EEUU (2018) (€)</b>	<b>Nº unidades</b>	<b>Coste total (€)</b>
Extractores	1.539.569	1.899.360	9	17.094.236
Separador	11.629	14.347	1	14.347
Tanque	164.846	203.370	2	406.700
Bombas	96.319	118.828	6	712.970
Cambiador de calor	43.167	53.255	1	53.255
Condensador	43.167	53.255	1	53.255
				<b><u>18.334.803</u></b>

### **Estimación de la inversión**

Mediante el procedimiento de los porcentajes [40] se ha estimado el coste del resto de partidas del inmovilizado de la planta, así como otros costes indirectos.

La Tabla 6.15 ofrece un desglose de las distintas partidas estimadas. Como se puede comprobar en dicha tabla, la inversión necesaria para poner en marcha una planta de extracción supercrítica de aceite a partir de microalga supera los 95 M€, de los que unos 66 M€ corresponden a los costes directos, 26 M€ corresponden a los indirectos y 2,7 M€ es el capital necesario para adquirir las mercaderías antes de arrancar la operación.

Tabla 6.15. Determinación de la inversión mediante el método de porcentajes

Concepto	Porcentaje	€
Equipos	100	18.334.802
Instalación	47	8.617.357
Instrumentación y control	36	6.600.529
Tuberías	68	12.467.666
Instalación eléctrica	11	2.016.828
Edificios	18	3.300.264
Terrenos	10	1.833.480
Instalación de servicios	70	12.834.362
<b>TOTAL COSTES DIRECTOS</b>		<b>66.005.288</b>
Ingeniería y supervisión	33	6.050.485
Costes de construcción	41	7.517.269
Costes legales	4	733.392
Costes de contratista	22	4.033.657
Contingencias	44	8.067.313
<b>TOTAL COSTES INDIRECTOS</b>		<b>26.402.115</b>
<b>CAPITAL CIRCULANTE</b>	<b>15</b>	<b>2.750.220</b>
<b>INVERSIÓN (CD+CI+CC)</b>		<b>95.157.624</b>

○ **Estimación de los costes de producción: Costes directos**

Mano de obra

En bibliografía se recogen datos de la mano de obra (hombre-hora) por día y turno del proceso en función de la capacidad de la planta ( $10.000 \text{ t año}^{-1} = 27.000 \text{ kg día}^{-1}$ ), tal como se muestra en la Figura 6.21. Se ha considerado la línea A al tener 9 extractores que operan en *batch* simulando flujo a contracorriente

Dadas las consideraciones anteriores, a la luz de la Figura 6.21 se estima son necesarios 20 hombres-hora  $\text{día}^{-1}$  en la planta de extracción de aceite a partir de microalgas. El Instituto Nacional de Estadística español estima que el salario medio de un empleado de la industria, construcción y servicios es de 25.992,8 €

año<sup>-1</sup>. [42] Considerando 1800 horas de trabajo al año este salario es de 14,4 € h<sup>-1</sup>. Para 8.000 horas de producción al año y con una etapa en la producción el coste de mano de obra es **105.120 € año<sup>-1</sup>**.

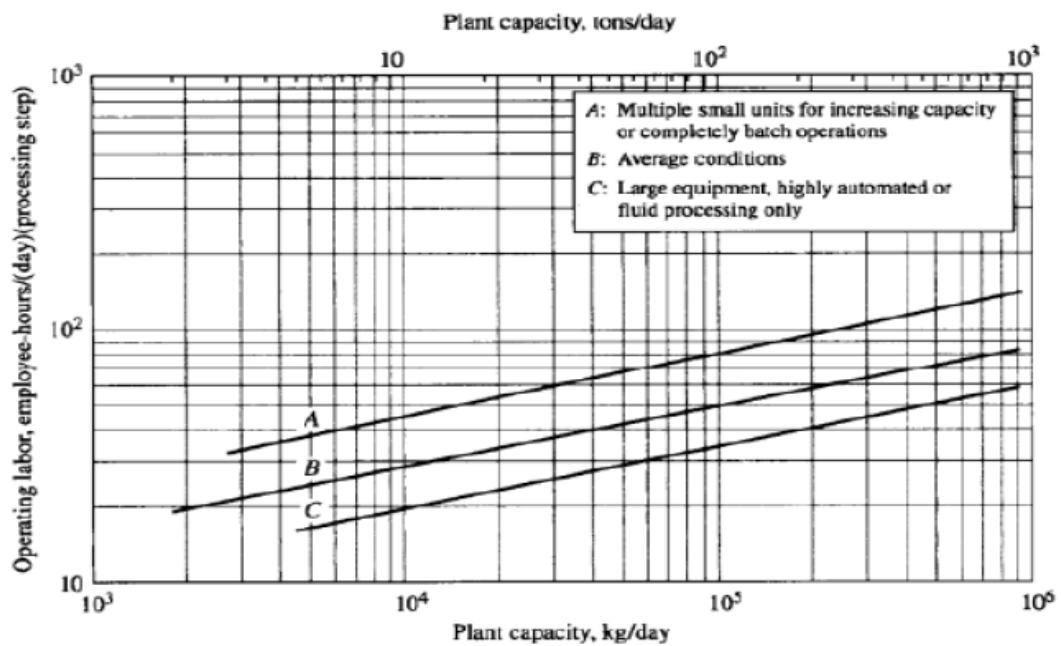


Figura 6.21. Hombre-hora por turno y día en plantas químicas [40].

Materia prima: microalgas

La producción de microalgas está enormemente influenciada por el tipo de nutrición que tienen las algas (autótrofa o heterótrofa), por el tipo de biorreactor utilizado y sobre todo por el tamaño de la planta de producción. En este sentido, el trabajo de Ación et al. [43] analizó dos escenarios para producir microalga de forma autótrofa concluyendo que para plantas que producían 3,8 t año<sup>-1</sup> el coste era de 69 € kg<sup>-1</sup> y para plantas que produjeran 200 t año<sup>-1</sup> el coste era de 12,6 € kg<sup>-1</sup>. Además, estos investigadores ahondaron en las causas del elevado coste y

concluyeron que, mejorando el diseño de los equipos, disminuyendo la mano de obra y aumentando la escala de la planta se podía llegar a un coste mínimo de 1,8 € kg<sup>-1</sup>. En línea con este equipo investigador, Slade y Bauen [44] afirmaron que el coste de producción de microalgas osciló entre 1,6 y 1,8 € kg<sup>-1</sup>. Consecuentemente, en este trabajo se ha tomado como valor de referencia para el coste de producción de microalgas 1,8 € kg<sup>-1</sup>. Consecuentemente, si se necesita una producción de aproximadamente 52.600 toneladas de microalgas anualmente para conseguir extraer 10.000 toneladas de aceite (estimando un rendimiento de extracción del 19 %), el coste de producción será de 99 M€.

#### ○ **Costes indirectos**

Hacen referencia a costes generales de fabricación, como puede ser mano de obra indirecta, servicios generales, laboratorios, etc.

#### Mano de obra indirecta

Con el método de los porcentajes, se estima un **20 %** del valor de la mano de obra directa [41].

#### Servicios generales

Estos servicios están referidos a agua, vapor, electricidad, etc. En la planta, son necesarios servicios de electricidad para las bombas y vapor para el cambiador de calor los cambiadores de calor. En España, el precio de la electricidad de uso industrial es aproximadamente 0,096 € kW<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [45].

**Tabla 6.16.** Determinación del coste anual de los servicios generales

<b>Equipo</b>	<b>Consumo (kWh)</b>	<b>Coste anual (€)</b>
Bombas	23.248.350	<b>2.231.840</b>
Cambiador de calor	31.500.000	<b>3.024.000</b>
Condensador	62.685.000	<b>6.017.760</b>
		<b>11.273.600</b>

Laboratorio

El coste de un laboratorio en una instalación industrial oscila entre el 5 y el 25 % de la MO directa, escogiéndose un valor inferior del 5 %. [41].

Directivos y técnicos

Este coste está ligado a la calidad del producto, al no ser un proceso excesivamente complejo y de economía de escala se considera un 15 % de la mano de obra directa [41].

Amortización

Existen varios criterios contables para gestionar las amortizaciones, pero se en este trabajo se ha considerado que los equipos se amortizan en 10 años, por lo que esta partida supondrá el 10 % de los costes directos [41].

Mantenimiento

Perrut afirma que se puede considerar como costes de mantenimiento hasta un 5 % anual de los costes directos [26].

### ○ **Coste de producción**

La Tabla 6.17 muestra el resumen de las principales partidas del proceso productivo a lo largo de un año y el coste total del procesamiento por kg de aceite.

Según esta estimación preliminar, el coste de producir aceite de microalgas mediante crecimiento autótrofo de la microalga y extracción supercrítica es del orden de los 12 € kg<sup>-1</sup>, aunque más del 88 % de ese coste sería debido al crecimiento de la microalga. El coste de la extracción supercrítica propiamente es algo más elevado que el que reporta el Prof. Brunner, donde se afirma que el coste unitario de extracción supercrítica de sólidos en una planta de 10.000 toneladas/año se sitúa en torno a los 0,7 € kg<sup>-1</sup>, aunque para este cálculo parece que no se han tenido en cuenta los costes indirectos ni los de amortización [46].

Consecuentemente, es obvio que este proceso no puede ser una vía alternativa para la producción energética. A similar conclusión llegaron otros autores [30]. Aunque podría ser un proceso para otras industrias de alto valor añadido como la cosmética. Por ejemplo, el precio de venta de los aceites esenciales provenientes de cítricos oscila entre los 20 y los 85 € kg<sup>-1</sup> [47].

Por otro lado, si se diseña el proceso con el fin de maximizar el aprovechamiento de todos los subproductos se puede llegar a producciones viables. En este sentido, NATEX [48] propone un ciclo en el que después de crecer las microalgas, estas se concentran y se rompen sus paredes celulares. Posteriormente, la materia prima se somete a un proceso de extracción que separa los compuestos bioactivos, los lípidos y la microalga desgrasada. El extractor es

de película fina que permite operar con microalga húmeda, minimizando los costes de secado. La microalga desengrasada se somete a procesos fermentativos para producir bioetanol, biogás y un residuo destinado a la alimentación animal. La fracción lipídica se somete a procesos de esterificación (para producir biodiésel), hidrogenación (para producir alcanos) o hidrocrackeo para producir fuel. De esta forma se puede optimizar la producción de microalgas y hacerla rentable.

**Tabla 6.17.** Principales partidas del proceso productivo a lo largo de un año, coste total y unitario del producto.

<b>Concepto</b>	<b>Coste</b>
Materia prima	99.000.000 €
Mano de obra	105.120 €
<i>COSTES DIRECTOS</i>	<i>99.105.120 €</i>
Mano de obra indirecta	21.024 €
Servicios generales	11.273.600 €
Laboratorio	5.256 €
Directivos y técnicos	15.768 €
Amortización	6.600.529 €
Mantenimiento	4.505.256 €
<i>COSTES INDIRECTOS</i>	<i>22.421.433 €</i>
<b>TOTAL (CD+CI)</b>	<b>121.526.553 €</b>
<b>Coste total, kg aceite</b>	<b>12,15 €</b>
<b>Coste sin materia prima, kg aceite</b>	<b>2,25 €</b>

## 6.8. Referencias bibliográficas

- [1] G. Brunner, Gas Extraction, Springer, New York, 1994.
- [2] A. M. A. Pintor, C. I. A. Ferreira, J. C. Pereira, P. Correia, S. P. Silva, V. J. P. Vilar, C. M. S. Botelho, R. A. R. Boaventura, Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review, *Water Res.* 46 (2012) 3152–3166. doi:10.1016/j.watres.2012.03.048.
- [3] P. Přibyl, V. Cepák, V. Zachleder, Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 549–561. doi:10.1007/s00253-012-3915-5.
- [4] C. Yan, J. Fan, C. Xu, Analysis of oil droplets in microalgae, *Methods Cell Biol.* 116 (2013) 71–82. doi:10.1016/B978-0-12-408051-5.00005-X.
- [5] A. Bertucco, G. Vetter, High pressure process technology: fundamentals and applications, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2001.
- [6] J. M. del Valle, J. C. de la Fuente, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds: Review of kinetic and equilibrium models, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 (2006) 131–160. doi:10.1080/10408390500526514.
- [7] L. Soh, J. Zimmerman, Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide, *Green Chem.* 13 (2011) 1422–1429 doi:10.1039/c1gc15068e.
- [8] G. Della Porta, M. C. Volpe, E. Reverchon, Supercritical cleaning of rollers for printing and packaging industry, *J. Supercrit. Fluids.* 37 (2006) 409–416. doi:10.1016/j.supflu.2006.01.018.
- [9] A. Nisha, K. Udaya Sankar, G. Venkateswaran, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Mortierella alpina* single cell oil: Comparison with organic solvent extraction, *Food Chem.* 133 (2012) 220–226. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.081.

- [10] W. J. Bjornsson, K. M. MacDougall, J. E. Melanson, S. J. B. O'Leary, P. J. McGinn, Pilot-scale supercritical carbon dioxide extractions for the recovery of triacylglycerols from microalgae: a practical tool for algal biofuels research, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 547–555. doi:10.1007/s10811-011-9756-2.
- [11] S. Irie, Y., Morita, K., Masaaki, O., Akihisa, I., Masahico, Cleaning method and cleaning apparatus, US7507297 B2, 2009.
- [12] M. Solana, C.S. Rizza, A. Bertucco, Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*, *J. Supercrit. Fluids.* 92 (2014) 311–318. doi:10.1016/j.supflu.2014.06.013.
- [13] E. Lack, T. Gamse, T. Marr, Extraction from solids, in: A. Bertucco, G. Vetter (Ed.), *High Press. Process Technol. Fundam. Appl.*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [14] R. Harun, M. Singh, G.M. Forde, M.K. Danquah, Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 1037–1047. doi:10.1016/j.rser.2009.11.004.
- [15] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Appl. Energy.* 88 (2011) 3411–3424. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.025.
- [16] N. Pragya, K. K. Pandey, P. K. Sahoo, A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 24 (2013) 159–171. doi:10.1016/j.rser.2013.03.034.
- [17] P. E. Wiley, K. J. Brenneman, A. E. Jacobson, Improved algal harvesting using suspended air flotation, *Water Environ. Res.* 81 (2009) 702–708. doi:10.2175/106143009X407474.

- [18] K. T. Chen, C. H. Cheng, Y. H. Wu, W. C. Lu, Y. H. Lin, H.T. Lee, Continuous lipid extraction of microalgae using high-pressure carbon dioxide, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 23–26. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.017.
- [19] R. Halim, M. K. Danquah, P. A. Webley, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 709–732. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- [20] A. R. Byreddy, A. Gupta, C. J. Barrow, M. Puri, Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from *thraustochytrid* strains, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 5111–5127. doi:10.3390/md13085111.
- [21] A. P. Florentino de Souza Silva, M. C. Costa, A. Colzi Lopes, E. Fares Abdala Neto, R. Carrhá Leitão, C. R. Mota, A. Bezerra dos Santos, Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae, *Renew. Energy.* 63 (2014) 762–766. doi:10.1016/j.renene.2013.10.038.
- [22] C. Dejoye, M. A. Vian, G. Lumia, C. Bouscarle, F. Charton, F. Chemat, Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* microalgae: microwave prior to supercritical carbon dioxide extraction, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 9332–9341. doi:10.3390/ijms12129332.
- [23] M. García, E. Casas, J. Montañés, D. Rivera, Intensificación de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico mediante ultrasonidos de alta potencia (UAP): efectos sobre la obtención de aceite de almendra, in: *Proc. VII Flucomp Meet., Barcelona, 2014.*
- [24] K. Wakao, S. Kagei, *Heat and mass transfer in packed beds*, Nueva York, 1982.
- [25] R. V. Vaz, A. L. Magalhães, C. M. Silva, Prediction of binary diffusion coefficients in supercritical CO<sub>2</sub> with improved behavior near the critical point, *J. Supercrit. Fluids.* 91 (2014) 24–36. doi:10.1016/j.supflu.2014.03.011.

- [26] M. Perrut, Supercritical fluid applications: Industrial developments and economic issues, *Ind. Eng. Chem.* 39 (2000) 4531–4535.
- [27] E. L. G. Oliveira, A. J. D. Silvestre, C. M. Silva, Review of kinetic models for supercritical fluid extraction, *Chemical Engineering Research and Design*, 89 (7) (2011) 1104–1117.
- [28] Página web Green Fuel <http://www.greenfuel.es/es/> Accedido en junio de 2018.
- [29] Página web US Energy Information Administration <https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/> Accedido en junio de 2018.
- [30] A. Tabernero, E. M. del Valle, M. A. Galán, Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal* 63 (2012) 104–115.
- [31] H. Sovová, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - modelling of extraction curves. *Chem. Eng. Sci.* 49(3) (1994) 409–414.
- [32] M. Solana, C. S. Rizza, A. Bertucco. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina* *J. Supercrit. Fluids*, 92 (2014) 311–318. doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013
- [33] J. M. del Valle, J. de la Fuente, J., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds: review of kinetic and equilibrium models. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 (2006) 131–160.
- [34] A. Mouahid, C. Crampon Sid-Ali, A. Toudji, E. Badens. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling *J. of Supercrit. Fluids* 77 (2013) 7–16. doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.024

- [35] F. Stüber, S. Julien y F. Recasens. Internal mass transfer in sintered metallic pellets filled with supercritical fluid. *Chem. Eng. Sci.*, 52 (20) (1997) 3527–3542. doi.org/10.1016/S0009-2509(97)89692-3
- [36] J.M del Valle, Extraction of natural compounds using supercritical CO<sub>2</sub>: Going from the laboratory to the industrial application, *J. of Supercritical Fluids* 96 (2015) 180–199. dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.001
- [37] M. A Celis, Diseño de una batería de separación de hidrocarburos a baja presión a partir de la presión intermedia. Tesis doctoral, Universidad de las Américas Puebla, 2005.
- [38] Mc Graw Hill Cost Estimator <http://www.mhhe.com/engcs/chemical/peters/data/>  
Accedido en junio de 2018.
- [39] Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI). <http://www.chemengonline.com/pci-home> Accedido en junio de 2018.
- [40] Á. Vian, Pronóstico económico en la química industrial, EUDEMA, D.L. Madrid, 1991.
- [41] M. S. Peters, K. D. Timmerhaus, y R. E. West, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, 5th ed. McGraw-Hill, 2003.
- [42] Instituto Nacional de Estadística. Base de datos de mercado laboral.  
[http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica\\_P&cid=1254735976596](http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/categoria.htm?c=Estadistica_P&cid=1254735976596)  
Accedido en junio de 2018.
- [43] F. G. Ación, J.M.Fernández, J. J. Magán, E. Molina, Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it, *Biotech. Adv.*, 30 (6) (2012) 1344-1353.
- [44] R. Slade, A. Bauen, Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass Bioenergy*, 53 (2013) 29-38.
- [45] Aura Energía, «Tarifas Luz Industria Península» <https://www.aura-energia.com/tarifas-luz-industria-peninsula/>. Accedido en julio de 2018.
- [46] G. Brunner, Supercritical fluids: technology and application to food processing, *J. Food Eng.*, 67 (1-2) (2005) 21-33. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060

[47] S. Caiger, «Essential Oils and Oleoresins, Market insider», 2016.

[48] Página web NATEX [https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/algae\\_extraction.pdf](https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/algae_extraction.pdf)

Accedido en junio de 2018.



## **7. CONCLUSIONES**



En esta tesis se estudió la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de varias matrices y se discutieron los fenómenos que afectan al acceso del CO<sub>2</sub> al sólido, a la disolución del soluto y a su eliminación. Para ello, se investigó cómo afectan los parámetros de operación y las condiciones del sólido al equilibrio, la transferencia interna y la externa. A continuación, se describen las conclusiones obtenidas en los tres casos estudiados.

### **7.1. Eliminación de aceite lubricante de contactos metálicos**

La eliminación total de aceite lubricante en contactos metálicos mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico fue difícil debido a la existencia de una capa de lubricante fuertemente adherida en la superficie del metal, probablemente correspondiente a las fracciones más pesadas de base parafínica y a algunos aditivos. Resultados similares se reportaron en otros estudios de desengrasado, aunque en ninguno de ellos se discutieron las razones.

La velocidad de extracción fue maximizada aumentando la presión para promover la solubilización del aceite en CO<sub>2</sub>, y aumentando la temperatura, para eliminar la capa adherida (probablemente quimiadsorbida); beneficiando así la desorción endotérmica del aceite y reduciendo a la vez su viscosidad. Por otro lado, para favorecer el despegue y posterior arrastre del aceite fue necesario el empleo de altos caudales de CO<sub>2</sub>. Así, dentro de las condiciones exploradas, se encontró un rendimiento de extracción del aceite lubricante del 95 % operando a 100 °C, 30

MPa con un caudal de  $5 \text{ g min}^{-1}$  ( $0,3 \text{ kg h}^{-1}$ ). El consumo de  $\text{CO}_2$  fue de  $50 \text{ kg kg}^{-1}$  contactos.

Sin embargo, para eliminar completamente la capa de aceite lubricante fuertemente adherida a los contactos, fue necesario añadir un cosolvente (etanol) al fluido supercrítico. El beneficio del etanol está probablemente relacionado con la formación de enlaces de hidrógeno con el aceite, como se concluyó en la extracción de aceites vegetales [1].

En esta aplicación, el uso de un cosolvente no sería un problema porque el etanol no es tóxico. Además, dada su alta solubilidad en  $\text{CO}_2$ , en una hipotética operación a escala industrial, el etanol podría ser recirculado junto con este fluido. La pequeña cantidad que mojaría los contactos se evaporaría fácilmente.

Tanto en este trabajo, como en la mayoría de las investigaciones realizadas en aplicaciones similares a escala laboratorio, las piezas se colocaron en el extractor formando un lecho fijo donde el  $\text{CO}_2$  pasaba en flujo laminar. Sin embargo, para este tipo de aplicación, en la que es necesario un elevado caudal de  $\text{CO}_2$  e intensa turbulencia, sería apropiado recircular el  $\text{CO}_2$  a alta velocidad con el fin de acercarse a un régimen turbulento y a la vez promover tiempos de contacto elevados.

Otra opción sería promover la agitación de las piezas a limpiar. Rebien et al. propusieron favorecer la eliminación de aceites lubricantes parafínicos en piezas de precisión, utilizando una cesta rotativa que podría permitía mantener las

piezas constantemente agitadas [2]. No obstante, este tipo de movimiento podría ser perjudicial para la integridad de otros materiales, como los contactos metálicos.

De una u otra forma, el proceso tiene buenas perspectivas de comercialización. En el XIII Encuentro Europeo de Fluidos Supercríticos, Amsonic Precision Cleaning presentó una planta piloto, de 90 litros de capacidad, provisto de una cesta giratoria para desengrasado y eliminación de partículas [1]. Chematur comercializó en 2012 un equipo de desengrasado que opera en Husqvarna, Suecia [3].

## **7.2. Eliminación de TCA contaminante en gránulos de corcho**

En el caso de la eliminación de TCA contenido en gránulos de corcho, el transporte interno jugó un papel importante en la tasa global de extracción mediante  $\text{CO}_2\text{sc}$ . El TCA contaminaba uniformemente los gránulos de corcho que eran relativamente grandes y muy porosos. Esto dificultó en gran medida la difusión interna. Por lo tanto, para eliminar el TCA en el corcho hasta los elevados niveles de exigencia de comercialización,  $< 0,5 \text{ ng L}^{-1}$ , fue necesario un tiempo de contacto mínimo entre el  $\text{CO}_2$  y el corcho, que fue proporcionado por un caudal de  $\text{CO}_2$  relativamente bajo. Por ejemplo, operando con una baja densidad de  $326 \text{ kg m}^{-3}$ , fueron necesarios 22 min de tiempo de residencia del  $\text{CO}_2$  en el extractor provistos por un caudal de  $0,09 \text{ kg h}^{-1}$ .

Este resultado mejoró mucho al operar con mayor densidad, así con  $585 \text{ kg m}^{-3}$ , el tiempo de residencia para lograr la eliminación del TCA por debajo del límite de detección fue de 8 min proporcionado por un caudal de  $0,18 \text{ kg h}^{-1}$ . El incremento en la densidad del disolvente mejoró la capacidad de disolución, pero hubo un límite con el aumento de la presión (45 MPa) debido al empeoramiento de las propiedades de transporte de materia y a la pérdida de dureza del corcho; por lo tanto, la presión tuvo que mantenerse en torno a 12-14 MPa.

La temperatura afectó negativamente a la extracción por encima de los  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ello fue debido a que el TCA tiene una presión de vapor muy alta y por tanto el impacto de la temperatura estuvo condicionado fundamentalmente por la reducción en la densidad del  $\text{CO}_2$ . Así que, en este ejemplo, la operación a baja temperatura ( $< 60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sería lo más adecuado. Operando a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y 12 MPa, el consumo de  $\text{CO}_2$  para la eliminación del TCA fue  $43 \text{ kg CO}_2 \text{ kg corcho}^{-1}$ .

Por la gran selectividad del proceso y por ser el único en el mercado con el cual se puede garantizar un corcho libre de TCA, la extracción de TCA de corcho es hoy comercial, siendo explotada por la empresa OENEO en España y Francia [4, 5].

### **7.3. Extracción de lípidos de microalga**

A pesar de la buena solubilidad de los lípidos neutros en el  $\text{CO}_2\text{sc}$ , su extracción de microalgas estuvo también fuertemente condicionado por el

transporte interno. Los lípidos estaban contenidos dentro del citoplasma, de tal forma que el acceso del CO<sub>2</sub> estaba complicado por la membrana y la pared celular. Consecuentemente, el proceso se vio favorecido al utilizar una elevada temperatura de operación porque probablemente facilitó la ruptura térmica celular. Así, a 70 °C, la carga en aceite del CO<sub>2</sub> en el periodo de velocidad de extracción máxima era cercana a la solubilidad teórica. El aumento de la presión dentro del intervalo explorado (15-30 MPa) también mejoró la tasa de extracción y el rendimiento final.

Previo a la extracción, las microalgas tuvieron que ser secadas y molidas pues la presencia de agua libre en el extractor proveniente del cultivo de las mismas redujo sensiblemente la velocidad de extracción, a pesar de haber sometido a la biomasa a operaciones de microondas o ultrasonidos.

La velocidad de extracción mejoró notablemente cuando se incrementó la velocidad del fluido; sin embargo, existió un máximo porque era necesario que el disolvente estuviera en contacto con las microalgas durante un tiempo mínimo.

Operando a 30 MPa, 70 °C con un caudal de 0,24 kg h<sup>-1</sup> y un consumo de 99 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> biomasa se obtuvo un rendimiento de extracción del 21 % con respecto a la masa inicial de biomasa, que está en el intervalo más alto de los reportados en la bibliografía para las microalgas [6, 7, 8].

Sin embargo, se estimó que el coste de producción de aceite a partir de microalgas crecidas en cultivo autótrofo mediante extracción supercrítica sería superior a 12 € por kg de aceite (sin tener en cuenta el secado o la molienda). En

consecuencia, la extracción de lípidos de microalgas mediante esta técnica no parece adecuada para la producción de biodiesel. Tampoco podría utilizarse hoy para alimentación por las restricciones legislativas actuales. Sin embargo, podría ser una buena alternativa para obtener aceite para la formulación de productos de alto valor añadido, como productos cosméticos, nutracéuticos o farmacéuticos, que podrían tener un margen suficiente para absorber el coste del proceso y la amortización de la instalación. Además, estos productos podrían ser etiquetados como "naturales" para fines de comercialización, ya que se producen a partir de biomasa de microalgas sin el uso de disolventes orgánicos; el CO<sub>2</sub> es un disolvente GRAS. En cualquier caso, habría que reducir los costes energéticos en el cultivo de la microalga que supone más del 92 % del total estimado, y mediante el uso de técnicas de recolección, secado y mecánicas "baratas". Una opción sería la recolección mediante flotación aérea [10] y el secado al sol. Finalmente, sería imprescindible el aprovechamiento global de la biomasa de microalga desengrasada como alimento de ganado, para la fabricación de bioetanol, etc.

Además, para que el proceso fuese verdaderamente sostenible, solo deberían usarse residuos como fuente de carbono para el crecimiento de la microalga (en el caso de hacerlo de forma heterótrofa, como se hizo en esta investigación). En un trabajo previo del grupo se demostró que el aceite de canola como simulador de aceites residuales, glicerol como subproducto en exceso de la producción de biodiesel y efluentes residuales de ganado, fueron bien asimilados por la microalga *Chlorella protothecoides* [9].

#### 7.4. Conclusiones globales

En la operación de extracción supercrítica de los casos estudiados, los fenómenos de transporte tuvieron una contribución relevante en la velocidad y rendimiento. Dependiendo de la localización e interacción entre el soluto y la matriz, fue distinto el impacto de las condiciones de operación y el consumo de disolvente. Por ello, es difícil extrapolar los resultados de un sólido a otro y es esencial la investigación en laboratorio en cada caso en un amplio intervalo de condiciones.

En los tres ejemplos estudiados en esta tesis, el aumento de la presión mejoró la velocidad y rendimiento de la extracción, ya que con ello aumentó la densidad del disolvente y su capacidad de disolución. Sin embargo, hubo un máximo en su incremento porque las propiedades de transporte empeoraron (esencialmente viscosidad y coeficiente de difusión), así que la extracción se vio dificultada esencialmente en el transporte interno. Además, y como se demostró para el corcho, un exceso de presión podría también causar daños estructurales a las matrices, hecho que es decisivo cuando el producto de interés es el sólido agotado. Los costes de operación también se incrementarían, por lo que obviamente hay un óptimo.

Por su parte, la temperatura tuvo efectos contrarios dependiendo de cada caso. Su aumento favoreció la extracción tanto en el caso de la eliminación de aceite lubricante como en el de la extracción de aceite de microalga, a pesar de causar una reducción en la densidad del CO<sub>2</sub>. Además de aumentar la presión de

vapor de los solutos, en el primero de los casos se favoreció la desorción química del lubricante adherido a la superficie metálica y en el segundo, se facilitó la rotura de la pared celular favoreciendo el acceso del CO<sub>2</sub> al aceite y la posterior extracción.

Como la extracción supercrítica se llevó a cabo con los sólidos formando un lecho fijo y pasando a través de ellos el CO<sub>2</sub> supercrítico, en general la velocidad de paso fue baja. De tal forma que régimen de flujo fue laminar o como mucho, convección natural. Por ello, el incremento del caudal tuvo un importante impacto en la velocidad de extracción supercrítica. Cuando los solutos estuvieron fácilmente accesibles, este tuvo que ser en general alto para mejorar la turbulencia, la transferencia de materia en la fase fluida y aumentar la velocidad de extracción. Sin embargo, existió un máximo porque un paso a velocidad excesiva redujo demasiado el tiempo de residencia en el extractor impidiendo que el CO<sub>2</sub> se “cargase” en el soluto. Así, en los casos en que el soluto es difícilmente accesible, el caudal óptimo debió ser bajo para dar tiempo al transporte interno y extraer el soluto.

En relación con la condición del sólido, este trabajo demostró el importantísimo impacto de la humedad inicial de la matriz sólida. La biomasa vegetal habitualmente tiene una humedad en equilibrio con el ambiente menor del 10 %. Si la molienda es posible, este contenido en agua puede ser suficiente para lograr una elevada velocidad de extracción. En cambio, si la partícula es grande y no se puede machacar o moler para reducir los caminos difusionales, entonces el hinchamiento de la matriz mediante humectación es un método eficaz para

favorecer la extracción porque facilita la difusión interna. Contrariamente, un defecto de agua encoge la estructura y dificulta la extracción. En el caso de que la materia prima se obtenga de un caldo de cultivo y dado que el secado es una operación muy costosa energéticamente, es esencial analizar la influencia del contenido inicial del agua en la extracción para minimizar el secado necesario.

## 7.5. Referencias bibliográficas

- [1] M. J. Cocero, L. Calvo, Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO<sub>2</sub>-ethanol mixtures, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (11) (1996) 1573–1578.
- [2] D. Rebien, J. Mankiewicz, M. Bilz, S. Kareth, M. Petermann, Compressed carbon dioxide – an innovative washing fluid, in: *Proceedings of the 13th European Meeting on Supercritical Fluids*, The Hague (Netherlands), 2011.
- [3] Chematur Commercial Plant. Available from: <http://www.chematur.se> Accedido en enero de 2018.
- [4] COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE, Method for treating cork and extracting organic compounds from cork, with a dense fluid under pressure, FR2798879, 1999.
- [5] DIAM, (2017). <http://www.diam-closures.com/medias/brochure/475-Brochure-Diam-cork-for-still-wine.pdf> (Accedido en enero de 2017).
- [6] Y.H. Chen, T.H. Walker, Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids, *Bioresour. Technol.* 114 (2012) 512–517.
- [7] A. Mouahid, Ch. Crampon, S.A. Toudji, E. Badens, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: experiments and modeling, *J. Supercrit. Fluids* 77 (2013) 7–16.
- [8] M. Solana, C.S. Rizza, A. Bertucco, Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: comparison between *Scenedesmus oliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nanochlorosis salina*, *J. Supercrit. Fluids* 92 (2014) 311–318.
- [9] N. Pragma, K. Pandey, P.K. Sahoo, A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 24 (2013) 159–171.

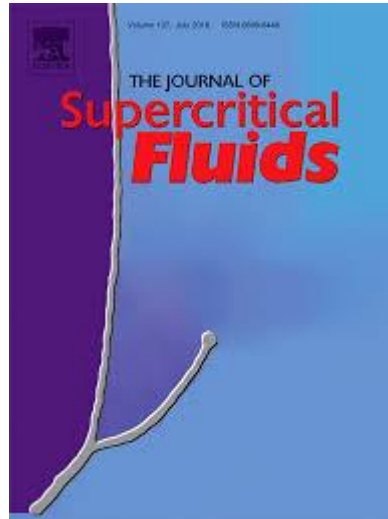
- [10] P.E. Wiley, K.J. Brenneman, A.E. Jacobson, Improved algal harvesting using suspended air flotation, *Water Environ. Res.* 81 (2009) 702–708.



## **8. ANEXOS**



## ANEXO I



**The removal of lubricating oils from metallic contacts  
with supercritical CO<sub>2</sub>**

M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, M.I. Barrena, L. Calvo

The Journal of Supercritical Fluids

Volume 73, January 2013, Pages 51-56

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.09.015>





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/supflu](http://www.elsevier.com/locate/supflu)The removal of lubricating oils from metallic contacts with supercritical CO<sub>2</sub>M. Viguera<sup>a</sup>, J.M. Gómez-Salazar<sup>b</sup>, M.I. Barrena<sup>b</sup>, L. Calvo<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Av Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain<sup>b</sup> Department of Material Science and Metallurgical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Av Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 May 2012

Received in revised form

21 September 2012

Accepted 22 September 2012

## Keywords:

Extraction

Lubricating oil

Metal contacts

Supercritical CO<sub>2</sub>

Cosolvent

Chemisorption

## ABSTRACT

During the process of making metallic contacts for the electronics industry, they become stained with lubricating oil. Nowadays, the oil is removed by organic solvents. The aim of this work was to investigate their replacement by supercritical CO<sub>2</sub>, promoting a greener solution. The contacts stained with 3% lubricating oil were placed forming a fixed bed. The CO<sub>2</sub> at different temperatures, pressures and mass flow rates was made to continuously flowing over this. The oil removal rates and yields were monitored and compared. As the pressure was increased between 120 and 300 bar, the oil extraction rate and consequently the yield also increased because of the CO<sub>2</sub> density increment. But, the existence of a chemisorbed oil layer on the surface of the contact was demonstrated, probably formed by the paraffinic heavy fractions and some additives, and this was difficult to remove. The rise in temperature (37–110 °C) helped with the detachment of this layer, because of the endothermic character of the desorption. The viscosity of the oil also decreased. The increase in flow rate (1–7 g min<sup>-1</sup>) helped to sweep away the desorbed oil. However, within the explored variables and independently of the contact composition, it was impossible to achieve total lubricant elimination. Therefore, the addition of a cosolvent, ethanol, was explored. The lower the temperature was, the larger amounts of ethanol were needed. Thus, total lubricating oil elimination was achieved at 110 °C with the addition of 5% ethanol. These results were confirmed by electronic microscopy images.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Metallic contacts are elements used in the electronics industry as raw material. They may be composed of a single metal or alloys or stampings of several.

In the process of metal contact cold-forming there is a stage in which these are stained with lubricating oil. These elements, as precision parts, must have their surfaces cleaned and polished, so removal of oils is essential.

Currently, benzene-based solvents are being used to remove the oil, but the process is expensive due to the high cost associated with recovering the solvent, usually by distillation. Furthermore, organic solvents are starting to be abandoned because of their deleterious effects on the environment.

In this sense, it would be interesting to modify the process by replacing the solvent with one that is less harmful that can be separated from the extracted oils with ease. One option is the application of supercritical CO<sub>2</sub> because it leaves no residue after depressurization, it is not toxic and is a good fat solvent.

Research in degreasing is not very extensive. Many publications also study the removal of particles and they are in the form of patents [1–3,9,10]. Table 1 shows a summary of the degreasing applications tested to date up to our knowledge.

All these works were carried out in supercritical conditions except for the study by Smith and Bohnert [2], which operated sometimes in subcritical conditions, and Perrut and Perrut [7], who experienced below the critical point. Most of the publications used metal elements as raw material except Smith and Bohnert [2], who used plastic vessels and Irie et al. [3] who used, among others, ceramic items. The metals used were of very different origins, such as aluminum [8] or steel [6]. Moreover, the oil stains ranged from silicone [8] to paraffinic lubricants such as those used in this work. Some of the oils were also contaminated with particles [1] or printer inks [5]. In general, the presence of pores or voids decreased the efficiency of extraction [8] and no total deletions of these oils were reached, except in the work of Smith and Bohnert [2], but they used a plastic material. Therefore, to complete the extraction, some authors tried various additives such as water [3] or surfactants such as N-methyl pyrrolidone [5].

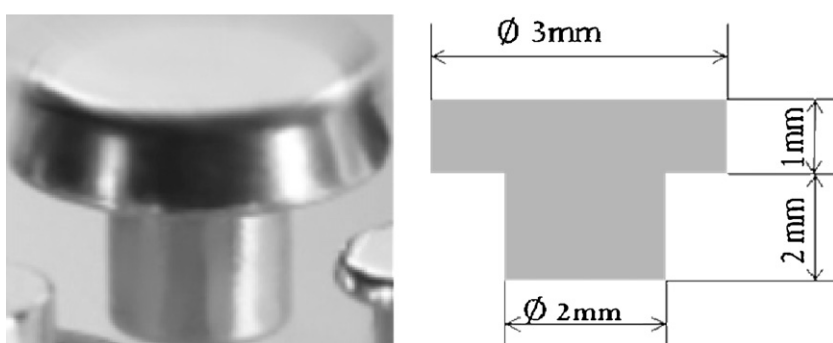
The objective of this research was to study the extraction of lubricating oils that stain over some metallic contacts used in the semiconductor industry by using supercritical CO<sub>2</sub>. Specifically, we investigated the effect on the oil removal yield of the various

\* Corresponding author. Tel.: +34 913944185.

E-mail address: [lcalvo@quim.ucm.es](mailto:lcalvo@quim.ucm.es) (L. Calvo).

**Table 1**  
Summary of work published to date in solid materials degreasing.

Raw material	Contaminant	P (bar)	T (°C)	Maximum removal yield	Additive	Reference
Mechanical parts	Oils, fats and particles in pores	>74	>31.1	Not reported	Not reported	[1]
High density polyethylene vessels	Engine lubricating oil	55.2–344.7	20–100	<99.9%	Not reported	[2]
Electronic capacitors, precision electronic components, ceramic materials	Oil adhered to the surface	>120	>47	Not reported	Water	[3]
Non-porous metal particles	Lubricating oil adhered to the surface	340	80	80%	Not reported	[4]
Printing machines gears	Gear oils and inks	150	40–100	95% with surfactant	N-methyl pyrrolidone (up to 80%)	[5]
Metallic filters (Cu, CuZn, Al, steel)	Paraffinic mineral oil	250	100	Not reported	Not reported	[6]
Metallic parts	Machinery oil, engine oil	50	20	Not reported	Not reported	[7]
7 mm × 7 mm × 70 mm Al parts with and without holes	Drawing oil, mineral oil, silicon oil	>75	>31.2	80%, 60% if parts were riddled with holes	Not reported	[8]

**Fig. 1.** Photograph of a metal contact composed of a silver top and a silver body and its typical dimensions.

operational parameters: pressure, temperature and flow rate, as well as the possible addition of a modifier.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

We used high purity carbon dioxide (>99.995% purity) supplied by Carbueros Metálicos, Spain. Metallic contacts were kindly provided by the company Ami Doduco. Fig. 1 shows a contact and its dimensions. It is formed by an active surface on top of a body support. The upper surface is always composed of silver, although it may have small additions of other metals or metal oxides in order to modify its properties. The body of the contacts can be silver, but to reduce costs this part can be replaced by copper. The different types of contacts used in this work are shown in Table 2. The combination of the silver surface and copper body is made by cold forming, a method which guarantees the absence of pores in the metal surface.

Finally the lubricating oil which impregnated contacts was *Engine Oil 12*, supplied by Cogelsa (Spain). This product is a mixture of hydrocarbons (paraffinic mineral oils),

**Table 2**  
Description of the various types of contacts used in this investigation.

Number	Top (weight percentage of the accompanying oxide/metal)	Body
1	Ag–CdO (10%)	Cu
2	Ag–Ni (10%)	Cu
3	Ag–SnO (2%)	Cu
4	Ag	Ag
5	Ag–CdO (10%)	Ag–CdO (10%)

thickeners (mixture of ethylene–propylene copolymer and ethylene–propylene–ethylidene norbornene terpolymer) and a very small percentage of amine-based antioxidant.

### 2.2. Experimental installation

A semi-continuous flow apparatus consisting of a CO<sub>2</sub> feed line and a 100-ml capacity 316 stainless-steel vessel was used. Its internal diameter was  $3 \times 10^{-2}$  m and its length was  $18 \times 10^{-2}$  m, giving a length to diameter ratio of six. A heating jacket around it controlled the temperature inside. The CO<sub>2</sub> flow rate was fixed by a membrane pump (Jasco, PU 2080), while pressure was controlled by a back-pressure regulator. The quantity of CO<sub>2</sub> was measured with a mass-flow meter placed at the end of the line. Complete details of the equipment are described in a previous report [11].

### 2.3. Operation procedure

Thirty grams of metallic contacts were sprayed with 1 g of oil measured within an error of  $\pm 0.005$  g. They were thoroughly mixed and randomly deposited with a spatula in the extraction vessel forming a fixed bed of approximately  $1 \times 10^{-2}$  m high with a bulk bed porosity of 0.4. Then the extractor was closed and pre-heated. After that, the CO<sub>2</sub> was pumped in, and, once the desired pressure was reached, the back pressure regulator (BPR) was opened, providing a continuous flow through the bed. After the valve, the CO<sub>2</sub> was depressurized; the solvent power of the supercritical fluid dropped and the extract was precipitated in a previously weighed glass flask. The amount of CO<sub>2</sub> circulated was read by the mass flow meter (AlicatScientific, M-10SLPM-D). When the operation was over (e.g. when after three consecutive data gathering, no oil was extracted), the apparatus was depressurized and the contacts unloaded. The

extraction curves were constructed by plotting the amount of oil extracted based on the total percentage of oil present in the extractor, versus the amount of CO<sub>2</sub> which passed through the bed to obtain that oil amount at constant intervals of time of 15 min.

Similar procedure was used to obtain the lubricant solubility data. The vessel was filled with glass wool impregnated with three grams of the oil. The CO<sub>2</sub> was flown through the bed at low rate (1 g min<sup>-1</sup>) to ensure that the equilibrium concentration was established in the supercritical phase. The solubility values were obtained as the maximum slope of the extraction curves constructed as described before.

In experiments in which a modifier was added, another membrane pump was used (Jasco, PU 2080) without cooling the head. The flow rate (with an error of ±0.001 ml min<sup>-1</sup>) was set to give a constant mass ratio with respect to the introduced CO<sub>2</sub>. The ethanol was pumped to the operating pressure and mixed with CO<sub>2</sub> in a “T” piece before being introduced into the extractor.

At the end of each experiment, samples were photographed by electron microscopy on a JEOL 6400 equipped with EDX (Link-Oxford), in order to see the presence of traces of oil on the metal surface.

#### 2.4. Procedure for error estimation

To assess the reproducibility of the results, one experiment was repeated six times, establishing an experimental standard deviation of 3.5% in extraction yield and 0.018 g of oil × 100 g<sup>-1</sup> of CO<sub>2</sub> in oil extraction rate. All data are the average of at least two experiments.

#### 2.5. Methods for the estimation of the external mass transfer coefficients

The correlation of Wakao and Kagueli [12] was used to estimate external mass transfer coefficients:

$$\frac{Sh}{\sqrt[3]{Sc}} = \frac{2}{\sqrt[3]{Sc}} + 1.1Re^{0.6},$$

where Sh is the Sherwood number; Sc is the Schmidt number and Re, is the Reynolds number. The external mass transfer coefficient,  $k_g$  in m s<sup>-1</sup>, was deduced from the Sh number:

$$Sh = \frac{k_g \cdot d_{eq}}{D_e},$$

where  $d_{eq}$  is the equivalent diameter and  $D_e$  is the effective diffusivity of supercritical carbon dioxide estimated as describe in [13]. The resulted value was  $1 \times 10^{-9}$  m s<sup>-2</sup>

$$a = \frac{4}{d_{eq}},$$

$a$  is the specific surface area (m<sup>-1</sup>), and  $d_{eq}$  is the equivalent diameter, that is the diameter of a sphere of same volume as the metallic contact corrected by sphericity to take into account the actual geometry of the metallic contact which was estimated to be 0.75.

$$d_{eq} = d_{est} \cdot \varnothing$$

### 3. Results and discussion

This section shows the lubricating oil extraction curves obtained at different operating conditions. Specifically, it shows the effect of pressure, temperature and CO<sub>2</sub> mass flow rate. Finally, the results when a modifier was added are reported. We also analyzed if the effect of different contacts composition might have had any influence in the cleaning.

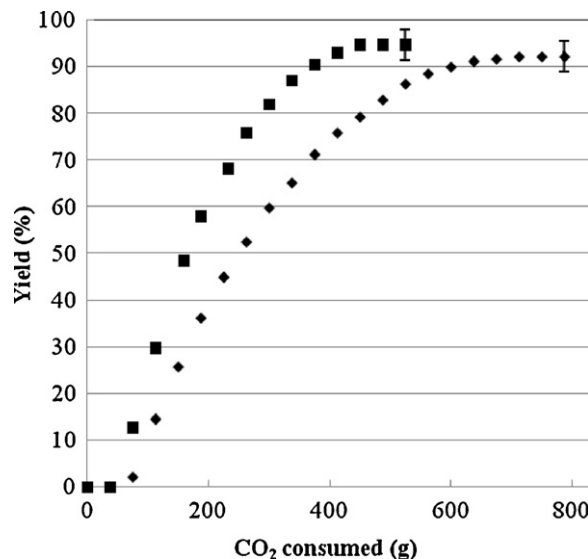


Fig. 2. Effect of temperature on the oil extraction at 300 bar and a flow rate of 3 g min<sup>-1</sup>. ■ 110°C. ◆ 37°C.

As can be seen, for example, in Fig. 2, the extraction curves have a sigmoid shape. In the initial stages the extractor was filled by the CO<sub>2</sub> so hardly any oil was extracted (period I), then the slope of the curve became higher and constant (period II) but it did not correspond to the solubility since it was not possible to reach the saturation at any condition as it will be shown later. Finally, the rate decreased asymptotically, approaching the limit (period III). In the extraction of oils from vegetable matrices, this last stage is associated with the beginning of the internal transfer control to remove the oil contained within the solid, but in this case the oil was on the surface, not in the interior of the contacts. Hence the reduction in the extraction rate was initially surprising. If all the lubricating oil was equally accessible, this decline in the extraction rate should not be observed.

However, the lubricating oils contain additives to bind the lubricant more strongly to the surface, so as to resist their elimination by dragging or centrifugation. They also contain thickeners (1.5% in this case) to increase the viscosity and maintain it when temperature increases. Therefore, it is possible that the extraction rate reduction may be related to a layer of those additives adhering strongly (probably chemisorbed) to the metallic surface, and/or a layer of the heavier fractions of the paraffinic mineral oil base, such as the Bright Stock fractions of high viscosity.

The next sections discuss the effect of the most important operation parameters on the removal of the lubricating oil focused on that layer.

#### 3.1. Temperature and pressure effect

Fig. 2 shows the extraction curves of two trials carried out at 37°C and 110°C at constant pressure (300 bar) and constant CO<sub>2</sub> mass flowrate (3 g min<sup>-1</sup>). The slope of the period II of the curve at 110°C was significantly higher than at 37°C. To understand these results we studied the solubility of lubricating oil in CO<sub>2</sub> at different pressures along two isotherms (37 and 110°C). The data are shown in Fig. 3. The solubility increased with the pressure due to a subsequent increase of the solvent density; however, the effect of temperature was not as straightforward. In this case, there were two competing phenomena. On the one hand, the increase in temperature decreased the density of the solvent by negatively affecting the extraction, and on the other hand the temperature increase had improved the solute volatility. At low

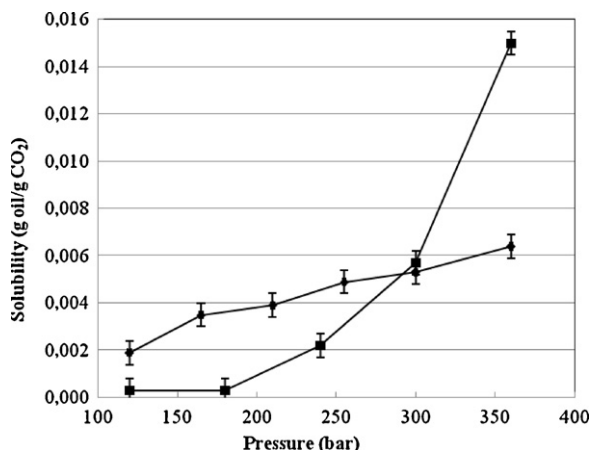


Fig. 3. The variation of the lubricating oil solubility with pressure at two different temperatures (■ 110 °C; ♦ 37 °C). CO<sub>2</sub> mass flow rate was 1 g min<sup>-1</sup>.

pressures, the density effect was predominant and therefore the extraction was better at low temperature, whereas if the pressure was high, the higher temperature benefited the extraction. Therefore, the isotherms in the pressure–solubility diagrams intersected at a point called the crossover point, which represents the pressure at which the operating temperature increase benefited the extraction [14]. The crossover point for this scenario was below the operating pressure, around 280 bar. This explains why the slope in the extraction curves of Fig. 2 was greater at 110 °C than at 37 °C.

Furthermore, the final extraction yield was also slightly higher when operating at high temperature. First, this may be because increasing the temperature decreases the viscosity of the lubricant, so facilitating drag and dissolution. Secondly, this fact indicated again that the reduction in the extraction rate may be due to the existence of an additives layer or the presence of heavy fractions adsorbed to the contact surface, whose elimination (desorption), endothermic in character, was favored by increasing the temperature.

Similar results were found by Porta et al. [5] in degreasing metal parts. They maintained constant pressure (150 bar) while increasing the temperature (40–100 °C) in order to favor the removal of the stained oil.

So then we studied whether the composition of the contact might affect this phenomenon and afterwards we examined whether an increase in flow rate could facilitate the removal of the oil.

### 3.2. Contact composition effect

This study sought to investigate whether or not the Ni and Cd or Sn oxides that sometimes accompanied the top silver contacts favored the strong adhesion of the lubricating oil on the outer surface, especially if adherence was due to a chemisorption phenomenon. The composition of the different contacts that we used is shown in Table 2. The weight ratio of metal oxide or metal alloy is shown in parentheses. Fig. 4 shows the lubricant extraction curves of all these materials in fixed operation conditions (pressure, 300 bar; temperature, 37 °C and flow rate, 2.5 g min<sup>-1</sup>).

There was no significant difference in the behavior of different types of contacts. The slope of the period II was similar in all cases. Furthermore, the final extraction yield ranged within the experimental error at 85%. In this sense, we could not explain the strong interaction between the oil and the contacts based on their different composition. Consequently, it seems that the silver, as the main component in all contacts, may be responsible for the strong interaction with the lubricating oil. Indeed, there are

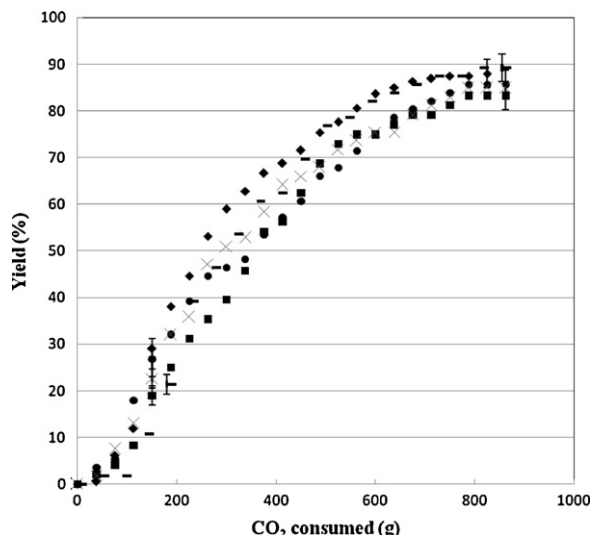


Fig. 4. Lubricating oil extraction curves obtained at 300 bar, 37 °C and 2.5 g min<sup>-1</sup> in different contacts. The dots correspond to the different materials shown in Table 2. 1: ■, 2: ●, 3: ×, 4: –, 5: ♦.

studies in literature that describe the strong chemisorptions of other additives and lubricants over this metal [15].

### 3.3. The influence of increased flow rate

This section investigated whether the oil layer (the additives or heavy fractions) could be eliminated by favoring higher fluid velocities in the bed. For this, experiments were conducted at different CO<sub>2</sub> mass rates, as shown in Fig. 5.

If the mass flow rate was low (1 g min<sup>-1</sup>), the extraction rate of the oil was maximum. Nevertheless, the CO<sub>2</sub> was not saturated, as the slope of this curve was much lower than the correspondent solubility given in Fig. 3. On the other hand, the final extraction yield was very low, less than 80%. By contrast, when working at higher mass flow rates, the slope of the corresponding extraction curves dropped, although very high yields, close to 95%, were reached in the oil removal.

Table 3 shows the particle Reynolds number, the superficial velocity of the fluid in the vessel, the contact time between the CO<sub>2</sub> and the oil, and the simple and lamped (corrected by the density) external mass transfer coefficients at 300 bar and the two temperatures used in this work. The values of the coefficients were within

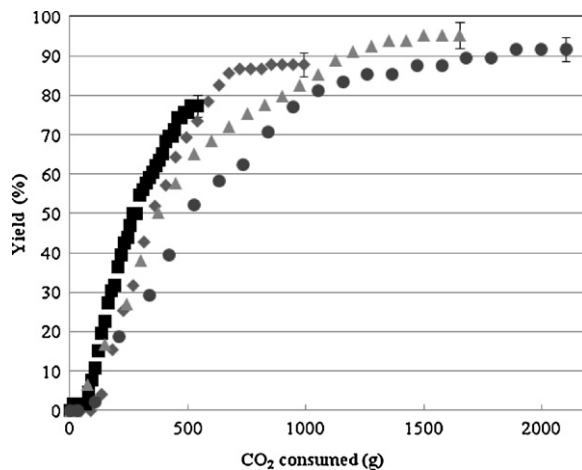


Fig. 5. Effect of CO<sub>2</sub> mass rate in the extraction of the oil at 300 bar and 37 °C. ■ 11 g min<sup>-1</sup>, ♦ 3 g min<sup>-1</sup>, ▲ 5 g min<sup>-1</sup>, ● 7 g min<sup>-1</sup>.

**Table 3**  
Variables related to external mass transfer.

Temperature (°C)	Mass rate (g min <sup>-1</sup> )	$u$ ( $\times 10^3$ m s <sup>-1</sup> )	Re <sub>p</sub>	Contact time (s)	$k_g$ ( $\times 10^6$ m s <sup>-1</sup> )	$k_g \cdot a \cdot \rho$ (kg s <sup>-1</sup> m <sup>-3</sup> )
37	1	0.03	5	5.2	1.5	2.5
	3	0.08	16	1.7	2.9	4.8
	5	0.13	27	1.0	3.9	6.5
	7	0.18	38	0.7	4.8	8.0
110	1	0.04	8	3.5	1.9	2.2
	3	0.11	24	1.2	3.7	4.1
	5	0.19	40	0.7	5.0	5.6
	7	0.27	56	0.5	6.0	6.8

the interval of those obtained for the supercritical extraction of oilseeds as shown in the review of Del Valle and De La Fuente [16].

The increase in the CO<sub>2</sub> flow rate caused an enhancement of the external mass transfer as demonstrated by the important increase in the coefficients; however, the flow regime was always laminar (Re<sub>p</sub> < 1000) and the contact time was very low. This fact could explain why the slope of the curves in the period II were less sharp as the flow rate increased despite the enhancement of the external mass transfer.

On the other hand, at similar flow rate of 1 g min<sup>-1</sup>, the CO<sub>2</sub> became saturated when the oil was impregnated on the glass wool but it did not when the oil was staining over the metallic contacts. We discarded channeling on the contacts fixed bed as the main reason for this disagreement, for the following reasons: the vessel inner diameter to the contact diameter was ten, the superficial velocity of the supercritical fluid was very low, the bed was short, the contacts were loaded randomly and the electron microscopy images showed that they were similarly dirty after the extraction independently of their position in the vessel.

Therefore, we attributed the difference on the extraction rate from these two supports to the high excess of lubricant oil in the glass wool and the higher contact time on these assays (the glass wool occupied much higher volume of the vessel than the contacts). But again it could also be an indication of the strong bond of the part of the oil to the metallic contacts.

On the contrary, the increase in the linear fluid velocity within the contacts bed can justify the improvement on the final extraction yield. In the rate decreasing period III, “desorption” of the heavier additives clearly controlled the extraction, so the process was favored by the high flow rate that swept away the oil.

### 3.4. Modifier effect

However, it was not possible to remove the last residue of oil adhering to the metal surface. This was not achieved either in the works cited in Table 1. So some authors attempted to use additives such as surfactants [5] like N-methyl pyrrolidone or water [3]. Others completed the CO<sub>2</sub> extraction with a final step using infrared radiation to vaporize the top oil layer [1].

**Table 4**  
Yields of mineral oil extraction when ethanol was added operating at 300 bar and at a CO<sub>2</sub> + ethanol mass flow rate of 3 g min<sup>-1</sup>.

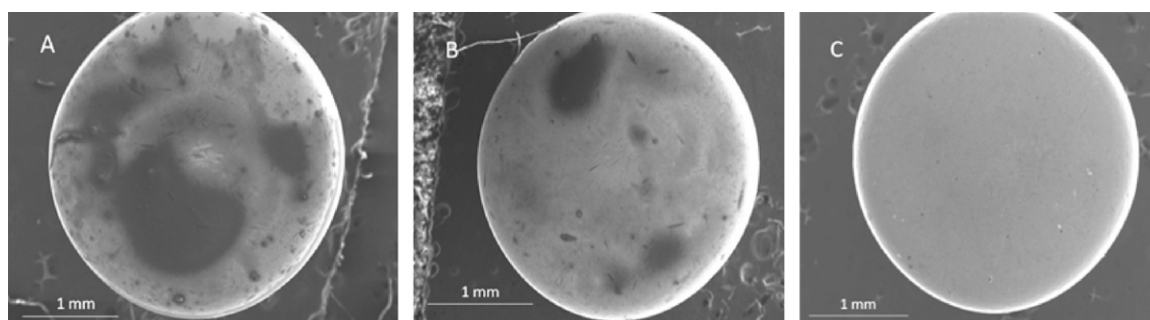
T (°C)	Ethanol (%)	t (h)	Yield (%)
37	0.0	5.0	87
37	2.5	4.0	88
37	5.0	4.0	95
37	10.0	4.0	99
110	0.0	4.0	95
110	5.0	3.5	100

We studied the addition of a cosolvent. Since the contacts are not consumer products, the introduction of a modifier was not supposed to give toxicity problems, but again the issue of the need to recover it, was raised. In this regard, ethanol is the best candidate because its ability as a modifier in the extraction of vegetable oils is fully demonstrated, it is not a toxic compound, and it is easy to recover. Moreover, in a closed cycle, ethanol may be recirculated with the CO<sub>2</sub>, leaving little or even no residue over the contacts [17].

Table 4 shows a comparison between the removal efficiencies of the lubricating oil extraction made by introducing increasing amounts of ethanol until 10% by weight at two temperatures.

The introduction of ethanol in the solvent mixture clearly improved the extraction yield. For example, working at 37 °C, the addition of 10% ethanol increased the extraction efficiency from 85% to 99%. However, to achieve complete removal of the oil, its introduction had to be combined with the use of high temperature. In return, the amount needed (at 110 °C) to achieve this was lower (5%).

In Fig. 6 this fact is demonstrated by electronic micrographs. When the effect of high temperature was combined with the addition of a small amount of ethanol as cosolvent, oil removal was complete, leaving the contact surface free of any residual stain. The contact became slightly obscured though; probably due to oxidation by the ethanol. However, this effect does not create an additional problem, since the processing of the contacts includes a further polishing step.



**Fig. 6.** Electronic microscopy images of the contacts top surface. Image A shows the experiment carried out at 37 °C using 10% ethanol. Image B shows the result at 110 °C when cosolvent was not introduced. In image C temperature and ethanol addition were combined (110 °C, 5% ethanol).

#### 4. Conclusions

This work demonstrates that supercritical CO<sub>2</sub> extraction is effective in removing lubricating oils from metallic contacts. However, the total elimination of the oil was difficult due to the formation of a strongly adhering oil layer on the metal surface, probably corresponding to the heavier fractions of paraffinic base and some additives. Similar results have been reported in other studies carried out in degreasing [1–10], though none of them have discussed the reasons.

The extraction rate at which “accessible” oil was best removed was maximized by increasing the pressure and temperature to promote the solubilization of the oil in CO<sub>2</sub>.

To remove the adhering layer (probably chemisorbed) it was also good to operate at higher pressure and higher temperature, because this favored the endothermic desorption and lowered the viscosity. In addition, to promote the oil’s “detachment”, “sweep” and subsequent solubilization, it was necessary to use high flow rate in the CO<sub>2</sub>-rich phase. Most of the investigations so far were done by arranging the pieces in fixed beds where CO<sub>2</sub> passed at laminar flow [1–6]. But, for this type of application, in which it is necessary to improve agitation, it would be appropriate to recycle the non-saturated CO<sub>2</sub> at high speed in order to approach a turbulent regime and promote elevated contact times.

Other extractor designs with other CO<sub>2</sub> flow types that would favor good contact with the parts and high stir can also be used. For example, Rebien et al. [6] proposed favoring the elimination of paraffinic lubricating oils in precision parts, using a rotary basket that could keep parts constantly agitated, although this type of operation could be detrimental to the integrity of other materials, such as those used in this work.

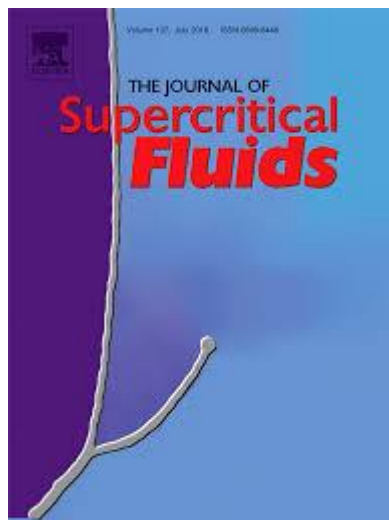
Perhaps the simplest option is to add a cosolvent. Its beneficial action is probably related to the formation of hydrogen bonds with the oil, as concluded in the extraction of vegetable oils [17]. In principle, in this application, its use would not be a major problem because ethanol is non-toxic and only small amounts are needed. Moreover, given its high solubility in CO<sub>2</sub>, in a hypothetical operation on an industrial scale, the ethanol could be recirculated together with this fluid. The small amount that would wet the contacts would easily evaporate without leaving any residue.

With either solution, the applicability of the method is high and there are good prospects for commercial development. For example, in the 13th European Meeting on Supercritical Fluids, Amsonic Precision Cleaning presented a pilot plant, 90 l capacity, with the rotating basket system described above for degreasing and removal of particles [6] and Chematur has already marketed a degreasing unit in Husqvarna, Sweden [18].

#### References

- [1] C. Zorn, R. Grimmie, Method and tool for cleaning cavities, US2009/0107523 A1 (2009).
- [2] H. Smith, G. Bohnert, Method to separate and recover oil and plastic from plastic contaminated with oil, US005711820A (1998).
- [3] Y. Irie, K. Morita, O. Masaaki, I. Akihisa, S. Masahico, Cleaning method and cleaning apparatus, US7507297 B2 (2009).
- [4] H. Fu, M. Matthews, Comparison between supercritical carbon dioxide extraction and aqueous surfactant washing of an oily machining waste, J. Hazardous Materials 67 (1999) 197–213.
- [5] G. Della Porta, M.C. Volpe, E. Reverchon, Supercritical cleaning of rollers for printing and packaging industry, J. Supercritical Fluids 37 (2006) 409–416.
- [6] D. Rebien, J. Mankiewicz, M. Bilz, S. Kareth, M. Petermann, Compressed carbon dioxide – an innovative washing fluid, in: Proceedings of the 13th European Meeting on Supercritical Fluids, The Hague (Netherlands), 2011.
- [7] M. Perrut, V. Perrut, Natural and forced convection in precision cleaning autoclaves, in: Proceedings of the 6th Meeting on Supercritical Fluids, Nottingham (UK), 1999.
- [8] E. Bjorklund, C. Turner, L. Karlsson, L. Mathiasson, The influence of oil extractability and metal part geometry in degreasing processes using supercritical carbon dioxide, J. Supercritical Fluids 9 (1996) 56–60.
- [9] S. Kyoko, Washing device, JP2009273483 (2009).
- [10] G. Bohnert, T. Hand, Method for removing contaminants from plastic resin, US2006/0223981 A1 (2006).
- [11] J. Tello, M. Viguera, L. Calvo, Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide, J. Supercritical Fluids 59 (2011) 53–60.
- [12] J. Wakao, S. Kagaei, Heat and Mass Transfer in Packed Beds, Gordon and Breach, New York, 1982.
- [13] L. Fiori, Supercritical extraction of sunflower seed oil: experimental data and model validation, J. Supercritical Fluids 50 (2009) 218–224.
- [14] G. Brunner, Gas Extraction, Springer, New York, 1994.
- [15] F. Tan, X. Qiao, J. Chen, Removal of chemisorbed lubricant on the surface of silver flakes by chemicals, Applied Surface Science 253 (2006) 703–707.
- [16] J.M. Del Valle, J.C. De La Fuente, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds: review of kinetic and equilibrium models, Critical Reviews of Food Science and Nutrition 46 (2006) 131–160.
- [17] M.J. Cocero, L. Calvo, SFE of sunflower seed oil using CO<sub>2</sub>–ethanol mixtures, J. the American Oil Chemists’ Society 73 (11) (1996) 1573–1578.
- [18] Chematur Commercial Plant. Available from: <http://www.chematur.se/>

## ANEXO II



**The parameters that affect the supercritical extraction of 2,4,6-trichloroanisol from cork**

Miguel Viguera, C. Prieto, J. Casas, E. Casas, A. Cabañas, Lourdes Calvo

The Journal of Supercritical Fluids

Available online 27 March 2018 In Press, Corrected proof

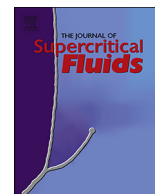
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.017>





Contents lists available at ScienceDirect

## The Journal of Supercritical Fluids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/supflu](http://www.elsevier.com/locate/supflu)

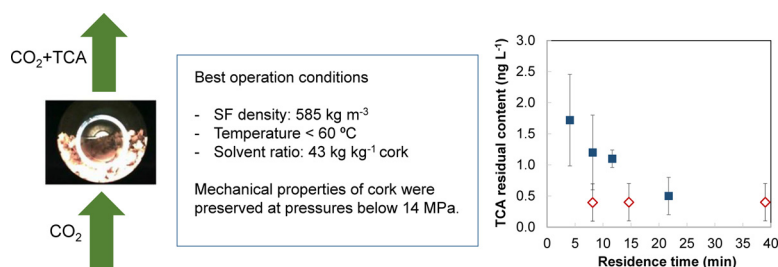
## The parameters that affect the supercritical extraction OF 2,4,6-trichloroanisol from cork

Miguel Viguera<sup>a</sup>, C. Prieto<sup>a</sup>, J. Casas<sup>a</sup>, E. Casas<sup>b</sup>, A. Cabañas<sup>a</sup>, Lourdes Calvo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> AINIA Centro Tecnológico, Parque tecnológico de Valencia, 46980 Paterna, Spain

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Supercritical extraction  
 Cork granules  
 TCA removal  
 Cork mechanical properties

### ABSTRACT

The contamination of wine by 2,4,6-trichloroanisol (TCA) derived from the cork stopper is a huge problem for the wine industry. This work shows the results of TCA extraction using supercritical CO<sub>2</sub>. Cork granules (6% moisture) were placed forming a fixed bed within a high-pressure vessel. The CO<sub>2</sub> was made to continuously flow over this. The TCA removal was compared at different operating conditions (pressure, temperature, flow rate or extraction time). TCA removal was not possible in dried cork. Density had a positive impact in TCA removal due to the solvent capacity increase. An increase in the supercritical fluid temperature over 60 °C impaired the TCA extraction. High residence times benefited the extraction. At high CO<sub>2</sub> density of 585 kg m<sup>-3</sup>, TCA elimination below the detection level was achieved in 8 min residence time. This required relatively low solvent to cork mass ratios (43 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>).

### 1. Introduction

The cork is a natural polymeric material based on suberin obtained from the outer of the cork oaks (*Quercus suber* L.). Its average composition is suberin (45%), lignin (27%), polysaccharides (12%), tannins (5%) and ceroids (5%). Molecules of interest such as fatty acids, terpenes and long chain aliphatic compounds can also be found [1,2]. Some of the triterpenes such as frideline, betulin, betulinic acid were extracted by organic solvents but it was recently proposed the use of supercritical CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) [3]. Additionally, metabolites produced by

various microorganisms can be found in cork.

The cork industry is of major importance in countries such as Portugal and Spain, the largest producers in the world, although Corsica, Sardinia and Turkey also produce it [4]. Cork is used mainly as a stopper for wine bottles and sparkling wines (cava and champagne), and as an insulator, in packaging or for construction.

Currently, the industry demands more than 12 billion stoppers per year [5]. But the contamination of wine with aromas derived from the cork stopper of the bottle is a huge problem for the wine industry, with its global impact already valued at more than \$ 100 billion in 1995 [6].

\* Corresponding author.

E-mail address: [lcalvo@ucm.es](mailto:lcalvo@ucm.es) (L. Calvo).

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.017>

Received 6 October 2017; Received in revised form 21 March 2018; Accepted 22 March 2018  
 0896-8446/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Although there may be other compounds responsible for the degradation of the organoleptic qualities of wine, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is the main one. Fuller estimated that between 2 and 5% of wine bottles are contaminated by TCA [6] whereas Soleas et al. analyzed more than 2000 wine bottles and detected TCA in 6.1% of them [7].

The most important reason why this compound ruins the enjoyment of a glass of wine is the very low detection threshold which is situated below  $5 \text{ ng L}^{-1}$ . This fact makes any procedure aimed at eliminating such contamination very demanding and analytical methods having a very low detection limit.

The TCA molecule is generated in the cork by the action of a series of microorganisms, mainly filamentous fungi by methylation of chlorophenol into an anisole [8]. To prevent contamination, stopper manufacturers monitor the level of TCA in them as well as in the water where they boil the material for further analysis [9].

Currently, cork stoppers are available in three distinct categories. The top-quality cork is the solid cylindrical cork directly extracted from the bark of the cork oak. There are also lower quality corks made of agglomerated granules or of two solid cork disks at the ends of agglomerated granules.

The use of  $\text{scCO}_2$  in the extraction of TCA was presented by Chouchi et al. in 1997 [10]. At present, there are several industrial processes that use supercritical technology to eliminate TCA and other harmful contaminants from cork granules. These processes are patented in many countries [11–13]. In particular, OENEO has cork treatment plants in Spain and France commissioned by Natex [14,15]. However, the information published on this operation is practically non-existent. In solid cork, an exploratory work was recently presented in a conference [16]. This work analyzes the parameters that mostly affect the TCA removal from cork granules using supercritical  $\text{CO}_2$ .

## 2. Materials and methods

Cork of 2–3 mm standard granulometry was used with a moisture in equilibrium with the environment of  $6 \pm 1\%$  depending on the time of year and density of  $55 \text{ kg m}^{-3}$ . It contained a TCA load of  $8.5 \pm 0.5 \text{ ng L}^{-1}$  (ppt). The  $\text{CO}_2$  (99.99%) was supplied by Carbueros Metálicos, Spain.

### 2.1. Moisturization of cork

To obtain cork with different moistures, the cork was introduced in a thermostatic closed bath at  $60^\circ\text{C}$ , placing it on a perforated tray above the water level. This was maintained until the desired moisture was reached. It was then collected and allowed to cool prior to extraction in an enclosed can to maintain the reached moisture.

### 2.2. Determination of moisture in the cork

The moisture content of cork before and after the treatment was measured by weight loss. 5 g of cork were placed in a beaker and placed in an oven previously heated to  $105^\circ\text{C}$ , maintaining them until reaching a constant weight. Measurements were performed on a minimum of six samples.

### 2.3. Cork compaction study

The behavior of the  $\text{CO}_2$ -cork mixture under supercritical conditions was visualized in a high-pressure cell of variable volume. The cell consisted of a stainless steel cylindrical chamber which contained a movable piston that allowed the internal volume of the cell to be varied. The content of the cell was illuminated and viewed through a sapphire window using a borescope and a digital camera connected to a computer. The cell could be heated to  $100^\circ\text{C}$  with a silicone heating tape. The temperature inside the cell was controlled and measured by a type J thermocouple housed inside. The sample could be compressed (up to

30 MPa) and decompressed by moving the piston using a manual pressure generator that used water as a hydrostatic fluid. The pressure was measured directly on the part of the cell containing the sample by means of a pressure transducer.

9.2510 g of  $\text{CO}_2$  were added together with 0.4568 g of cork. Observations of the mixture were carried out at pressures between 14.0 and 20.0 MPa and temperatures between  $40$  and  $60^\circ\text{C}$ .

On the other hand, to determine the degree of compaction that took place in the bed during the supercritical extractions, different operating and depressurizing conditions were evaluated. The experiments were carried out in the installation described next, with increasing amounts of cork granules, occupying between 70 and 100% of the extractor volume. The supercritical extraction cycle was carried out as explained in the following section; while the depressurization was carried out with different rates of  $\text{CO}_2$  output. After the total depressurization, the extractor was opened to check the state of compaction and deformation of the cork granules by visual inspection.

### 2.4. Supercritical extraction procedure

For the supercritical extraction of TCA in cork granules, a 100-mL stainless steel cylindrical extractor was used, with a length to diameter ratio of 5. The temperature inside was controlled by a heating tape located on the outside of the extractor. The  $\text{CO}_2$  flow rate was fixed with a membrane pump (Milroyal D, Dosapro Milton Roy, France), while the pressure was controlled by a back-pressure regulator (BPR, 26-1761-24-161, TESCO Europe, Germany) valve. The amount of  $\text{CO}_2$  passing through the bed was measured by a flow meter (M-10 SLPM-D, Alicat Scientific, USA) at the end of the line, this procedure was described in previous works [17]. The 45.0 MPa assays were developed in the pilot plant of AINIA (Valencia) using a 5 L extractor.

Approximately 4 g of cork granules with an accuracy of  $\pm 0.005$  g were introduced into the extractor forming a bed that occupied around 70% of the volume of the extractor. Higher amounts were introduced in assays aimed to evaluate the impact of the extractor filling degree.

The extractor was closed and preheated to the desired temperature. After that, the  $\text{CO}_2$  was pumped in, and, once the desired pressure was reached, the BPR was opened to provide a continuous flow of the  $\text{CO}_2$  through the cork. The residence time was calculated as the void volume of the extractor divided by the volumetric flow rate of the solvent. At the end of the extraction, the extractor was slowly depressurized and the exhausted cork unloaded for analysis.

### 2.5. Determination of TCA in cork

The 2,4,6-trichloroanisole of the cork was analyzed by a procedure based on the standard UNE 56930: 2005 in the Centro Tecnológico da Cortiça, Portugal. The maceration was carried out by immersing the sample in a 12% hydroalcoholic solution in a 2-l vessel. The liquid was analyzed using the Solid Phase Micro-Extraction (SPME) technique and Gas Chromatography analysis with detection of mass–mass spectrometry (GC–MS/MS) with automatic injection. Because of this measure, the residual TCA concentration in the cork granules is reported in  $\text{ng L}^{-1}$ . The detection limit was  $0.4 \text{ ng L}^{-1}$  (ppt). The data presented are the mean of at least 3 trials. The experimental error was deduced from the repetition of certain trials six times. The large deviation of the data is due to the difficulty on measuring such low TCA quantities on quite small cork samples.

### 2.6. Determination of the mechanical properties of cork

The hardness of the cork after the supercritical extraction was determined with a texturometer as was previously used in other natural polymers and pharmaceutical gels and semisolids [18]. An image of the same is shown in Fig. 1, where the probe used for compression and the arrangement of the cork granule in the cell are visualized. The test

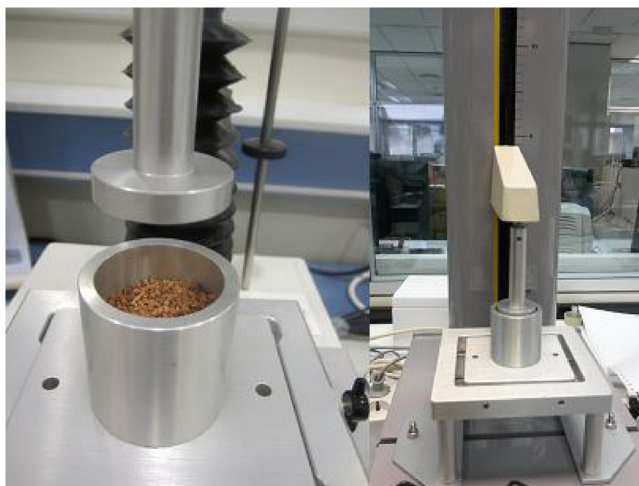


Fig. 1. Image of the texturometer used to perform the mechanical tests on the cork granule.

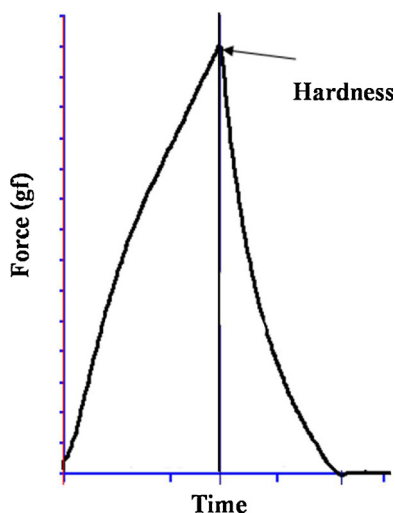


Fig. 2. Example of the evolution of the compression force over time.

consisted of a compression of the cork samples (3.5 g) with a flat section probe (35 mm) at a defined speed ( $0.5 \text{ mm s}^{-1}$ ) with a fixed compression distance (20 mm). Once the compression distance was reached, the plunger ascended to the starting position. The equipment recorded the compression force curve. Hardness is related to the force required to achieve a certain deformation, in this case a certain height, so it was measured as the height of the peak in the compression curve as shown in Fig. 2, in units of gram-force (gf). For example, the hardness of the cork granules without any treatment was 19100 gf.

### 3. Results and discussion

The extraction of the TCA was carried out by keeping the bed of cork granules in contact with a continuous flow of supercritical solvent. During the operation, several transportation mechanisms took place. In the first place, the cork particles absorbed  $\text{CO}_2$ . Fig. 3 shows two images of the interior of a view cell with the  $\text{CO}_2$ -cork mixture. Although the piston position in the images is different and therefore the proximity of the cork particles to the observation window varied, the swelling of the cork in the presence of  $\text{CO}_2$  was clear. The TCA was then dissolved (as defined by equilibrium). Subsequently, the TCA molecules were transported to the surface of the particles (internal transport) and, finally, they passed from the surface to the bulk of the stream of  $\text{CO}_2$  that crossed the bed.

The images of the view cell also showed that the cork did not float on the  $\text{CO}_2$  phase although the density of the cork was much smaller than that of the  $\text{CO}_2$ . This could mean that the  $\text{CO}_2$  penetrated the pores of the cork granules soaking them.

Many parameters may be relevant to the operation. First, the condition of the solid in terms of the moisture content of the particles and the bed that formed in the extractor. Then, the process variables, mainly pressure, temperature and flow rate. This section presents and discusses the influence of all these parameters on the TCA elimination from the cork. Finally, the mechanical quality of treated cork was studied.

#### 3.1. The impact of the cork moisture

The starting moisture of the solid matrix significantly affects the internal transfer. The absence of water makes it difficult for the solvent to penetrate due to shrinkage of the structure; thus, reducing the extraction yield [19,20]. However, an excess water could create a barrier to the TCA and the solvent transportation, from and to, the bulk of the supercritical fluid. For these reasons, the water content of the solid needed to be optimized [21].

Table 1 shows the result of the extraction when using corks of different degrees of moisture. Dried cork had an average moisture content of less than 4%; the cork in equilibrium with the environment humidity had a water content of about 6% while the moistened cork had a water content of 12%. With this latter product, it was reproduced the moisture that the cork granules had after a washing by steam entrainment.

Under equal conditions of  $\text{CO}_2$  density and residence time, the extraction from wet cork was much more effective than with dried cork ( $< 4\%$ ). In this latter material, it was necessary to operate with high residence times (47 min) to remove the TCA below the detection limit. Contrarily, TCA removal below the detection level was achieved with cork wet (12%) when residence time was 8 min. The phenomenon of improved extraction performance when the cork was wet is probably due to the swelling of the solid matrix by the water which allows a better penetration of  $\text{CO}_2$  and a better TCA diffusion outward.

The following tests were carried out on the cork with the moisture (6%) in equilibrium with the environment humidity.

#### 3.2. Compaction tests

One of the first concerns regarding the use of supercritical  $\text{CO}_2$  in cork treatment was that the operating pressure could cause compaction of the cork granules. Therefore, trials were conducted to verify this fact and to determine under what conditions it might occur. Thus, two parameters that a priori could be relevant in the occurrence of this phenomenon were investigated: the bed occupancy (estimated as percentage of the volume occupied) and the rate of depressurization. The results are shown in Table 2. When the filling degree of the extractor was higher than 73% and the depressurization was faster than  $0.5 \text{ MPa min}^{-1}$ , the cork granules were compacted forming a “stopper” difficult to remove from the extractor. The rest of the assays were conducted fixing the extractor occupancy and the depressurization rate to these values.

#### 3.3. Effect of operating conditions

Density directly affects the dissolving capacity of the supercritical solvent and it is strongly influenced by the operating conditions. An increase in pressure increases the density while the opposite effect occurs with a temperature increase.

On the other hand, an increase of temperature favors the vaporization of the solute (as expressed in the Antoine equation). In this sense, temperature has conflicting effects on the solubilization of solutes by supercritical solvents. Consequently, it is necessary to study

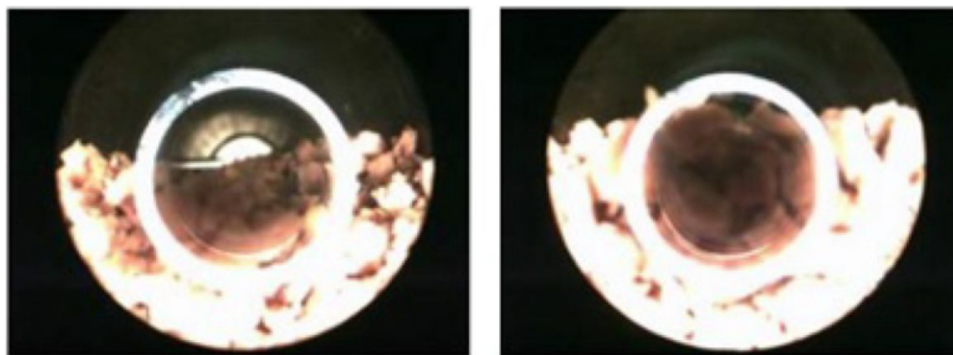


Fig. 3. Photographs of the cork inside the view cell at different pressure and temperature conditions. The image on the left corresponds to a CO<sub>2</sub>-cork mixture at 40 °C and 14.0 MPa, the image on the right corresponds to a CO<sub>2</sub>-cork mixture at 60 °C and 20.0 MPa.

each system to determine which of the effects has the greatest impact. This depends on the operating pressure.

In addition, the modification of these two operating parameters may significantly vary the mass transfer properties of CO<sub>2</sub> and the solute. Therefore, it is difficult to predict the influence of the operating variables in the extraction of a specific solute from a natural matrix.

### 3.3.1. Density

One of the most significant characteristics of supercritical fluids is the wide range of densities that can be reached by slightly varying pressure and temperature, being one of the keys to the great selectivity of supercritical fluids as extraction medium. Table 3 shows the influence of the solvent density on the TCA removal from cork granules. Temperature of these assays was 40 °C. An increase in the density of the fluid benefited the extraction in a marked way. To achieve the target TCA residual content of less than 0.5 ng L<sup>-1</sup>, it was necessary to raise the density of the fluid to 580 kg m<sup>-3</sup>. This was due to the direct improvement in CO<sub>2</sub> dissolving power.

However, the beneficial effect of increasing dissolution capacity upon increasing pressure was not fulfilled throughout the range of pressures explored. As can be seen in Table 3, there was a point from which the use of excessive high pressure worsened the extraction efficiency. This may be due to the noticeable increase in the viscosity of the CO<sub>2</sub> (shown in Table 3) hampering the access and penetration into the tortuous pores of the cork granules. Similarly, the TCA transportation from the granules to the bulk fluid would be retarded at very high pressures. Besides at 45 MPa, it was observed that the cork got crushed as described in section 3.6. This probably worsened the transportation within the granules.

### 3.3.2. Temperature

The residual concentration of TCA in the cork granules after extraction at 12.0 MPa and different temperatures is shown in Fig. 4. The CO<sub>2</sub> density is shown on top of the symbols. An increase in the temperature of the fluid impaired the extraction of the solute because of the

Table 1

Effect of cork moisture and residence time in the extraction of TCA from cork. CO<sub>2</sub> density = 326 kg m<sup>-3</sup>.

	CO <sub>2</sub> flow rate (g min <sup>-1</sup> )	Solvent ratio (kg CO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> kg cork <sup>-1</sup> )	Residence time (min)	Operation time (min)	Residual TCA (ng L <sup>-1</sup> )
Dried cork (< 4%)	8	120	4	30	3
	4	60	8	60	2
	1.5	23	22	160	1
Cork in equilibrium with the environment humidity (6%)	0.7	23	47	340	< 0.4
	8	120	4	30	2
	4	60	8	60	1
Wet cork (12%)	3	42	12	80	< 0.4
	8	120	4	30	1
	4	60	8	60	< 0.4

Table 2

Degree of compaction of the cork granules in the extractor depending on the extractor occupancy and the depressurization speed. Operating conditions: 15.0 MPa, 60 °C; bulk density of the cork in the bed: 55 kg m<sup>-3</sup>; estimated bed porosity: 0.50.

Filling degree of the extractor (%)	Depressurization velocity (MPa min <sup>-1</sup> )	Observed compaction
100	1.5	Yes
100	1.0	Yes
84	0.5	Some
73	0.5	No
52	0.5	No
48	0.5	No

Table 3

The impact of operating pressure on the properties of the supercritical solvent on the removal efficiency of the TCA. Temperature was 40 °C. CO<sub>2</sub> flow rate, 4 g min<sup>-1</sup>; extraction time, 60 min.

Density (kg m <sup>-3</sup> )	Pressure (MPa)	Viscosity (Pa s 10 <sup>-5</sup> )	Residual TCA (ng L <sup>-1</sup> )
37	2	2	5
580	9.5	4	< 0.4
736	14	7	< 0.4
975	45	11	1

decrease in the density of the CO<sub>2</sub>. Extraction was performed in the temperature range where the impact of the decrease in density was more intense than that of increasing TCA volatility. The vapor pressure of the TCA is 3.04 Pa at room temperature; while its boiling temperature is 241 °C at atmospheric pressure, which means that the TCA is a low volatile compound.

Table 4 shows the solubility of TCA in supercritical CO<sub>2</sub> obtained by Maricato et al. [21] in which isothermal (40 °C) and isobaric (14.0 MPa)

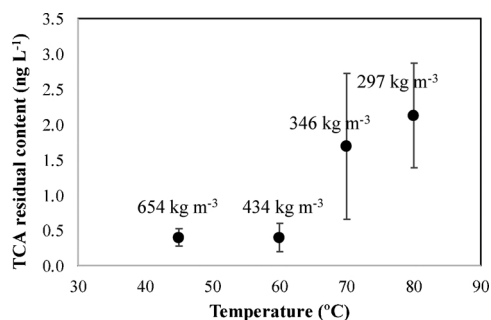


Fig. 4. Influence of temperature on the residual concentration of TCA in cork after carrying out extractions at 12.0 MPa, CO<sub>2</sub> flow rate, 4 g min<sup>-1</sup>; extraction time, 60 min.

Table 4

Solubility of TCA in CO<sub>2</sub> at different conditions [20].

P (MPa)	T (°C)	TCA solubility (kg TCA kg <sup>-1</sup> CO <sub>2</sub> )
10.0	40	1.5·10 <sup>-5</sup>
12.0	40	1.6·10 <sup>-5</sup>
14.0	40	2.2·10 <sup>-5</sup>
16.0	40	4.4·10 <sup>-5</sup>
14.0	40	2.2·10 <sup>-5</sup>
14.0	50	1.5·10 <sup>-5</sup>
14.0	60	0.4·10 <sup>-5</sup>

conditions were explored. The solubility increased directly as the pressure increased. In the opposite sense, the increase of temperature decreased the solubility of the TCA in CO<sub>2</sub>. These bibliographical results are consistent with our observations and advise to work at low temperatures to remove the TCA where the density of the CO<sub>2</sub> is highest.

### 3.4. The influence of CO<sub>2</sub> flow rate

An increase in the CO<sub>2</sub> flow rate enhances linear velocities, Re numbers and so external mass transfer coefficients. Moreover, when the solvent flow rate is incremented, the global driving force is increased, so a positive effect on extraction rate is achieved, thereby, reducing the necessary extraction time. However, operating at high flow rates reduces the residence time in the extractor and increases pumping and capital costs. Perrut demonstrated that the price of a supercritical installation delivered on a turnkey basis varies near to a straight line with a slope of 0.24 versus the log of the design flow rate [22]. Therefore, this parameter has to be optimized.

In operation with continuous passage of the CO<sub>2</sub> over the bed of the cork granules with no solvent recirculation, the residence time of the CO<sub>2</sub> in the extractor was the time available to remove the TCA. Fig. 5 shows the influence of the augmentation of residence time at the expenses of reducing the solvent flow rate on the TCA removal efficiency, at two dissimilar densities. At high density, the target residual TCA content was achieved in 8 min residence time. On the contrary, at low CO<sub>2</sub> density of 326 kg m<sup>-3</sup>, to achieve a satisfactory extraction efficiency, 22 min residence time was required. This involved relatively low solvent ratios (23 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> cork).

### 3.5. Effect of the solvent mass ratio (CO<sub>2</sub> consumption)

The ratio between the amount of CO<sub>2</sub> used in the extraction, and the amount of raw material, is a fundamental parameter on an industrial scale because it determines the economic viability of the process in terms of raw materials consumption and compression costs.

Fig. 6 shows the effect of the mass ratio on the extraction of TCA from the cork granules with CO<sub>2</sub> at two different densities (326 kg m<sup>-3</sup> and 585 kg m<sup>-3</sup>). At high density, the total elimination of TCA was

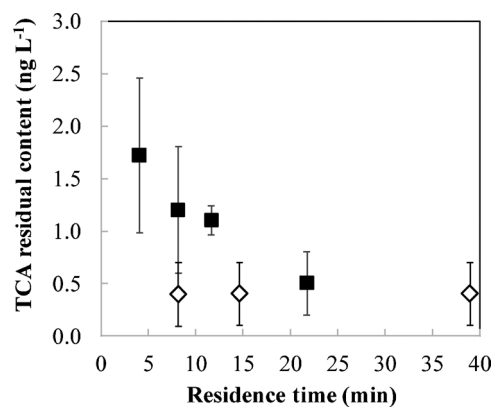


Fig. 5. Residual concentration of TCA in the cork granules after carrying out extractions at different residence times, ■  $\rho = 326 \text{ kg m}^{-3}$  (70 °C, 11.5 MPa),  $\rightarrow \rho = 585 \text{ kg m}^{-3}$  (50 °C, 12 MPa). CO<sub>2</sub> flow rate was 1.5, 3, 4 and 8 g min<sup>-1</sup>. The CO<sub>2</sub>-cork mass ratio was 60.

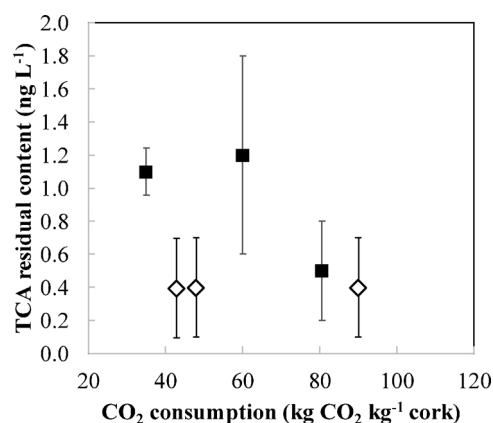


Fig. 6. Effect of CO<sub>2</sub>-cork mass ratio on the residual content of TCA in the cork granules at different densities: ■  $\rho = 326 \text{ kg m}^{-3}$  (70 °C, 11.5 MPa),  $\rightarrow \rho = 585 \text{ kg m}^{-3}$  (50 °C, 12 MPa). CO<sub>2</sub> flow rate was 4 g min<sup>-1</sup>. Extraction time was increased from 35 to 90 min.

achieved at low solvent mass ratios, 43 kg CO<sub>2</sub> per kg of cork; on the contrary, at low density (326 kg m<sup>-3</sup>) a high CO<sub>2</sub> consumption, > 80 kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> cork, was required to reduce the TCA below the detection limit.

From the solubility data of TCA in supercritical CO<sub>2</sub> it is possible to know how much solvent would be required at minimum to extract all the TCA that was retained in the particles of the cork. At 12.0 MPa and 60 °C, solubility was 1.5 · 10<sup>-4</sup> kg TCA kg<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> [20]. If there was an initial concentration of 8.5 ng TCA g<sup>-1</sup> cork and that 4 g of cork were placed into the extractor, 6 · 10<sup>-6</sup> kg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> cork would be necessary. This value was enormously lower than the actual amount of CO<sub>2</sub> that was required to remove the TCA even at the best conditions (Fig. 6). The use of much more CO<sub>2</sub> was due to the slow diffusion inside the cork.

### 3.6. Study of the mechanical properties of cork

Finally, the impact of supercritical extraction on the mechanical properties of cork was studied. Fig. 7 shows the hardness of the cork after being subjected to a treatment of supercritical CO<sub>2</sub> extraction at different pressures at 40 °C. The cork granules did not suffer any significant reduction of hardness in the medium-low pressure range. But they lost 20% of their hardness operating at high pressures of 45.0 MPa being the deformation permanent. Lagorce-Tachon et al. [2] demonstrated that the stress-strain curves for cork are characterized by three steps: an elastic region up to a strain around 5% followed by a large

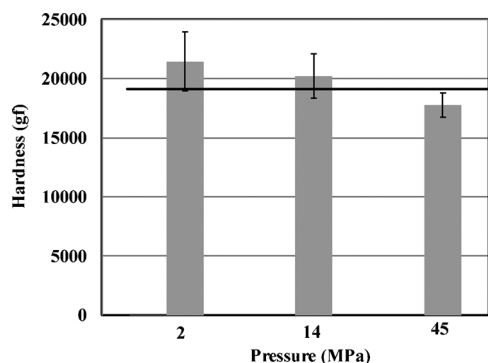


Fig. 7. Hardness of cork after supercritical extraction at increasing pressures. Temperature was 40 °C. The solid horizontal line shows the hardness of the raw material.

plateau between 5% and 60% which corresponds to the progressive buckling of cell walls, and finally above 70% a sharp increase in stress corresponding to the densification of the material. The hardness reduction of the cork granules at the highest pressure may be justified by the fact that the elastic region of the material was exceeded causing densification of the material.

#### 4. Conclusions

Internal mass transport played a significant role in the global rate by which TCA was extracted from cork granules with supercritical CO<sub>2</sub>. Thus, a minimum contact time between the CO<sub>2</sub> and the cork was necessary that should be provided by relatively low CO<sub>2</sub> flow rates. TCA extraction from the cork was improved by increasing density because it directly affected solvent capacity, but there was a limit in pressure due to the worsening of the mass transport properties and of the cork hardness; thus, pressure had to be maintained around 12.0–14.0 MPa. Temperature negatively affected extraction above 60 °C. To preserve the mechanical properties of cork during the treatment it was necessary to keep a filling degree of the extractor to about 70% and control the depressurization rate to not more than 0.5 MPa min<sup>-1</sup>.

#### References

- [1] H. Pereira, Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber*, Wood Sci. Technol. 22 (1988) 211–218.
- [2] A. Lagorce-Tachon, T. Karbowiak, D. Champion, R.D. Gougeon, J.P. Bellat,

- Mechanical properties of cork: effect of hydration, Mater. Des. 82 (2015) 148–154, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2015.05.034>.
- [3] A. Sen, M. De Melo, A.J.D. Silvestre, H. Pereira, C.M. Silva, Prospective pathway for a green and enhanced friedelin production through supercritical fluid extraction of *Quercus cerris* cork, J. Supercrit. Fluids 97 (2015) 247–255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.008>.
- [4] V. Castola, B. Marongiu, A. Bighelli, C. Floris, A. Lai, J. Casanova, Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO<sub>2</sub> extracts, Ind. Crops Prod. 21 (2005) 65–69, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.12.007>.
- [5] Associação Portuguesa da Cortiça, (2017) <https://www.apcor.pt/en/products/cork-stoppers/>.
- [6] P. Fuller, Cork taint: closing in on an industry problem, Wine Ind. J. 10 (1995) 58–60.
- [7] G.J. Soleas, J. Yan, T. Seaver, D.M. Goldberg, Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1032–1039, <http://dx.doi.org/10.1021/jf011149c>.
- [8] T.H. Lee, R.F. Simpson, Microbiology and chemistry of cork taints in wine, in: G.H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Bio/Technology, G. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 1993, pp. 353–372.
- [9] A.M. Peres, P. Freitas, L.G. Dias, M.E.B.C. Sousa, L.M. Castro, A.C.A. Veloso, Cyclic voltammetry: a tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process, Talanta 117 (2013) 438–444, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.039>.
- [10] M. Chouchi, D. Maricato, L. Nunes da Ponte, SFE of trichloroanisole from cork, The 4th International Symposium on Supercritical Fluids, Senday, Japan, 1997.
- [11] COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE, Method for Treating Cork and Extracting Organic Compounds from Cork, with a Dense Fluid Under Pressure, FR2798879, (1999).
- [12] AINIA, Procedimiento para extraer del corcho compuestos indeseados diversos, ES2416554 A1, 2011.
- [13] G. Sanjuán, Method for Extraction Organic Compounds from Granulated Cork, EP2404647, (2012).
- [14] H. Lack, E. Seidlitz, Industrial cleaning of cork with supercritical CO<sub>2</sub>, 3rd Int. Meet. High Press. Chem. Eng. Erlangen, Germany, 2006.
- [15] Natex, Rice Treatment, New Application for Supercritical Extraction, (2017) [https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/rice\\_treatment.pdf](https://www.natex.at/fileadmin/content/PDFs/rice_treatment.pdf). (Accessed 1 January 2017).
- [16] A.C. Lopes Cardoso, A. Paiva, I.M. Allegro, R.P. Moreira da Silva, J.A.S. Lopes, M. Manic, V. Najdanovic-Visak, M. Nunes da Ponte, Cleaning of wine bottle cork stoppers with high pressure carbon dioxide, 16th European Meeting on Supercritical Fluids, Lisbon, Portugal, 2017.
- [17] M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, M.I. Barrera, L. Calvo, The removal of lubricating oils from metallic contacts with supercritical CO<sub>2</sub>, J. Supercrit. Fluids 73 (2013) 51–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.09.015>.
- [18] D.S. Jones, A.D. Woolfson, A.F. Brown, Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers, Int. J. Pharm. 151 (1997) 223–233, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)04904-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(97)04904-1).
- [19] G. Brunner, Gas Extraction, Springer, New York, 1994.
- [20] R. Lack, E. Gamse, T. Marr, Extraction from solids, in: G. Bertucco, A. Vetter (Eds.), High Press. Process Technol. Fundam. Appl. Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [21] L. Maricato, Étude de l'extraction du trichloroanisole par CO<sub>2</sub> supercritique, Universidade Nova de Lisboa, 1996 (Master Thesis).
- [22] M. Perrut, Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues, Ind. Eng. Chem. 39 (2000) 4531–4535.

## ANEXO III



**The process parameters and solid conditions that affect the supercritical  
CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae**

M.Viguera, A.Marti, F.Masca, C.Prieto, L.Calvo

The Journal of Supercritical Fluids

Volume 113, July 2016, Pages 16-22

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.001>





# The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae



M. Viguera, A. Marti, F. Masca, C. Prieto, L. Calvo\*

Department of Chemical Engineering, Universidad Complutense de Madrid, Av Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 March 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 11 March 2016

### Keywords:

Supercritical extraction

Microalgae

Oil

Operational parameters

Moisture content

Pretreatment

## ABSTRACT

This paper describes the impact that process parameters and solid conditions have on the supercritical extraction of oil from *Chlorella protothecoides* that are grown in heterotrophic conditions. Pressure was tested from 150 to 300 bar and temperature from 35 to 70 °C. In the harshest conditions, the extraction curve slope was close to the theoretical oil solubility. Mass transfer controlled the global rate. Mechanical or thermal cell wall rupture improved the extraction rate; however, it was dependent on the microalgae humidity. The extraction rate on samples that had over a mass fraction of 30% moisture content was greatly reduced. Cell disruption methods, such as sonication or microwaving, were not useful on the wet biomass because the water created a barrier. External mass transfer improved with flow rate (from 1 to 5 g min<sup>-1</sup>) but a minimum contact time was required. The optimum was 3 g min<sup>-1</sup> (72 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg biomass<sup>-1</sup>). A maximum oil fraction of 210 g kg<sup>-1</sup> biomass ( $w_o = 21\%$ ) was achieved.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microalgae are currently considered to be a promising feedstock for biodiesel. Previous research has indicated that the heterotrophic growth of this microscopic algae leads to higher lipid production [1] and does not require a light source for growth [1,2]. The *Chlorella protothecoides* was selected for this research since it is a strain of algae that gives high oil yields. In terms of lipid production, work by Xu et al. [3] confirmed that over 55% of the dry weight of these microalgae was formed by lipids under heterotrophic growth, while only an oil mass fraction ( $w_o$ ) of 14% was achieved when they operated in autotrophic metabolism. Furthermore, the fatty acid profile of microalgae is better for biodiesel production [2].

The regular and continuous supply (fed batch) of nutrients while avoiding inhibitory concentrations is the best mode of maximizing the growth of algae [4]. However, important obstacles still need to be overcome before microalgae lipid production can become cost-effective. Among other factors, a high amount of nutrients are required for the growth of microalgae and high productivities that are selectively directed to lipid accumulation are necessary. Research by Martin et al. [5], examined the use of different residual raw materials to minimize the operational costs related to C supply. Castor oil was used to simulate waste oils, milled straw was used to simulate plant biomass, glycerol was used because it is a

byproduct of biofuel production for which there are not enough applications today, and simulated olive oil mill and cattle manure effluents were used for their high C and other nutrients. Effective growth was observed in all cases, demonstrating that these carbon sources were assimilated by the microorganism.

To prepare the raw material, lipid microalgae extraction should follow a number of steps such as dewatering, cell disruption, drying, and particle size reduction [6]. These processes consume high levels of energy.

Water content is one of the most complex parameters that influence the effectiveness of supercritical extraction, especially in raw materials that are obtained from a cell culture. Dewatering can be achieved by flocculation, air flotation, filtration, and centrifugation. Even though filtration and centrifugation can yield near 100% harvest, both of these methods are economically unfeasible [7,8]. On the contrary, flocculation [9] and air flotation appear to represent the most scalable techniques [10]. To reduce the necessary drying effort, this work explores the minimum amount of water that is required in the raw material to perform supercritical extraction.

A method of cell disruption is usually applied to enhance the efficiency of the posterior extraction. Most green microalgae, including *Chlorella*, store neutral lipids (triacylglycerols) within the cytoplasm, forming round lipid (oil) bodies [11]. Their membrane (made of a monolayer of phospholipids) and the cell wall act as a barrier that prevents carbon dioxide penetration and oil diffusion. Current cell disruption methods can be classified into two groups: mechanical and non-mechanical [6]. Chemical substances, such as detergents, lytic enzymes, or osmotic shocks,

\* Corresponding author.

E-mail address: [lcalvo@ucm.es](mailto:lcalvo@ucm.es) (L. Calvo).

have been successfully used in lab-scale studies; however, only few mechanical methods either alone or with the intervention of enzymes/chemicals can be scaled up for industrial applications [12]. Lyophilization is also widely used for simultaneous cell opening and drying [13]. However, this procedure cannot practically be employed on a commercial scale. Of the various mechanical techniques that are available, milling stands out; however, this procedure requires a high amount of energy. As such, alternative solutions, such as ultrasonication, microwaving, autoclave, high-pressure homogenization and combinations of several of these, have been the subject of recent research [13–16]. This work analyzes the effect that some of these techniques have on centrifuged microalgae sludge.

The further extraction of the produced lipids is another key bottleneck of the process. Conventional extraction uses toxic organic solvents that need to be recovered using distillation. Furthermore, the extraction is not selective; as such, the lipids that are of interest to biodiesel are accompanied by polar lipids, pigments and other compounds that must be removed via expensive and complex downstream operations [6]. On the contrary, supercritical extraction is a highly selective method of obtaining non-polar components by controlling pressure and temperature. This extraction technique uses a fluid over its critical point. Within this condition, the fluid diffuses in a similar fashion to gas and demonstrates a solvent capacity that is close to organic liquids [17].

The objective of this work was to explore the extraction with supercritical carbon dioxide of the lipids contained in *C. protothecoides* cells. The parameters that affect the extraction yield were analyzed by considering the impact they had on the mechanisms of transport and on equilibrium. The results are expressed in terms of the yield accumulated during the course of extraction compared to the amount of CO<sub>2</sub> consumed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgae growth

*Chlorella protothecoides* (UTEX 249) was purchased from The Culture Collection of Algae at the University of Texas in Austin.

The basal medium was similar to that described in Chen and Walker [4]. The components were purchased from Scharlau Chemie, S. A., distributed by Scharlab, S.L., Spain, and were employed as follows (per liter): 0.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 mg Vitamin B1 (thiamine hydrochloride), and 1 ml A5 solution, formed by 2.9 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.8 g MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.22 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.08 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0039 mg NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. This medium was supplemented with glucose at 15 g l<sup>-1</sup> and 4 g l<sup>-1</sup> yeast extract.

Microalgae cells were grown in Petri dishes in the solid culture medium with 15 g l<sup>-1</sup> of bacteriological agar (Bacteriological agar, Scharlau Chemie, S. A., Scharlab, S.L., Spain) at 28 °C for approximately two weeks. Following that, the fresh microalgae colonies were taken by scraping a sterile inoculation loop gently over the surface of the culture. The colonies were then suspended in 100 ml of liquid medium. The cultures were incubated at 28 °C in the dark in an orbital incubator (Gallenkamp, UK) at a shaking speed of 200 rpm. After a four-day incubation period, these cultures were used to inoculate 400 ml medium in 1-liter Erlenmeyer flasks. Fed-batch fermentation was performed by the daily addition of a stock solution that contained 100 g l<sup>-1</sup> glucose to maintain the glucose concentration at 15 g l<sup>-1</sup>. To control pH and keep its value above 6.0, a solution of KOH 0.1 M was used. The quantity added every day was determined by the acidity of the culture medium. Both solutions were fed using a sterile syringe and the process was performed in a flow laminar cabinet (Telstar Mini-V/PCR, TELSTAR, Spain).

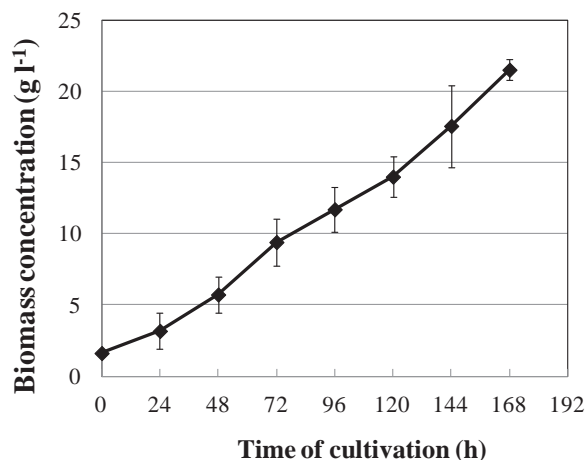


Fig. 1. Heterotrophic growth of *C. protothecoides* from glucose in erlenmeyer flasks on a lab scale.

Aeration and agitation were achieved by vigorous air bubbling through an absolute membrane filter to avoid contamination. Temperature control was achieved by immersing the flasks in a water bath (WNB 7, Memmert, Germany) that was at a fixed temperature of 28 °C.

The growth of microalgae was monitored by the increase of the optical density (OD) at 540 nm using an MRC UV-1800 spectrophotometer (Laboratory Equipment Manufacturer, UK). The correlation between optical density and biomass concentration was obtained from the weight of the dried microalgae. The following correlation was obtained:  $y = 0.384x$  ( $R^2 = 0.998$ ), where  $y$  = biomass concentration (g l<sup>-1</sup>) and  $x$  = absorbance at 540 nm. Thus, biomass concentration in cultures was determined from the OD540 values of the samples that were taken daily. The results are plotted in Fig. 1. Cell growth was, on average, 3 g l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>.

### 2.2. Microalgae recovery and milling

At the end of incubation period, microalgae was harvested and centrifuged at 9000 rpm for 10 min at ambient temperature (Centrifuge Sigma 4-16K, Sigma, Germany). The wet biomass had an approximate water content of 400% weight. It was then dried in an oven (Digiheat, J.P. Selecta, S.A., Spain) at 50 °C until it reached the desired humidity. The equilibrium humidity in lab conditions was determined in the same oven at 105 °C until it reached a constant final weight of 7% ± 1%. Finally, the dried biomass was milled in a commercial coffee blade mill for three cycles of 15 s. The resulting particle size distribution is shown in Fig. 2. The dominant size was around 100 μm.

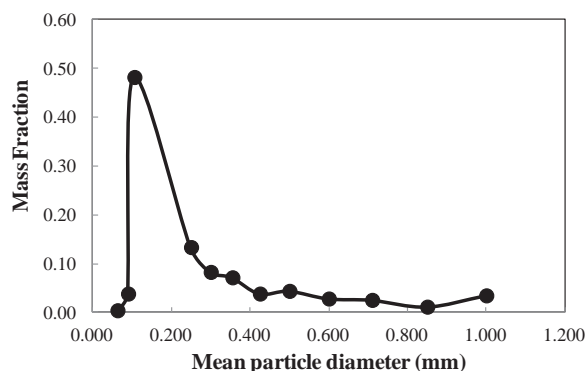


Fig. 2. Particle size distribution of the milled microalgae used as raw material.

### 2.3. Supercritical extraction

A homemade semi-continuous flow apparatus that consisted of a high purity carbon dioxide (CO<sub>2</sub> premier, >99.995% purity, Carburos Metálicos, Air Products Group, Spain) feed line and a 316 stainless-steel vessel. Its internal diameter was 1·10<sup>-2</sup> m, and its length was 10·10<sup>-2</sup> m. A heating jacket was placed around it to control the temperature inside. The CO<sub>2</sub> flow rate was fixed with a diaphragm pump (MD23G6M250, DOSAPRO MILTO ROY, France), while pressure was controlled by a backpressure regulator (BPR, 26-1761-24-161, TESCOM Europe, Germany). The quantity of CO<sub>2</sub> was measured using a mass-flow meter that was placed at the end of the line (M-10 SLPM-D, Alicat Scientific, USA). Complete details of the equipment used were described in a previous report [18].

An approximate amount of 2.500 g of powdered microalgae was introduced in the vessel measured within an error of ±0.005 g. It was deposited with a spatula in the extraction vessel forming a fixed bed that had a length-to-diameter ratio of approx. 8:1. A wire mesh was placed on top of the bed to prevent particles entrainment. The extractor was then closed and pre-heated. After that, the CO<sub>2</sub> was pumped in, and, once the desired pressure was reached, the BPR was opened to provide a continuous flow of the scCO<sub>2</sub> through the bed. After the BPR, the CO<sub>2</sub> was depressurized; the solvent power of the supercritical fluid dropped, and the oil was precipitated in a previously weighed glass flask. The amount of CO<sub>2</sub> circulated was read by the mass flow meter. When the operation was over (i.e., when no oil was extracted after three consecutive data gathering processes), the apparatus was depressurized and the exhausted microalgae unloaded.

The extraction curves were constructed by plotting the percentage of extracted oil based on the total biomass weight present in the extractor, versus the amount of CO<sub>2</sub> that passed through the bed, to obtain that oil amount at constant intervals of time. The data presented are the average of at least two experiments. The experimental error was deduced from selected tests that were repeated six times. The maximum standard deviation in extraction yield was 3.5%.

A similar procedure was used to obtain the oil solubility data. Thus, the vessel was filled with cotton that was impregnated with 3 g of the oil. The CO<sub>2</sub> was distributed through the bed at 3 g min<sup>-1</sup>. The solubility values were obtained as the maximum slope of the extraction curves constructed, as previously described.

### 2.4. Pretreatment operations

Different techniques were carried out to break the microalgae cell wall. In all treatments, centrifuged microalgae with a water content of approx. *w<sub>w</sub>* = 400% was used as the starting material. For microwave cell disruption, the sample was introduced in a domestic microwave for 30 s at 800 W. Sonication was performed in an ultrasound bath (Elmasonic S15H, ELMA, Germany) for 30 min at 37 kHz. Autoclaving was conducted with the sample introduced into a closed bottle with steam at 121 °C over the course of 20 min in an autoclave (MED12, J.P. Selecta S.A, Spain). Time for depressurizing and sample unloading was approx. 5 min.

### 2.5. Calculation of diffusion coefficients

Binary diffusion coefficients in supercritical CO<sub>2</sub> at different temperatures were estimated using a model developed by Vaz et al. [19]:

$$D_{12} = A \cdot \frac{(T/\eta_1)^{\alpha} 1}{(M_2 V_{bp,2})^b} + \frac{kBT}{6\pi\eta_1\sigma_{12}} \left[ \frac{1}{1 + \theta(1 - \frac{1}{2}\Gamma^{\infty})^{1/2}} \right],$$

where *A* is a universal constant,  $\eta_1$  is the scCO<sub>2</sub> viscosity, *M*<sub>2</sub> is the molecular weight of the solute, *V*<sub>bp,2</sub> is molar volume at normal boiling point of the solute, *k<sub>B</sub>* is Boltzmann's constant = 1.38065·10<sup>-16</sup> ergK<sup>-1</sup>,  $\sigma_{12}$  is the binary diameter,  $\theta$  is a universal constant,  $\Gamma^{\infty}$  is a thermodynamic factor at infinite solution. The original reference provides a spreadsheet where users insert the properties of the solute and the operating condition (temperature in K, pressure in bars, and corresponding CO<sub>2</sub> viscosity in cP), and the *D*<sub>12</sub> value is automatically returned in cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. The current study employed a molecular weight of 276 g mol<sup>-1</sup> based on the fatty acid composition of the oil obtained by supercritical fluid extraction in [4] and the viscosity values of scCO<sub>2</sub> obtained from the NIST Chemistry WebBook.

### 2.6. Determination of the external mass transfer coefficient

The correlation of Wakao and Kagueli [20] was used to estimate the external mass transfer coefficient:

$$\frac{Sh}{\sqrt[3]{Sc}} = \frac{2}{\sqrt[3]{Sc}} + 1.1Re^{0.6}$$

where *Sh* is the Sherwood number, *Sc* is the Schmidt number, and *Re* is the Reynolds number. The density and viscosity of scCO<sub>2</sub> were taken from the NIST Chemistry WebBook. The external mass transfer coefficient, *k<sub>g</sub>* in m s<sup>-1</sup>, was deduced from the *Sh* number as follows:

$$Sh = \frac{k_g d_p}{D_{12}}$$

where *d<sub>p</sub>* is the particle diameter assuming spherical geometry (0.1 mm) and *D*<sub>12</sub> is the binary diffusion coefficient obtained as indicated in Section 2.5.

## 3. Results and discussion

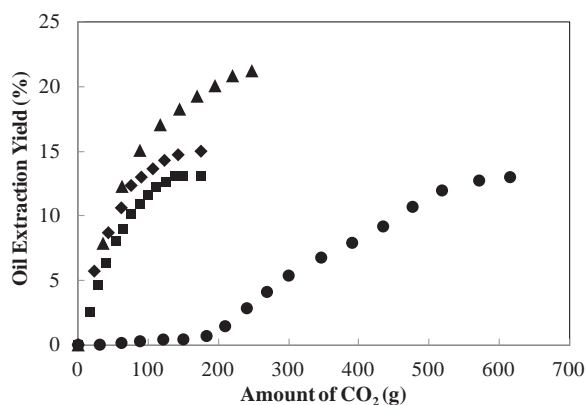
The extraction of the lipids was carried out by ensuring the microalgae bed was in contact with a continuous flow of the supercritical solvent. During this operation, several mechanisms of transport occurred. First, the microalgae absorbed the scCO<sub>2</sub> in such a manner that the cell structure swelled, and the oil was dissolved (as defined by equilibrium). Then, the oil was transported to the outer cell surface by diffusion and passed through the cell wall. Finally, it passed from the surface layer into the bulk of the supercritical solvent.

A wide variety of parameters may be relevant for the operation; first, the condition of the solid substrate in terms of factors such as moisture content, particle size and extent of cell rupture. Then, the process variables, mainly pressure, temperature and solvent flow rate. This chapter presents and discusses the influence of all these parameters on the transport mechanism and on extraction yield.

### 3.1. Equilibrium

Pressure and temperature were firstly explored because these were deemed to be the most significant parameters that affect solvent capacity. Pressure was tested from 150 bar to 300 bar at 35 °C; the results are shown in Fig. 3. The extraction rate increased notably with pressure due to the subsequent increase of the solvent density and solvent capacity. Soh and Zimmerman [21] also found an important increase on the FAME yield extracted by scCO<sub>2</sub> from *Scenedesmus dimorphus* when the pressure was increased from 165 to 500 bar.

Fig. 3 also shows the extraction curves at three different temperatures (35, 55 and 70 °C) and 300 bar. The augmentation of temperature to 70 °C enhanced the extraction; hence, oil extraction yield at this temperature was slightly higher than 210 g oil



**Fig. 3.** Extraction curves using different conditions: 150 bar, 35 °C (●); 300 bar, 35 °C (■); 300 bar, 55 °C (◆); 300 bar, 70 °C (▲). Microalgae moisture was 7%. CO<sub>2</sub> flow rate was 3 g min<sup>-1</sup>.

kg<sup>-1</sup> biomass ( $w_o = 21\%$ ), but less than half of that obtained using n-hexane in a Soxhlet apparatus (46%) [22]. The higher yield in the organic solvent was probably due to the lower selectivity of this latter procedure, as discussed by Nisha et al. [23] and demonstrated by Soh and Zimmerman [21]. These authors found that the extract obtained with hexane contained neutral and polar lipids and pigments like chlorophyll. In the current work, the supercritically extracted oil was cleaner, slightly yellow and transparent. It looked like a commercial vegetable oil. The analysis of the scCO<sub>2</sub> extract indicated that the fatty acid composition was close to olive oil of an Arbequina variety because it was very rich in oleic (60%) and linoleic (19%) acids [4,22]. The defatted biomass that was obtained was dry and free of solvent; as such, it could be used as animal food supply or following fermentations for the purpose of generating bioethanol or biogas.

Important differences between the yields obtained at supercritical conditions and Soxhlet extractions were also reported by Nisha et al. [23] for *Mortierella alpina*, by Bjornsson et al. [24] for *Nannochloropsis granulate*, and by Chen and Walker [4] for *Chlorella protothecoides*. The latter authors obtained  $w_o = 32\%$  using n-hexane in a Soxhlet apparatus while they achieved  $w_o = 17\%$  using supercritical CO<sub>2</sub> at 350 bar and 50 °C.

The higher extraction yield at 70 °C was initially unexpected, since a higher temperature usually causes a lower extraction rate if pressure is relatively low because of the density of the scCO<sub>2</sub>, which reduces its solvent power. For instance, the density of the scCO<sub>2</sub> at 300 bar and 35 °C was higher than at 70 °C (see Table 1). However, similar results have been obtained in previous research [23–25]. In the work by Bjornsson et al. [24], it was reported that lipid yield increased significantly from 15.56 to 28.45 g kg CO<sub>2</sub><sup>-1</sup> when the temperature was increased from 50 to 70 °C at 350 bar.

Oil solubility in these conditions was determined by carrying out extraction experiments at different temperatures using the extracted oil on cotton, as described in Section 2.3. Oil solubility was highest at the lowest temperature, as shown in Table 1. This is

**Table 1**  
Influence of temperature on oil solubility in scCO<sub>2</sub> and oil diffusion coefficient in scCO<sub>2</sub>.

T (°C)	Density (kg m <sup>-3</sup> )	Solubility (g kg <sup>-1</sup> )	Maximum slope on extraction curves (g kg <sup>-1</sup> )	D <sub>12</sub> <sup>*</sup> (10 <sup>9</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
35	929	7.4 ± 0.4	4.2 ± 0.4	7.3
55	850	6.5 ± 0.9	4.8 ± 0.8	7.7
70	788	5.6 ± 0.8	4.9 ± 0.6	8.0

\* Calculated from the model of Vaz et al. [19].

similar to the results reported for other vegetable oils [26] at the same scCO<sub>2</sub> density and temperature. This can be attributed to the fact that most plant oils are triacylglycerols of fatty acids with 18 carbon atoms and the solubility in scCO<sub>2</sub> is a strong function of solute molecular weight but is less dependent on the number of double bonds [27]. For example, Blasco et al. [28] found that olive oil solubility at 280 bar and 35 °C was 6.2 g kg CO<sub>2</sub><sup>-1</sup>.

A comparison of the theoretical solubility with the maximum slope of the extraction curves at different temperatures revealed that, at 70 °C, the slope (4.9 g kg CO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) was close to the theoretical solubility, while at 35 °C and 55 °C, the slopes were much less steep than theoretical solubility (see Table 1). Internal mass transfer was probably controlling the process rate from the early stages, as demonstrated by Mouahid et al. [29] when modeling the scCO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from different types of microalgae. Hence, temperature has a significant influence.

### 3.2. Internal mass transfer

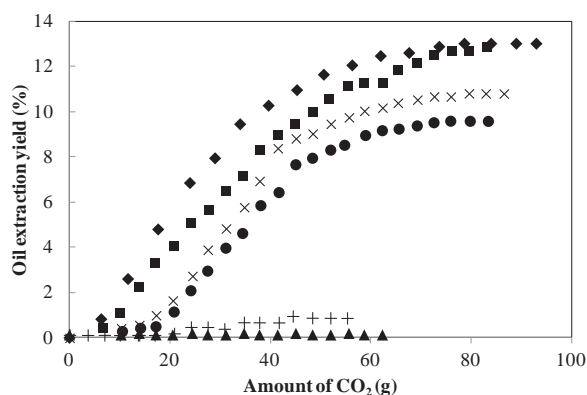
On the one hand, temperature increases the oil's internal effective diffusivity. For example, solid phase coefficient in *Scenedesmus obliquus* varied from 1.29·10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> at 300 bar and 45 °C, to 9.35·10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> at the same pressure and at 65 °C [30]. It also enhanced the oil transportation into the bulk of the supercritical phase. Table 1 shows the oil binary molecular diffusion dependence with temperature estimated from the correlation of Vaz et al. [19]. The increase in temperature from 35 °C to 70 °C resulted in an increase in the diffusion of the oil into the supercritical solvent. It is also well known that oil viscosity reduces as temperature increases and that this benefits oil transportation.

On the other hand, the highest temperature could have caused the cell wall to rupture. Thus, the resistance to oil transportation through the cell wall was reduced. The scCO<sub>2</sub> could then extract more oil. In fact, work by Soh and Zimmerman [21] revealed that the increased temperature and pressure of the supercritical procedure resulted in the microalgae cells of *Scenedesmus dimorphus* taking on a flattened appearance (based on SEM images). In the harshest conditions (80 °C and 331 bar), the individual cells were virtually indistinguishable, and a higher extraction yield was observed.

Microalgae initial moisture is another important parameter that affects the internal transportation and cell wall crossing. Insufficient water in the system causes the cell structure to shrink and consequently hinders diffusion, which reduces yield [17,31]. However, excess water may create an extra barrier for transportation and may generate the co-extraction of polar substances, thereby reducing selectivity. For both reasons, water content needs to be optimized in supercritical extractions. For example, at industrial scale, the best moisture content for decaffeination of green coffee is between 35% and 45%, and for the removal of pesticides from rice it ranges between 15% and 20% [31].

On the other hand, harvested microalgae have very high water content, and drying is a costly operation. The purpose of this study was to establish the most adequate microalgae moisture for the supercritical fluid extraction of the oil. Thus, extraction curves were compared at different water mass fractions ( $w_w$ ), starting from totally dried biomass to 400%. This highest water content corresponded with the biomass after centrifugation.

Fig. 4 shows the extraction curves, working with 3 g min<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> flow rate, 300 bar, and 35 °C. The fastest extraction was achieved when the microalgae had a water mass fraction of 7%, which was the equilibrium moisture of the atmosphere in Madrid. When water content was increased, the slope and also the extraction yield decreased because excess water could have impeded mass transfer. Balasubramanian et al. [32] examined the extraction of lipids using a hexane:methanol mixture and found the yield was maximized between  $w_w = 4$ –20%.



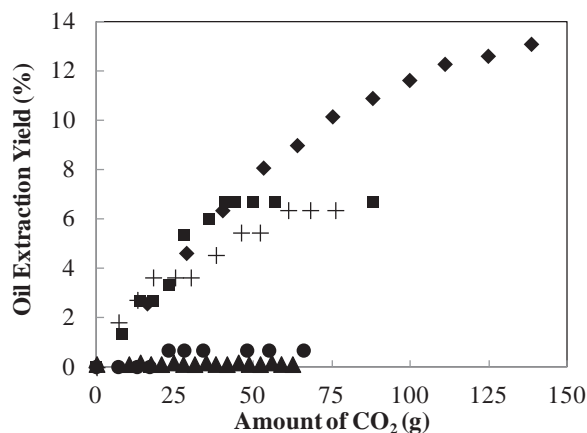
**Fig. 4.** Extraction curves using different contents of water. Operation conditions were 300 bar,  $3 \text{ g min}^{-1}$  and  $35^\circ\text{C}$ . Water content:  $\blacksquare$  0%,  $\blacklozenge$  7%,  $\times$  30%,  $\bullet$  50%,  $+$  200% and  $\blacktriangle$  400%.

At  $w_w = 400\%$ , virtually no oil was extracted; however, at  $w_w = 50\%$ , extraction velocity reduction was not significant. Indeed, Chen et al. [33] achieved over 90% extraction yield in countercurrent continuous operation using sludge with  $w_w = 85\%$ . Note that yield referred to total lipid content measured in a Soxhlet apparatus with hexane.

One of the most reasonable options to dry to these levels could be the combination of air flotation with sun drying, especially in sunny countries like Spain. In fact, Besson and Guiraud [34] recovered over 70% of the biomass by controlling pH using dissolved air flotation (DAF). Balasubramanian et al. [32] demonstrated the efficiency of sun drying; however, they reported possible oxidation of the lipids.

In summary, to minimize internal mass transfer resistance and to maximize oil extraction rate, it was necessary to dry the microalgae, mill it, and heat it during the supercritical extraction.

As an alternative, and to enhance the destruction of the cell wall, several techniques, such as microwaving, sonication and autoclave, were explored. They were employed on wet microalgae ( $w_w = 400\%$ ) to check if no posterior drying was necessary. The extraction curves of these experiments are plotted in Fig. 5. For comparison purposes, the extraction curves that were obtained at  $w_w = 7\%$  and with the wet microalgae (after centrifugation) are also plotted.



**Fig. 5.** Extraction curves using different cell disruption methods. Operation conditions were 300 bar,  $3 \text{ g min}^{-1}$  and  $35^\circ\text{C}$ . Microwave ( $\blacksquare$ ), autoclave ( $\bullet$ ), sonication ( $+$ ). On these tests, microalgae had a water mass fraction of 400%. For comparison purposes, dried ( $w_w = 7\%$ ) and milled microalgae ( $\blacklozenge$ ), and post centrifugation microalgae ( $w_w = 400\%$ ) ( $\blacktriangle$ ) are also plotted.

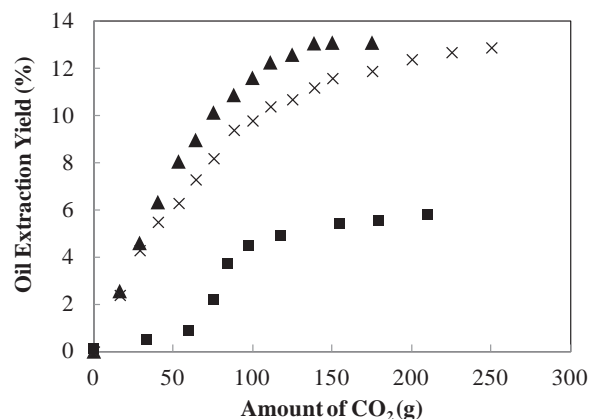
Heating the microalgae slurry in an autoclave was not deemed to be efficient because the extraction yield was  $w_o = 1\%$ . Wet algae extraction using microwave and sonication techniques achieved yields of around  $w_o = 7\%$ , while the yield was 13% if dried and milled biomass was employed. Contrarily, Dejoye et al. [35] combined the supercritical extraction with a prior microwave treatment and, through doing so, increased oil yield ( $w_o$ ) from 25% to 150% depending on the conditions. Also, García et al. [36] combined supercritical extraction with sonication to improve the defatting yield of almonds by 37% and reduce operation time by 50%. Both works were conducted with dried raw material. In our work, even if these techniques were successful in breaking the cell wall, the high excess of water impeded the oil transportation from the cell surface and probably the  $\text{scCO}_2$  penetration.

### 3.3. External mass transfer

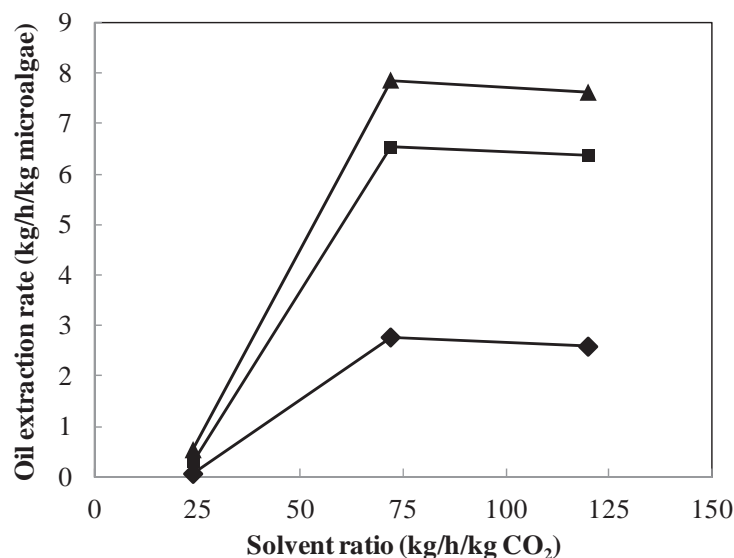
The usual specific flow rates for supercritical extraction are quite small. In terms of space velocities, these are about  $5 \text{ kg h}^{-1}$  to  $15 \text{ kg h}^{-1}$  per liter of extractor volume, with superficial solvent velocities in the range of  $0.5 \text{ mm s}^{-1}$  to  $10 \text{ mm s}^{-1}$  [37]. With these small velocities, natural convection mass transfer is the favored mechanism of transport, so a solvent flow rate increase should reduce transport resistance in the supercritical bulk phase. Additionally, an increase in the solvent flow rate should increase the extraction rate and, thereby, reduce the necessary extraction time (up to a certain point). This is due to the fact that the mean concentration gradient is kept higher because the equilibrium concentration is constant at a given pressure and temperature; however, the loading of the supercritical fluid is lower [31].

Moreover, the  $\text{CO}_2$  flow rate has a significant impact on operational and investment costs. Perrut [38] demonstrated that the price of a supercritical installation delivered on a turnkey basis varies near to a straight line with a slope of 0.24 versus the log of product of total volume  $V_T$  by the design flow rate  $Q$ . This reveals that the cost of a supercritical fluid unit roughly increases as the square root of the solvent flow rate. Therefore, it is necessary to optimize this parameter in order to design and run a profitable facility.

Fig. 6 shows the extraction curves that resulted from the use of three  $\text{CO}_2$  flow rates that ranged from  $1 \text{ g min}^{-1}$  to  $5 \text{ g min}^{-1}$ , operating at 300 bar and  $35^\circ\text{C}$ . The microalgae bed had a length-to-diameter ratio of approximately 8:1. An increase in flow rate led to a higher extraction yield and to shorter extraction times. However, the highest yield and rate were maxima when working at  $3 \text{ g min}^{-1}$ . These results are confirmed in Fig. 7; at a solvent



**Fig. 6.** Extraction curves at 300 bar and  $35^\circ\text{C}$  using three different solvent flow rates in a 8:1 length to diameter bed.  $1 \text{ g min}^{-1}$  ( $\blacksquare$ ),  $3 \text{ g min}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ),  $5 \text{ g min}^{-1}$  ( $\times$ ). Microalgae water fraction was 7%.



**Fig. 7.** Extraction rate for increasing solvent ratios at three moments: 10 min (◆), 30 min (■), 50 min (▲) in a 8:1 length to diameter bed. Operation conditions: 300 bar, 35 °C, microalgae water mass fraction, 7%.

**Table 2**

Contact time and external mass transfer coefficients for different CO<sub>2</sub> flow rates.

CO <sub>2</sub> flow rate (g min <sup>-1</sup> )	$u$ (10 <sup>3</sup> m s <sup>-1</sup> )	$Re$	Contact time (s)	kg (10 <sup>3</sup> m s <sup>-1</sup> )
1	0.2	22	350	1.5
3	0.7	64	117	2.7
5	1.1	107	70	3.6

hourly ratio of 72 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg biomass<sup>-1</sup>, which corresponds to 3 g min<sup>-1</sup>, the extraction rate was the highest at every moment.

An explanation for these effects is presented in Table 2. Larger flow rates enhanced  $Re$  numbers and superficial solvent velocity, which benefited turbulence and reduced the film layer of stagnant fluid around the solid, thus increasing the external mass transfer coefficients. The same findings were deduced from the model of *Scenedesmus* sp. lipids extraction by scCO<sub>2</sub> [39]. On the contrary, larger flow rates reduced contact time, which reduced the time for oil solubilization.

#### 4. Conclusions

External and internal mass transportation plays a significant role in the global rate in the supercritical process by which lipids are extracted from microalgae. Mechanical or thermal cell wall rupture is required to improve internal mass transfer. Additionally, microalgae must be dry. In the current study, higher water content created an extra liquid barrier. External mass transfer was strongly improved when the flow rate was increased; however, there was a maximum because it was necessary for the solvent to be in contact with the microalgae for a minimum contact time. Oil solubility was improved by increasing pressure because it directly affects solvent density. Summarizing, operating at 300 bar, 70 °C, 72 kg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> kg biomass<sup>-1</sup>, an oil mass fraction of 21% was achieved from *Chlorella protothecoides* in heterotrophic growth, which is in the highest range of those reported for microalgae [4,24,29,30,39]. The oil was highly pure, required little or null posterior refining and exhibited a very valuable composition; however, the requirement to dry and mill coupled with the high-pressure operation inevitably entails that such a process would be expensive. The cost of installing supercritical equipment is also high. Consequently, the lipid extraction from microalgae using this technique

seems to be more suitable for the formulation of high-value products, such as cosmetics, nutraceuticals or pharmaceuticals that have sufficient margin to absorb the cost of the process and the amortization of the installation. These products could be labeled as “natural” for the purposes of marketing and commercialization since they are produced from microalgae biomass without the use of organic solvents. CO<sub>2</sub> is a GRAS solvent. Nevertheless, the process would only be sustainable if it employed waste C sources and reduced energy costs through the use of “cheap” harvesting, drying, and mechanical techniques, and by reusing the exhausted biomass.

#### Acknowledgements

The authors thank MAPFRE Foundation for the economic support and to the UCM Foundation for the prize on Development of Sustainable Processes, Premio Joven 2010.

#### References

- [1] E. Suali, R. Sarbatly, Conversion of microalgae to biofuel, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 4316–4342.
- [2] M.K. Lam, K.T. Lee, Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 673–690.
- [3] H. Xu, X. Miao, Q. Wu, High-quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella Protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *J. Biotechnol.* 126 (2006) 499–507.
- [4] Y.H. Chen, T.H. Walker, Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids, *Bioresour. Technol.* 114 (2012) 512–517.
- [5] A. Martín, M. Viguera, J. Casas, C. Prieto, L. Calvo, Heterotrophic growth of microalgae *Chlorella protothecoides* for lipid production using wastes, in: *Proceedings of the 10th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries*, Valladolid, 2013.
- [6] R. Halim, M.K. Danquah, P.A. Webley, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 709–732.
- [7] R. Harun, M. Singh, G.M. Forde, M.K. Danquah, Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 1037–1047.
- [8] I. Rawat, R.R. Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Dual role of microalgae phycoremediation of domestic waste water and biomass production for sustainable biofuels production, *Appl. Energy* 88 (2011) 3411–3424.
- [9] N. Prayga, K. Pandey, P.K. Sahoo, A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 24 (2013) 159–171.
- [10] P.E. Wiley, K.J. Breneman, A.E. Jacobson, Improved algal harvesting using suspended air flotation, *Water Environ. Res.* 81 (2009) 702–708.
- [11] P. Přibyl, V. Cepák, V. Zachleder, Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 545–553.

- [12] A.R. Byreddy, A. Gupta, C.J. Barrow, M. Puri, Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from *Thraustochytrid* strains, *Mar. Drugs* 13 (2015) 5111–5127.
- [13] A.P. Florentino de Souza Silva, M. Carantino Costa, A. Colzi Lopes, E.F. Abdala Neto, R. Carrhá Leitão, C. Rossas Mota, A.A. Bezerra dos Santos, Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae, *Renew. Energy* 63 (2014) 762–766.
- [14] N. Grimi, A. Dubois, L. Marchal, S. Jubeau, N.I. Lebovka, E. Vorobiev, Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption, *Bioresour. Technol.* 153 (2014) 254–259.
- [15] P. Prabhakaran, A.D. Ravindran, A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae, *Lett. Appl. Microbiol.* 53 (2011) 150–154.
- [16] J. Sheng, R. Vannela, B.E. Rittman, Disruption of *Synechocystis* PCC 6803 for lipid extraction, *Water Sci. Technol.* 65 (2012) 567–573.
- [17] G. Brunner, *Gas Extraction*, Springer, New York, 1994.
- [18] M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, M.I. Barrena, L. Calvo, The removal of lubricating oils from metallic contacts with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids* 73 (2013) 51–56.
- [19] R.V. Vaz, A.L. Magallanes, C.M. Silva, Prediction of binary diffusion coefficients in supercritical CO<sub>2</sub> with improved behavior near the critical point, *J. Supercrit. Fluids* 91 (2014) 24–36.
- [20] K. Wakao, S. Kagueli, *Heat and Mass Transfer in Packed Beds*, Gordon and Breach, New York, 1982.
- [21] L. Sh, J. Zimmerman, Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide, *Green Chem.* 13 (2013) 1422–1429.
- [22] E. Mateus, M. Ladero, L. Calvo, Extracción de lípidos de microalgas mediante CO<sub>2</sub> supercrítico y n-hexano para síntesis de biodiesel, in: *Proceedings of the V Flucomp Meeting*, Burgos, 2011, pp. 109–110.
- [23] A. Nisha, K.U. Sankar, G. Venkateswaran, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Mortierella alpine* single cell oil: comparison with organic solvent extraction, *Food Chem.* 133 (2012) 220–226.
- [24] W.J. Bjornsson, K.M. MacDougall, J.E. Melanson, S.J.B. O'Leary, P.J. McGinn, Pilot-scale supercritical carbon dioxide extractions for the recovery of triacylglycerols from microalgae: a practical tool for algal biofuels research, *J. Appl. Phycol.* 24 (2012) 547–555.
- [25] S. Ghoreishi, E. Bataghva, A.A. Dadkhah, Response surface optimization of essential oil and diosgenin extraction from *Tribulus terrestris* via supercritical fluid technology, *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 133–141.
- [26] J.M. Del Valle, J.C. De La Fuente, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oilseeds: review of kinetic and equilibrium models, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46 (2006) 131–160.
- [27] H. Sovová, M. Zarevúcka, M. Vacek, K. Stránský, Solubility of two vegetable oils in supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids* 20 (2001) 15–28.
- [28] M. Blasco, V. Capilla, S. Subirats, Case study: recovery of polishing earths, in: Ainia (Ed.), *State of the Art Book on SF Technology*, Spain, 2004, pp. 333–341.
- [29] A. Mouahid, Ch. Crampon, S.A. Toudji, E. Badens, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: experiments and modeling, *J. Supercrit. Fluids* 77 (2013) 7–16.
- [30] M. Solana, C.S. Rizza, A. Bertucco, Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: comparison between *Scenedesmus oliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nanochlorosis salina*, *J. Supercrit. Fluids* 92 (2014) 311–318.
- [31] E. Lack, T. Gamse, R. Marr, Extraction from solids, in: A. Bertucco, G. Vetter (Eds.), *High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications*, Industrial Chemistry Library, vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 2001, pp. 378–395.
- [32] R.K. Balasubramanian, T.T. Doan, J.P. Obbard, Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae, *Chem. Eng. J.* 215–216 (2013) 929–936.
- [33] K.T. Chen, C.H. Cheng, Y.H. Wu, W.C. Lu, Y.H. Lin, H.T. Lee, Continuous lipid extraction of microalgae using high-pressure carbon dioxide, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 23–26.
- [34] A. Besson, P. Guiraud, High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*, *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 464–470.
- [35] C. Dejoye, M.A. Vian, G. Lumia, C. Bouscarle, F. Charton, F.F. Chemat, Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* microalgae: microwave prior to supercritical carbon dioxide extraction, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 9332–9341.
- [36] M. García, E. Casas, J. Montañés, D. Rivera, A. Tornero, Intensificación de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico mediante ultrasonidos de alta potencia (UAP): efectos sobre la obtención de aceite de almendra, in: *Proceedings of the VII Flucomp Meeting*, Barcelona, 2014.
- [37] F. Recasens, V. E., Kinetic properties at high pressure, in: A. Bertucco, G. Vetter (Eds.), *High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 2011, pp. 92–140.
- [38] M.M. Perrut, Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues, *Ind. Eng. Chem.* 39 (2000) 4531–4535.
- [39] H. Taher, S. Al-Zuhair, A. Al-Marzouqi, Y. Haik, Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipids: process optimization and laboratory scale-up, *J. Supercrit. Fluids* 86 (2014) 57–66.



# **CURRICULUM VITAE**



## Curriculum Vitae



Miguel Viguera Sáenz

14/05/1987

---

**Educación**
**Ingeniero Químico**

Universidad Complutense de Madrid  
2011

**Máster en Ciencia y Tecnología Química**

Universidad Nacional de Educación a Distancia  
2013

---

**Participación en proyectos de investigación**
**Obtención de biodiésel por vía enzimática a partir de aceites de microalgas**

Entidad financiadora: Fundación Mapfre, convocatoria de ayuda a la investigación  
2010

Entidades participantes: UCM

Duración: enero 2011-diciembre 2011

Investigador responsable: Lourdes Calvo Garrido

**Nuevas tecnologías no térmicas para la conservación de productos termolábiles.**

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), ref. CTQ2010-18537

Entidades participantes: UCM y Universidad de Murcia (UMU)

Duración: enero 2011-diciembre 2013

Investigador responsable: Lourdes Calvo Garrido

**196-2012, Efecto de la humedad en la extracción de impurezas de polímeros naturales con gases supercríticos**

Tipo de contrato: Artículo LOU 83

Empresa financiadora: Amorin & Irmaos, S.A.

Duración: 11 junio 2012- 23 julio 2012

Investigador responsable: Lourdes Calvo Garrido

**332-2008, Extracción de productos de alto valor añadido a partir de residuos alimentarios mediante CO<sub>2</sub> supercrítico**

Miguel Viguera Sáenz

Tipo de contrato: Artículo LOU 83  
 Empresa/Administración financiadora: Natraceutical S.A.  
 Entidades participantes: UCM  
 Duración: 1 octubre 2008-31 diciembre 2008

### Publicaciones

J. Tello, M. Viguera, L. Calvo, **Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide**, J. Supercrit. Fluids, 59 (2011) 53-60. doi: 10.1016/j.supflu.2011.07.018

M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, M.I. Barrena, L. Calvo, **The removal of lubricating oils from metallic contacts with supercritical CO<sub>2</sub>**, J. Supercrit. Fluids, 73 (2013) 51-56. doi.org/10.1016/j.supflu.2012.09.015

M. Viguera, A. Marti, F. Masca, C. Prieto, L. Calvo, **The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae**, J. Supercrit. Fluids. 113 (2016) 16–22. doi:10.1016/j.supflu.2016.03.001.

M. Viguera, C.Prieto, J.Casas, E.Casas, A.Cabañas, L. Calvo, **The parameters that affect the supercritical extraction of 2,4,6-trichloroanisol from cork**, J. Supercrit. Fluids, Available online 27 March 2018 In Press, Corrected Proof doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.017

### Participación en congresos

#### *Eliminación de aceites minerales de la superficie de contactos metálicos de Ag y Cu mediante CO<sub>2</sub> supercrítico*

M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, I. Barrena, L. Calvo  
 V Reunión de Expertos en Fluidos Comprimidos  
 Burgos (España) 2011  
 Comunicación oral

#### *The removal of mineral oils from the surface of electronic contacts by supercritical CO<sub>2</sub>.*

M. Viguera, J.M. Gómez-Salazar, I. Barrena, L. Calvo  
 13th European Meeting on Supercritical Fluids  
 La Haya (Países Bajos) 2011  
 Comunicación oral

#### *Combinación con otros métodos físicos y efecto de los parámetros de operación en la extracción de aceite a partir de la microalga *Chlorella protothecoides**

M. Viguera, M. Ladero, L. Calvo  
 VI Reunión de Expertos en Fluidos Comprimidos  
 Madrid (España) 2012  
 Poster

***Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae Chlorella protothecoides under heterothrophic growth***

M. Viguera, A. Marti, C. Prieto, A. Martín, J. Casas, L. Calvo  
X International Conference on Renewable Resources & Biorefineries.  
Valladolid (Spain), 2014  
Comunicación oral

***Heterotrophic growth of microalgae Chlorella Prototecoides for lipid production using wastes***

A. Martín, A. Marti, M. Viguera, J. Casas, C. Prieto, L. Calvo  
X International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. Valladolid (Spain), 2014  
Poster

***The parameters that affect the supercritical extraction of TCA from cork***

M.Viguera, C. Prieto, J. Casas, E. Casas, A. Cabañas, L. Calvo  
16th European Meeting on Supercritical Fluids  
Lisboa, Portugal  
Comunicación oral

***Influencia de los parámetros de operación y la condición del sólido en el proceso de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en casos de interés industrial***

M. Viguera, L. Calvo  
IX Reunión de Expertos en Fluidos Comprimidos  
Madrid (España) 2018  
Comunicación oral

### Experiencia laboral

---

**Industrias Tobía – Spaldin 2012–2016** Responsable de I+D y producción, asumiendo responsabilidades en materia de producción, gestión de calidad e innovación, colaborando en proyectos FP VII y H2020, así como otros del CDTI. Redacción de patentes y la gestión de la propiedad industrial.

**Artica ingeniería e innovación 2016-2017.** Consultor de I+D+i participando en tareas de apoyo a la innovación empresarial, gestionando ayudas públicas de I+D así como deducciones fiscales vinculadas a la I+D+i

**Zabala Innovation Consulting 2018-actualidad.** Consultor de I+D+i participando en tareas de apoyo a la innovación empresarial, gestionando ayudas públicas de I+D así como deducciones fiscales vinculadas a la I+D+i

### Idiomas

---

Español	Hablante nativo
Inglés	Nivel B2. University of Cambridge (2013)
Francés	Nivel B2. Escuela Oficial de Idiomas (2016)