

**EXTRACCIÓN SUPERCRTICA DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LOS
DESECHOS DE LA UVA ISABELLA (*Vitis labrusca*)**

LUISA FERNANDA MUÑOZ DOMINGUEZ

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA**

2023

**EXTRACCIÓN SUPERCRTICA DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LOS
DESECHOS DE LA UVA ISABELLA (*Vitis labrusca*)**

LUISA FERNANDA MUÑOZ DOMINGUEZ

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

DIRECTOR:

GUSTAVO BOLAÑOS, Ph.D.

CODIRECTORA:

ISABEL MEJIA, Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA

2023

DEDICATORIA

A mis padres, Georgina y Carlos, por ser la luz de mi vida, la inspiración para iniciar mi estudio profesional y uno de los motivos primordiales para lograr este valioso objetivo.

A mis hermanas y hermano, por ser mi guía y ejemplo para seguir adelante desde que era una niña. Por ser mis protectores y compañeros de vida.

A Natalia, quien me apoya incondicionalmente y alegra días cuando ya no puedo más.

Luisa Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor Gustavo Bolaños director del Grupo de Investigación en Termodinámica Aplicada y Fluidos Supercríticos, por sus valiosas enseñanzas y ser parte fundamental para culminar el proyecto.

A la profesora Isabel Mejía, por su guía, confianza y apoyo en la parte experimental de esta investigación que ayudaron a cumplir los objetivos del proyecto.

A los profesores de la Escuela de ingeniería Química de la Universidad del Valle, por compartir sus conocimientos, consejos y experiencias dentro de la academia.

A mis compañeros, mis futuros colegas, por ser el mejor equipo. Con ustedes crecí significativamente en el ámbito personal y académico.

A mis amistades que son mi segunda familia. Muchas gracias.

RESUMEN

En este proyecto se estudió la extracción de semillas de uva Isabella (*Vitis labrusca*) para obtener un extracto rico en antioxidantes usando CO₂ supercrítico. Esta materia prima es un desecho que requiere de un pretratamiento antes de entrar al proceso de extracción. Las semillas se clasificaron y se sometieron a secado y molienda criogénica. Para la etapa de extracción se siguió un diseño factorial 2³ aumentado con tres puntos centrales, donde los factores fueron temperatura (42 a 64 °C), densidad de CO₂ (0.7 a 0.9 g/cm³) y relación etanol/CO₂ (0 a 5 %v/v). La variable de respuesta fue el rendimiento de la extracción. Los resultados mostraron que se alcanzó un rendimiento máximo de extracto alrededor del 5.9% (pesado), en el cual las condiciones óptimas de operación fueron 62 °C, 6280 psi y 0% de relación etanol/CO₂.

Las muestras con los mayores rendimientos de extracto se sometieron a una medición de capacidad antioxidante, usando el método de Brand-Williams, método estandarizado que se adecua a los equipos del laboratorio, el cual usa el reactivo DPPH para cuantificar mediante espectrometría la capacidad de un antioxidante para reaccionar con radicales libres. Se confirmó que hay presencia de antioxidante en los extractos y se obtuvo una concentración efectiva (EC₅₀) igual a 40 g/mL.

Por último, se elaboró el diseño preliminar de una planta de extracción supercrítica de los desechos de uva con la capacidad de producir toneladas anuales de extracto. El análisis económico indicó que se debe realizar una inversión inicial de 149 207 USD, inversión que se podría recuperar en 2 años con una tasa de retorno (TIR) del 47%. Las ganancias en 10 años de actividad de dicha planta equivaldrían a 737 000 USD.

Palabras claves:

Extracción supercrítica, semillas de uva, antioxidantes, dióxido de carbono, capacidad antioxidante

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
PORTADA	i
SUBPORTADA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
CAPITULOS	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVOS	4
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	5
2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE UVA	6
2.2 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	6
2.3 EXTRACCIÓN MEDIANTE CO ₂ SUPERCRÍTICO	6
2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	8
2.5 ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD	9
3. METODOLOGÍA	10
3.1 ADECUACIÓN DE MATERIA PRIMA	10
3.2 EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA	11
3.3 CALIBRACIÓN DE BOMBAS	13
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA	14
3.5 EVAPORACIÓN DEL COSOLVENTE	15
3.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	16
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	17
4.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN DE BOMBAS	17

Tabla de contenido (continuación)	Pág.
4.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN SUPERCRTICA	17
4.3 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL RENDIMIENTO	19
4.4 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO	22
5. DISEÑO PRELIMINAR DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SUPERCRTICA	29
5.1 ESCALAMIENTO DEL PROCESO	29
5.2 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO	30
5.2.1 Descripción del proceso Unidad 100	30
5.2.2 Descripción del proceso Unidad 200	32
5.3 DISEÑO DE EQUIPOS	34
5.4 FACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL PROCESO	35
5.4.1 Inversión de capital (FCI)	36
5.4.2 Costo de mano de obra (COL)	37
5.4.3 Costo de servicios (CUT)	38
5.4.4 Costo de tratamiento de residuos (CWT)	38
5.4.5 Costo de materia prima (CRM)	38
5.4.6 Otros costos	39
6. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES	42
6.1 CONCLUSIÓN	42
6.2 RECOMENDACIONES	43
APÉNDICES	45
A. Resultados de la extracción y medición de DPPH de la Muestra 5.....	46
B. Parámetros para el diseño de equipos de la planta de extracción	47
REFERENCIAS	52

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1. Condiciones de operación para la extracción de semillas de uva	15
2. Calibración de las bombas de CO ₂ (CP 250) y etanol (CP 125)	17
3. Resultados del rendimiento de la extracción	18
4. Valores P del análisis de factores	20
5. Análisis de varianza de los rendimientos obtenidos de las extracciones	20
6. EC ₅₀ de las corridas 3, 4 y 5	28
7. Parámetros del proceso de extracción	30
8. Balance de materia para la unidad 100	33
9. Balance de materia para la unidad 200	34
10. Especificaciones de equipos Unidad 100	34
11. Especificaciones de equipos Unidad 200	35
12. Especificaciones y costos de equipos de la unidad 100	36
13. Especificaciones y costos de equipos de la unidad 200	37
14. Costos de mano de obra de la planta	38
15. Resumen del costo económico del proyecto	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1. Esquema de un proceso de extracción con CO ₂ supercrítico	7
2. Diagrama de fases P-T de CO ₂	8
3. Esquema del equipo de extracción supercrítica utilizado	11
4. Montaje para calibración de las bombas CP 250 y 125	14
5. Diagrama del proceso de evaporación al vacío del cosolvente	16
6. Extracto de semillas de uva obtenido por extracción supercrítica	18
7. Gráfica estadística, rendimiento real vs predichos	19
8. Gráfica de predicción del modelo	21
9. Cambio de coloración de DPPH al agregar extracto	22
10. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 3	23
11. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 4	23
12. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 5	24
13. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 8	25
14. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 9	25
15. Material sólido filtrado de la corrida 9	26
16. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 42°C, 0.9 g/cm ³ y 0% de etanol	27
17. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 42°C, 0.7 g/cm ³ y 5% de etanol	27
18. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 62°C, 0.9 g/cm ³ y 0% de etanol	28
19. PFD de la unidad 100, pretratamiento de semillas de uva	31
20. PFD de la unidad 200, planta de extracción de residuos de uva Isabella	33
21. Flujo de ingresos del proyecto de extracción de semilla de uva durante 10 años	40

1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son un grupo de compuestos capaces de inhibir la degradación oxidativa al interferir en la cadena de reacciones que transforman los lípidos en peróxidos, ácidos y aldehídos, sustancias dañinas para la salud. Los antioxidantes están presentes en muchos productos naturales, al igual que en residuos de su procesamiento. Por ejemplo, en el caso de la uva, existe evidencia de la presencia de antioxidantes en los residuos del proceso de fermentación para la elaboración de vino tinto y también del procesado de pulpa de fruta, llamados “orujo de uva”, los cuales están compuestos principalmente de hollejos, material sólido, es decir, la piel de la uva y las semillas [1].

A través de los años los antioxidantes se han utilizado en diversas aplicaciones, desde aditivos en la vulcanización del caucho hasta conservantes de alimentos. Sin embargo, fue solo hasta los años 60 que algunos estudios revelaron la importancia de los antioxidantes en la salud, específicamente en la prevención del cáncer, puesto que los antioxidantes reaccionan rápidamente con los radicales libres que son productos intermedios en la cadena de oxidación de los lípidos, por lo cual se conocen como antioxidantes terminadores de cadena. Así, el consumo de uvas puede ser una fuente dietética rica en antioxidantes, tales como polifenoles, que según se ha señalado, tendría efectos benéficos sobre la salud [2].

La capacidad antioxidante de los extractos de la semilla de uva se puede evaluar usando diferentes reactivos, siendo la medición con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) una de las más confiables. Esta es el resultado de la medición de la absorbancia del DPPH que se relaciona con la concentración, a una longitud de onda característica en medio de la reacción [3].

La extracción usando dióxido de carbono (CO_2) supercrítico, se ha empleado en investigaciones y especialmente en industrias a gran escala, pues este componente garantiza la mínima alteración de los compuestos fenólicos que se deseen extraer, pues conserva las propiedades antioxidantes de los extractos vegetales, debido a que la temperatura crítica es baja (31°C) previniendo así la degradación del extracto. Adicionalmente, el CO_2 es fácil de recuperar ya que a temperatura y presión ambiente está en estado gaseoso, generando un extracto libre de solventes [4].

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En Colombia la agricultura genera alrededor de 72 millones de toneladas de residuos sólidos vegetales, los cuales tienen un fuerte impacto sobre el medio ambiente, dado que gran parte de ellos se incineran o se llevan a rellenos sanitarios [5]. De hecho, en el procesamiento de frutas, se suelen obtener residuos como cáscaras, semillas, hojas, vástagos y capachos o estopa, los cuales se han convertido no solo en un problema ambiental, sino también económico, debido a los elevados costos de su disposición (embalaje, almacenamiento, transporte, neutralización, recepción en rellenos sanitarios, y/o incineración, entre otros) [6].

El procesamiento de la uva genera 25% de residuos sólidos, tal y como lo menciona el Ministerio de Agricultura [7]. Por cada 100 kg de uva procesada hay 25 kg de desechos, de los cuales el 50% son pieles, el 25% tallos y el 25% semillas. En particular, en la región del Valle del Cauca se cosecha uva dos veces al año, lo que corresponde al 85% de las 30 mil toneladas/año de la producción nacional de este fruto, generando así una cantidad considerable de residuos [8]. Además, se ha demostrado que las estructuras que quedan del racimo tras quitarles las uvas, conocidas como “escobajos”, al igual que las semillas, contienen altos niveles de compuestos antioxidantes y fenólicos, los cuales serían beneficiosos para la salud humana [9].

Por la importancia de los antioxidantes en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos, se deduce que simples desechos pueden ser materia prima para obtener un producto con alto valor agregado. Como se mencionó anteriormente, hay varios estudios en los cuales se ha establecido la presencia de compuestos antioxidantes como polifenoles en los desechos de uva, siendo relevante comprobar la capacidad de inhibir la oxidación del extracto resultante de la extracción con fluidos supercríticos, por medio de la medición de la actividad antioxidante.

Ante esta situación, se plantea dar utilidad a los desperdicios de la uva para que en un futuro se consideren como materia prima para promover una economía circular en la región. El dióxido de carbono (CO_2) y el agua son los solventes que presentan propiedades más atractivas para procesos de extracción y por ello se usan industrialmente [10]. Debido a las bajas temperaturas a las cuales se realizan extracciones con CO_2 supercrítico, este solvente fue de interés en este proyecto. Además, como se conoce que las sustancias antioxidantes en

la uva son polifenoles se propone analizar el efecto sobre el rendimiento del extracto resultante al añadir un cosolvente como el etanol absoluto (EtOH).

En consecuencia, se espera responder a la siguiente pregunta, ¿qué condiciones de temperatura, presión y proporción de CO₂ y etanol absoluto es apropiada para obtener un alto rendimiento e implementación del proyecto de la obtención de antioxidantes a partir de semillas de uva en la industria?

1.2 JUSTIFICACIÓN

En Colombia, la industria agroalimentaria produce una gran cantidad de residuos que usualmente no se aprovechan. Se ha intentado desarrollar proyectos de investigación que incentiven el aprovechamiento de los desechos provenientes de los cultivos orgánicos, y disminuyan la contaminación ambiental. Aunque la alternativa más común es el compostaje, se ha considerado la extracción de compuestos químicos [11].

En los últimos años, las industrias vinícolas y de producción de pulpa de fruta, han despertado gran interés, ya que generan desechos que se pueden transformar en materia prima de bajo costo y son una fuente importante de antioxidantes naturales [12]. Los cultivos de uva se dan principalmente en los departamentos de Valle del Cauca, Antioquia y Boyacá y no son comunes en el país, debido a las condiciones climáticas que requieren (veranos cálidos y secos, con reserva abundante de agua). De este modo, sería fácil centrar el mercado en la región del Valle del Cauca, desde la producción suministrada por las extensas plantaciones, hasta las industrias de pulpa de fruta y sus derivados.

En cuanto a la valorización de los desechos de uva, se han planteado varias investigaciones, entre ellas, se encuentra la elaboración de etanol a partir del “orujo” (extracto de uva), la extracción de ácido tartárico y de aceites, la producción de colorantes y especialmente la obtención de antioxidantes [11].

Los antioxidantes son sustancias conocidas por su capacidad de intervenir en la cadena de reacciones de oxidación de otras sustancias, ocasionada en reacciones metabólicas o producida por factores exógenos como las radiaciones ionizantes y la neutralización de radicales libres [13]. Los antioxidantes, tienen un alto valor comercial al jugar un papel fundamental en el desarrollo de productos para las industrias alimentarias, farmacéuticas y nutraceuticas.

Dicho lo anterior, es de extrañarse que actualmente en Colombia no existe una industria productora de antioxidantes, a pesar de la diversidad de materias primas que existen en el país. Por esta razón, el Grupo de Investigación de Termodinámica Aplicada de la Universidad del Valle ha venido realizando estudios dirigidos a la extracción de productos con elevado valor agregado a partir de dichas materias primas.

En efecto, en este grupo se han extraído diversos materiales antioxidantes, a partir de varias materias primas como semillas de cilantro [14], cáscara de piña [15], semilla del achiote [16] y otros, utilizando CO₂ supercrítico. Este solvente al poseer un bajo precio y al no ser tóxico, ni inflamable presenta gran potencial en este campo y ha logrado convertirse en el fluido más empleado en la técnica de extracción supercrítica y es avalado por *Food and Drug Administration* (FDA) para usarse en aplicaciones de la industria alimentaria y farmacéutica. Además, el CO₂ se considera amigable con el ambiente y es una sustancia GRAS (*Generally Recognized As Safe*) según *European Food Safety Authority* (EFS) [4].

1.3 OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue realizar un estudio de prefactibilidad de la producción de antioxidantes a partir de las semillas de uva Isabella (*Vitis labrusca*), utilizando extracción con CO₂ supercrítico.

Se establecieron como objetivos específicos:

1. Determinar las condiciones de operación (temperatura, presión y concentración de etanol como cosolvente) que favorecen los rendimientos de extracción de los antioxidantes.
2. Proponer un diagrama de flujo de proceso para la extracción supercrítica de antioxidantes de uva a escala industrial.
3. Analizar la prefactibilidad técnica y financiera de un proyecto industrial de extracción de antioxidantes en la región del Valle del Cauca.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Algunos productos naturales tienen alto contenido de polifenoles, los cuales tienen propiedades oxido-reductoras que previenen reacciones en cadena, las cuales son nocivas para los organismos, y causan daño celular. Teniendo en cuenta el beneficio de los polifenoles, hay diversos estudios que usan la extracción para separar este tipo de compuestos a partir de frutas y otros vegetales. Entre ellas se encuentra la uva, que ha mostrado tener una cantidad considerable de polifenoles y ha sido motivo de estudio por sus propiedades preventivas de cáncer y otras enfermedades [17].

Otros trabajos, aplican el proceso de extracción de aceites y antioxidantes a partir de pulpa de manzana [18], *Bauhinia forficata* (hojas del árbol de orquídea brasileña) [19], semillas de mango [20], avellana, mora, hojas de té y entre otras plantas, semillas, frutas y vegetales. También se encuentran estudios previos sobre la extracción con dióxido de carbono supercrítico de hojas de fresa para producir antioxidantes que contienen compuestos fenólicos [21].

Los primeros cultivos de uva en el país se localizaron en el norte de Valle del Cauca y pasado un tiempo se expandieron a municipios de Boyacá y el Huila. El Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE anunció que los tipos de uva más conocidos en el mercado son la Red Globe, Verde e Isabella, utilizadas en la producción de vinos, mermeladas, jugos, uvas pasas o como fruta fresca [22]. En el año 2015 se registró al Valle del Cauca como líder en la producción de uva, responsable del 80% de la uva en el mercado nacional.

En la literatura hay estudios de gran interés para el desarrollo de esta investigación, donde aplican la extracción con fluidos supercríticos para la obtención de aceite y antioxidantes de semillas de uva. Dicho proceso se considera un método efectivo, debido a la alta difusividad y baja viscosidad de los fluidos supercríticos. En dichos estudios se busca optimizar las condiciones de extracción (temperatura y presión) con dióxido de carbono supercrítico empleando las metodologías de Taguchi (calidad total) y de Superficie de Respuesta. Estas metodologías son herramientas esenciales para el establecimiento de las condiciones óptimas del proceso de extracción, destacando la importancia de mitigar problemas con el manejo de residuos de la industria vinícola, dado que las semillas y hollejo de esta industria son aptas para extracción [23].

2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE UVA

El cultivo de uva en general no es representativo en el país debido a prácticas agrícolas fallidas, lo cual disminuye su productividad y expansión. No obstante, se hace énfasis en la uva Isabella por su gran valor para los productores del Valle, puesto que a diferencia de otras especies esta fruta se ha acoplado a las condiciones climáticas tropicales de Colombia, lo que permite una cosecha constante [22]. La composición macro de la uva es del 81% de pulpa, 14% de hollejo y 5% de semillas, cifras obtenidas de cultivos del Valle del Cauca [24].

Los compuestos responsables de la actividad biológica de la uva son los polifenoles, en efecto, en las variedades tintas se encuentra que las semillas tienen el 63% de los fenoles totales, seguido del 34% en las pieles y el 3% en el jugo [25].

2.2 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Generalmente los fluidos supercríticos (FSC) son buenos disolventes dada su capacidad para disolver sustancias apolares de forma similar a los disolventes orgánicos. Como su viscosidad y coeficiente de difusión son próximos a los de los gases, esto facilita las propiedades de transporte de estos fluidos. Asimismo, como la tensión superficial de los FSC es igual a cero, estos fluidos son particularmente adecuados para la extracción de sustancias contenidas en matrices sólidas. Otra ventaja en el uso de los FSC es la posibilidad de cambiar su poder de solvatación por variaciones de la presión y/o temperatura, permitiendo así la extracción fraccionada de los solutos, y la recuperación completa del disolvente mediante simples ajustes de la presión [10].

2.3 EXTRACCIÓN MEDIANTE CO₂ SUPERCRÍTICO

El fluido supercrítico que se implementará en la extracción de antioxidantes de la uva Isabella es el CO₂. El CO₂ destaca por ser un solvente no tóxico, no inflamable, tiene amplia disponibilidad y es de bajo costo. Es un disolvente “verde” presente en la atmósfera, alimentos y bebidas, por lo que se puede emplear con toda seguridad [26].

Algunas de las aplicaciones del CO₂ supercrítico son:

- Extracción a partir de biomasa vegetal (incluyendo residuos) y microalgas, de aceites y grasas, colorantes, compuestos bioactivos, complementos (nutracéuticos) para alimentación, nutrición animal y productos de farmacia y cosméticos.
- Eliminación de impurezas tales como insecticidas de cereales, vegetales y suelos; aceites orgánicos de piezas metálicas y componentes electrónicos; restos de grasas de biomateriales y material quirúrgico.
- Limpieza en seco de tejidos.

En la Figura 1 se puede apreciar el esquema de un proceso de extracción con CO₂ y una recuperación del extracto. Primero el CO₂ supercrítico fluye a través de la materia prima dentro del extractor y disuelve los componentes extraíbles. El disolvente cargado con el extracto alimenta el separador, donde se reduce la presión de manera que el soluto no es soluble y precipita [26].

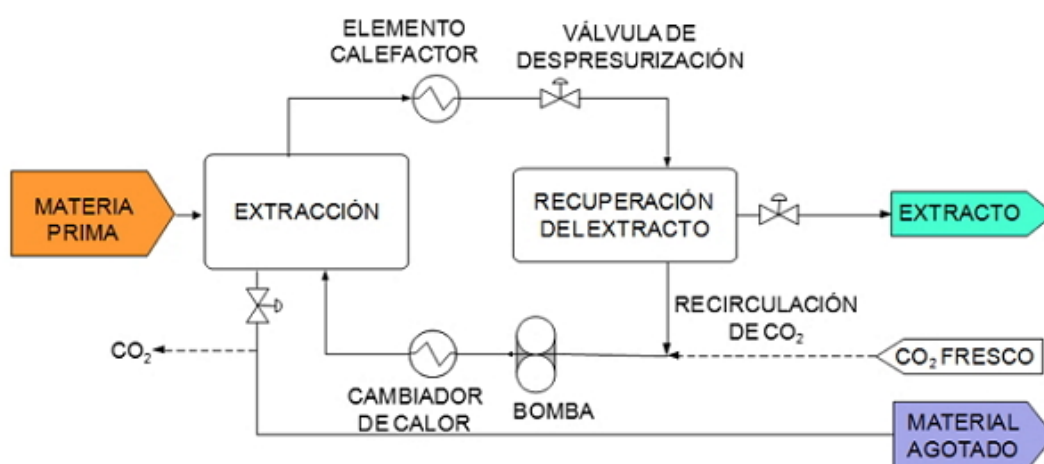


Figura 1. Esquema de un proceso de extracción con CO₂ supercrítico. Adaptado de Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación [27].

La Figura 2 muestra un diagrama de fases P-T del CO₂. Como su temperatura crítica es baja (31°C), en la extracción se evita que los compuestos sensibles al calor se degraden o eliminen por completo. Su presión crítica (74 bar) es relativamente baja y es fácil de alcanzar.

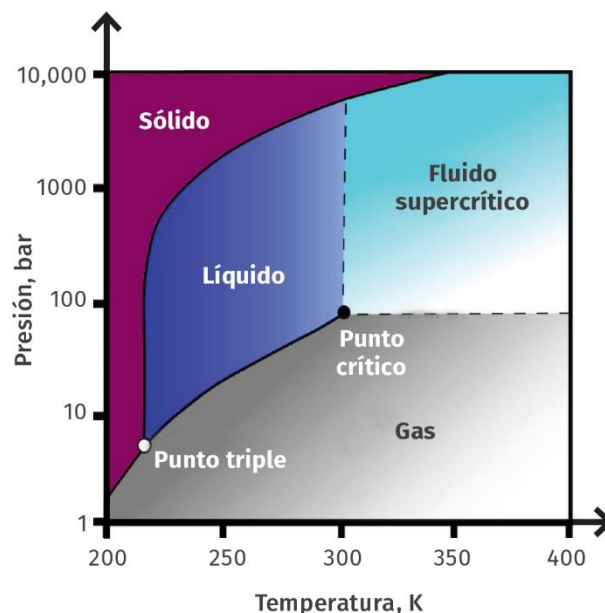


Figura 2. Diagrama de fases P-T de CO₂. Adaptado de Tradematt Henan Industry Co [28].

2.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los radicales libres son cualquier especie (átomo, molécula o ión) que contenga al menos un electrón desapareado en su orbital más externo, y que a su vez sea capaz de existir en forma independiente [29]. Según el método de Brand-Williams, un buen antioxidante es capaz de eliminar el 50% o más de los radicales libres [30]. El radical libre del DPPH tiene la capacidad de aceptar un átomo de hidrógeno suministrado por el agente antioxidante y cuando se produce la reacción, el color característico violeta de este se desvanece a amarillo pálido, en contacto con los antioxidantes. Como se mencionó, la molécula DPPH presenta máxima absorción de radiación a 515 nm, y es conocida como un radical libre estable. Esto se debe a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, de esta forma la molécula no se dimeriza [31].

Para interpretar los resultados obtenidos con este método se define el parámetro EC₅₀ (g/mL), también llamado “concentración eficiente”, la cual representa la capacidad antioxidante definida como la concentración de sustrato (antioxidante) necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% [3].

Se cree que el principal modo de acción de los polifenoles está relacionado con la alta reactividad hacia radicales libres. Sin embargo, debe distinguirse entre capacidad antioxidante y reactividad. Mientras que la capacidad antioxidante da información acerca de

la duración del efecto antioxidante, la reactividad caracteriza sólo la dinámica de inicio del efecto antioxidante a una concentración fija de compuesto.

En conclusión, la actividad antioxidante está determinada por: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.

2.5 ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD

Se caracteriza por dos estudios preliminares: técnico y financiero. La información técnica se alcanza de forma experimental en el laboratorio, al diseñar un esquema claro del diagrama de flujo y llevarlo a escala, dependiendo de los porcentajes de rendimiento y calidad del producto obtenidos a partir de la cantidad de materia prima usada, los datos resultantes son claves para determinar los balances de materia y energía.

El estudio financiero tiene que ver con la inversión de capital más los costos iniciales (equipos) y de operación (materia prima, salarios de: trabajadores de planta y administración, mantenimiento y gastos de energía). Con el presente estudio, se espera llegar a una contabilidad que muestre la inversión (capital inicial, área y adecuación de la planta) más los costos iniciales y de operación, por ejemplo, el modelo de análisis económico de Turton [32].

3. METODOLOGÍA

Este proyecto se basa en una metodología experimental, en la cual la extracción de antioxidantes se realizó usando CO₂ supercrítico como solvente y etanol como cosolvente. En pruebas de laboratorio se estudió el efecto de temperatura, presión y relación etanol/CO₂ sobre el rendimiento y capacidad antioxidante de los extractos, determinadas mediante la prueba de DPPH. La materia prima y sustancias que se utilizaron fueron: semillas de uva, nitrógeno líquido, DPPH, n-Hexano, CO₂ y etanol absoluto. Los equipos que se utilizaron fueron: molino, equipo de extracción supercrítica, bomba para evaporación al vacío, refrigerador, horno convectivo, balanza analítica y espectrofotómetro UV-vis. El procedimiento experimental a escala de laboratorio se describe a continuación.

3.1 ADECUACIÓN DE MATERIA PRIMA

Las semillas de uva Isabella (*Vitis labrusca*), fueron suministradas por la empresa procesadora de pulpas de frutas FRESH & NATURAL S.A.S, ubicada en la ciudad de Cali y por ZUMO DE UVAS, localizada en Ginebra (Valle del Cauca). El total de las corridas experimentales de extracción requirió una cantidad aproximada de 3 kg de semillas.

La muestra recolectada contiene tallos, piel y semillas y tiene cantidades importantes de humedad, por lo cual se sometió la materia prima a un proceso de secado en el horno convectivo a una temperatura de 50 °C por 5 h. Luego, la muestra se tamizó para clasificar y obtener el material de interés que son las semillas de uva. La humedad remanente de dichas semillas se determinó gravimétricamente mediante un nuevo secado, usando una muestra de alrededor de 5 g de semillas a las mismas condiciones durante 3h.

Después, se sumergieron las semillas dentro de una malla en un Dewar que previamente se cargó con nitrógeno líquido. Las semillas así congeladas se llevaron inmediatamente a un molino eléctrico. Las semillas molidas se sometieron luego a tamizado y se seleccionó la porción de material pasante malla 8 pero retenido en malla 14 (PM8/RM14), como materia prima para la extracción. El tamaño final de las semillas equivale a 2.38 mm aproximadamente. La disminución de tamaño de las semillas tiene como finalidad aumentar la superficie de contacto del fluido supercrítico a fin de facilitar la extracción. Por otro lado,

la molienda se debe efectuar a bajas temperaturas, para no afectar los componentes responsables de la capacidad antioxidante presente en la semilla, los cuales son termolábiles.

En vista de que se conoce que los compuestos antioxidantes son también sensibles a el oxígeno y la luz, las semillas se almacenaron al vacío en bolsas opacas de Mylar y se mantuvieron a -10 °C en un refrigerador, hasta su extracción con CO₂ supercrítico.

3.2 EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

La extracción de semillas de uva usando CO₂ como fluido supercrítico y etanol como cosolvente requiere del equipo de extracción que fue diseñado y construido por el grupo de investigación de Termodinámica Aplicada y Fluidos Supercríticos de la Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Valle. La Figura 3 muestra un esquema del equipo de extracción supercrítica utilizado, el cual consta de cinco secciones: enfriamiento de CO₂, bombeo de CO₂, bombeo de etanol, extracción, despresurización y recolección.

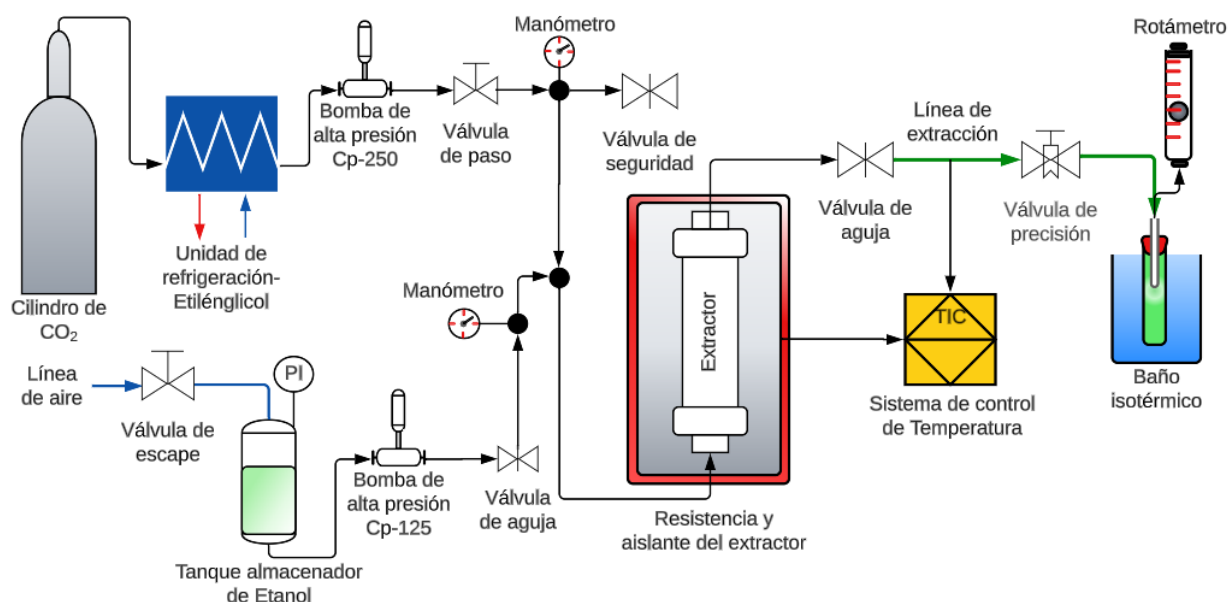


Figura 3. Esquema del equipo de extracción supercrítica utilizado.

En la zona de enfriamiento el CO₂ (pureza 99%, suministrado por Cryogas) se toma de un cilindro estándar y se pasa por un sistema de refrigeración, para disminuir su temperatura hasta -10 y -15 °C a fin de mantenerlo en fase líquida, a lo cual reduce la energía necesaria

para su compresión [14]. La refrigeración funciona con una solución acuosa de etilenglicol al 50% que se bombea a un intercambiador de calor.

Una vez el CO₂ se enfría, este pasa por una bomba neumática (CP-250) que cuenta con dos perillas, las cuales permiten regular el flujo al ajustar la longitud del pistón y la frecuencia en el movimiento del pistón. Experimentalmente la máxima presión de descarga de la bomba fue 6600 psi; sin embargo, está diseñada para 10000 psi. La presión se mide con la ayuda de un manómetro Bourdon ubicado sobre la línea de paso del flujo hacia el extractor; además, el equipo cuenta con una válvula manual de seguridad (High Pressure Company, PA USA) que se usa en caso de una sobrepresurización del sistema.

El CO₂ como fluido supercrítico se debe operar a condiciones de temperatura y presión por encima de 31°C y 73 bar, respectivamente. Para operar a dichas condiciones el CO₂ comprimido pasa por una zona de calentamiento y se desplaza a través de un serpentín que asegura un tiempo de residencia antes de entrar al extractor.

En conjunto también se hizo el bombeo de etanol absoluto (Pureza 99.9 %, suministrado por Merck), el cual se almacena en un segundo recipiente. Para que este solvente no adquiera humedad al contacto con el aire húmedo del ambiente el llenado de dicho recipiente se realizó al vacío. El llenado al vacío consiste en usar una jeringa para verter el etanol con la válvula de escape abierta, dejando que fluya aire hacia el exterior, ya que el tanque está conectado a una línea de aire seco proveniente de un lecho de sílica gel que captura su humedad.

El tanque con etanol está conectado a una bomba neumática (CP-125) al igual que para la CP-250, es posible regular el flujo ajustando la longitud de la carrera del pistón y su frecuencia. La presión de la bomba se registra en un manómetro Bourdon acoplado a la línea de paso de etanol que fluye hacia el extractor.

La etapa de extracción cuenta principalmente con un extractor de volumen útil de 100 mL, construido en acero inoxidable (SS 316L) capaz de soportar condiciones de operación exigentes (temperatura: 200°C y presión: 10000 psi). 40 g de semillas de uva se cargaron al extractor, y en cada extremo del mismo se colocó un filtro para que no haya fugas del material y este no obstruya la tubería. El volumen sobrante se completó con 6 esferas de cristal.

Las temperaturas del extractor, mezclador y de la línea de extracción se regulan usando controladores PID que usan sendas termocuplas como elemento de medida, y resistencias eléctricas como elemento final de control. Por otro lado, la presión de extracción se controla con la válvula micrométrica, siendo esta la misma que permite controlar el flujo de CO₂.

El CO₂ y el etanol ingresan por la parte inferior del extractor y se ponen en contacto con las partículas de la semilla de uva. Solvente y extracto fluyen entonces a la sección de despresurización y recolección, conformada por una tubería y dos válvulas. La primera es una válvula de paso y la siguiente es una válvula de aguja, cuya manipulación permite, como se mencionó, regular presión y flujo de solvente.

El tubo de recolección se instala dentro de un recipiente con agua tibia (baño isotérmico) y se acoplado a la línea de descarga de 1/16 pulg de diámetro que termina en forma de espiral. Así el flujo de descarga se dirige tangencialmente dentro del tubo, lo que facilita la separación del extracto de los flujos de CO₂ y Etanol [14]. El tubo de recolección se sella con un tapón de caucho que tiene una abertura para permitir la salida del CO₂ gaseoso despresurizado.

Antes de iniciar la extracción, se recomienda encender la unidad de refrigeración y el sistema de control de calentamiento 20 a 30 min antes, con el fin de asegurar que las temperaturas sean estables. Luego, se inicia el bombeo hasta alcanzar el valor deseado de presión y se juega con la apertura de la válvula de descarga, manteniendo la presión de operación y una marcación en el rotámetro de 40 a 50.

El tubo de recolección se cambia cada 15 minutos. Cada tubo retirado se sella con un tapón, se registra su peso, se recubre con papel aluminio y se almacena en un refrigerador a -10°C. El tiempo de extracción dura en promedio 2 h, al cabo de las cuales se procede a suspender el bombeo y despresurizar el sistema.

3.3 CALIBRACIÓN DE BOMBAS

La Figura 4 muestra el montaje experimental que se utilizó para calibrar el flujo suministrado por las bombas CP 250 y CP 125. Se conectaron las tuberías desde la bomba de interés a un tanque amortiguador previamente cargado con una suspensión que actúa como un amortiguador de presión, y que está conformada por 16.5 g de micelio, 2.25 g de floculante CMC disueltos en 66 mL de agua desionizada, diluidos en 200 mL de agua desionizada. La

suspensión mantiene la fuerza impulsora del pistón permitiendo que la presión se controle con mayor facilidad.

El flujo de salida del agua proveniente de un tanque se recolectó en un tubo inmediatamente después de encender la bomba, la prueba se realizó en un intervalo de presión de 0 a 4000 psi. Por cada presión fijada el tiempo varió en 1, 2 y 3 min.

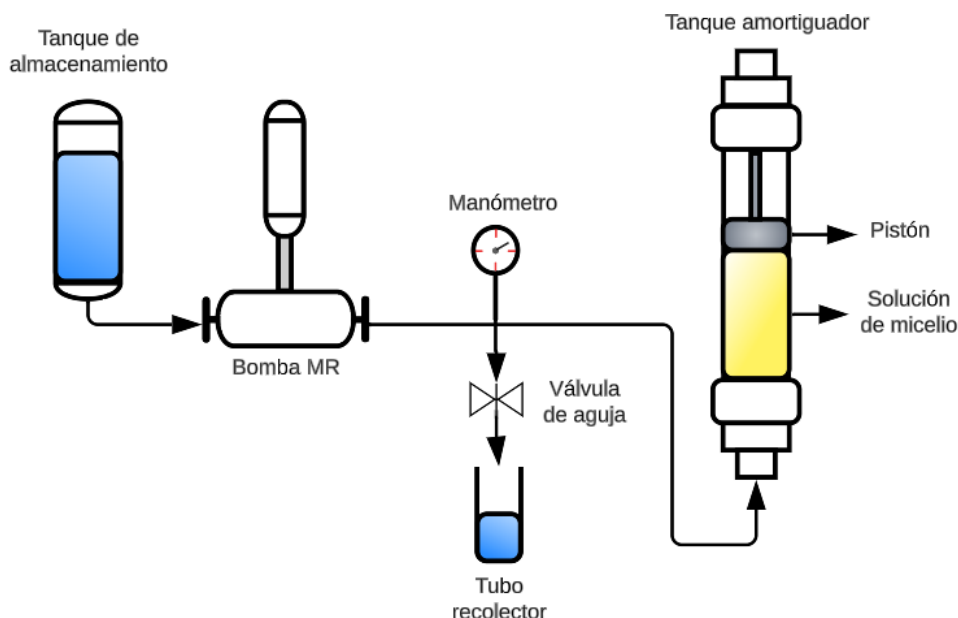


Figura 4. Montaje para calibración de las bombas CP 250 y CP 125.

Finalmente, se calcularon los caudales (Q) para analizar y determinar la configuración de la longitud de la carrera del pistón, en la relación de caudal $Q_{\text{Etanol}}/Q_{\text{CO}_2}$ deseada.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

La Tabla 1 muestra las condiciones de operación consideradas para la extracción. Se planteó un experimento factorial 2^3 aumentado con 3 puntos centrales, en el cual considera como factores temperatura, densidad del CO_2 y concentración de cosolvente (etanol). La variable de respuesta fue el rendimiento de extracción, calculado con la ecuación:

$$R = \left(\frac{W_e}{W_s} \right) \times 100\% \quad (1)$$

donde: R = rendimiento de extracción (%),

W_s = peso de semilla cargada al extractor (g),

W_e = peso de extracto obtenido (g).

Otras variables, tales como tamaño de la partícula, tiempo de extracción y flujo de CO₂ se mantuvieron constantes durante cada extracción, ya que en este estudio no se evaluó el efecto que tienen sobre el rendimiento. En el experimento factorial se estudió la densidad entre 0.7 y 0.9 g/cm³, la temperatura entre 42 y 62 °C y la concentración de cosolvente entre 0 y 5%.

Tabla 1. Condiciones de operación para la extracción de semillas de uva

Temperatura (°C)	Densidad del CO ₂ (g/cm ³)	Presión del CO ₂ (psig)	Relación de Etanol/CO ₂ (%)
42	0.7	1747	0
42	0.7	1747	5
42	0.9	4282	0
42	0.9	4282	5
62	0.7	2795	0
62	0.7	2795	5
62	0.9	6282	0
62	0.9	6282	5
52	0.8	3230	2.5

3.5 EVAPORACIÓN DEL COSOLVENTE

Los extractos en los que hubo presencia de cosolvente se sometieron a evaporación al vacío con el objetivo de separar el extracto del etanol, de acuerdo en el diagrama que se muestra en la Figura 5. En este montaje, se enciende la plancha para que inicie con el calentamiento de agua, el indicador de temperatura debe alcanzar el rango de 48 a 52 °C, sin sobrepasar el límite superior de temperatura para que no haya afectación de los componentes termolábiles del extracto. Se debe verificar que la plancha si ejerza movimiento sobre el agitador que está dentro del baño María.

La trampa de vapor se ensambló usando un recipiente plástico recubierto por un aislante al cual se le cargó intercaladamente una capa de hielo triturado seguido de una capa de sal hasta llenar el recipiente. Dentro del recipiente se introdujo un tubo de ensayo con desprendimiento lateral que va unido a la bomba por medio de una manguera y la entrada está conectada al tubo de fondo plano de 50 mL que va a contener la muestra más cosolvente (preferiblemente el tubo debe ser alto) con la ayuda de dos tapones con manguera.

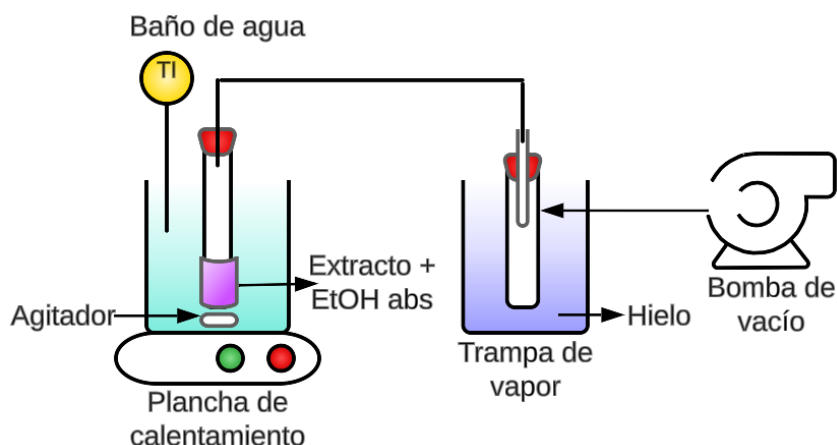


Figura 5. Diagrama del proceso de evaporación al vacío del cosolvente.

La evaporación en sí es muy sencilla, pero se sugiere que cada tubo en contacto con la muestra esté cubierto anticipadamente con aluminio para que los componentes antioxidantes que puedan estar presentes no se degraden por efecto de la luz. Cada evaporación debe durar 5 min, tiempo estipulado al hacer pruebas en las que se observó que se logró evaporar la mayoría del solvente. Si quedan rastros de muestra en el tubo recolector se añade etanol con la ayuda de una jeringa y nuevamente se realiza el proceso de evaporación.

3.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El método más usado para la determinación de la actividad antioxidante y que se ajustó a los recursos disponibles en el laboratorio de Fluidos supercríticos fue la técnica de Brand-Williams [28]. Para este proceso se preparó 50 mL de solución al 6×10^{-5} M de DPPH en n-hexano y se dejó agitando a 125 rpm, mientras tanto se prepararon 5 disoluciones del extracto diluidas con n-hexano hasta obtener las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 % g/mL. Luego se tomó 5 tubos de ensayo y en cada uno se añadió 3.9 mL de la solución de DPPH, posteriormente en cada tubo se adicionó 0.1 mL del extracto diluido. Se determinó la absorbancia a 515 nm usando un espectrofotómetro UV-vis, además se utilizó n-hexano como blanco para la medición [3].

La absorbancia de la solución de DPPH se midió en el tiempo cero, y luego, después de adicionar los 0.1 mL del extracto se registró la absorbancia durante 80 min, leyéndola cada minuto durante los primeros cinco minutos y cada cinco minutos durante la siguiente hora. Para cada lectura de absorbancia se obtuvo la concentración de DPPH mediante una curva de calibración que relaciona la concentración de DPPH con la absorbancia.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN DE BOMBAS

La tabla 2 muestra los resultados de la calibración de las bombas de CO₂ y etanol. La finalidad es cumplir con la relación de flujos de etanol y CO₂. Se decidió mantener constante la longitud de carrera del pistón (SL) para el pistón de la bomba CP250 y variar el de la CP125.

Tabla 2. Calibración de las bombas de CO₂ (CP 250) y etanol (CP 125).

Temperatura (°C)	Densidad del CO ₂ (g/cm ³)	Presión de descarga (psi)	Bomba de CO ₂		Bomba de EtOH	
			Caudal (mL/min)	Carrera de pistón (%)	Caudal (mL/min)	Carrera de pistón (%)
52	0.8	3232	18.73	0.67	0.468	0.014
62	0.9	6284	9.32	0.67	0.464	0.017
62	0.9	4284	15.49	0.67	0.774	0.025
42	0.7	1748	23.3	0.67	1.165	0.033
42	0.7	2796	20.07	0.67	1	0.030

4.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN SUPERCRTICA

Todos los extractos de semilla de uva obtenidos mediante extracción supercrítica a diferentes condiciones mostraron características parecidas: aceite de consistencia muy viscosa y densa, con un olor similar al de fermentado de uva. En cuanto a su color existe una particularidad, para cada corrida el extracto obtenido en los primeros 8 min presentó un color amarillo intenso; sin embargo, el extracto que se obtuvo a tiempos superiores presentó un color verde cuya intensidad aumentó a mayor tiempo de extracción, como se muestra en la fotografía de la Figura 6, que se le tomó al extracto de semillas de uva obtenido en la corrida 5 (62°C y 6280 psi). Los tubos están organizados de menor (Tubo 1) a mayor (Tubo 4) tiempo de extracción recordando que estos se cambian cada 15 min.

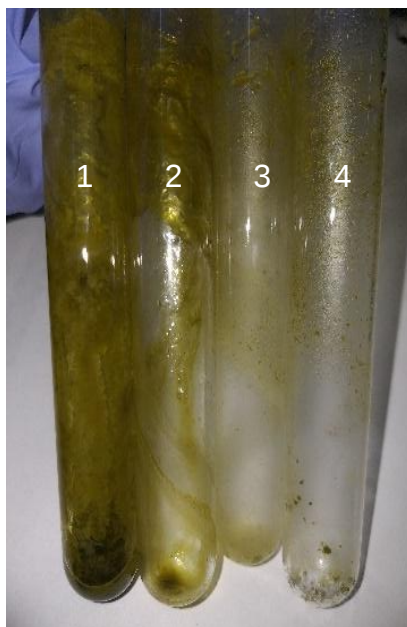


Figura 6. Extracto de semillas de uva obtenido en extracción supercrítica.

Al inicio del proceso se extrae mayor cantidad de aceite, la cual disminuye con el paso del tiempo. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para el rendimiento de extracción. Observe que los mayores rendimientos se presentan en las corridas 4, 5, 8 y 9, cuyos valores superan el 5%.

Tabla 3. Resultados del rendimiento de la extracción.

Corrida	Temperatura (°C)	Densidad del CO ₂ (g/cm ³)	Presión (psig)	Relación EtOH/CO ₂ (%)	Rendimiento (%)
1	42	0.7	1700	0	2.2582
2	62	0.7	2800	0	4.1112
3	42	0.9	4300	0	2.2194
4	42	0.7	1700	5	5.2686
5	62	0.9	6300	0	5.9004
6	52	0.8	3200	2.5	3.8534
7	62	0.7	2800	5	4.5236
8	42	0.9	4300	5	5.0264
9	62	0.9	6300	5	5.0538
10	52	0.8	3200	2.5	3.1167
11	52	0.8	3200	2.5	3.1260

Para analizar la desviación experimental, se corrió un punto central con dos réplicas. Los rendimientos resultantes fueron: 3.85%, 3.12% y 3.13%: noté que, aunque uno de los rendimientos está alejado, dos de ellos son muy similares y por tanto se puede decir que los resultados son altamente reproducibles.

4.3 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL RENDIMIENTO

Los resultados del rendimiento en cada corrida se analizaron por medio del ajuste de un estadístico utilizando el software JMP. Del resumen arrojado por esta herramienta se extrae el análisis de varianza (ANOVA), que sirve para comparar los factores de temperatura, densidad y concentración de etanol, además de analizar el efecto sobre la respuesta de interés (rendimientos).

La Figura 7 muestra la gráfica estadística de rendimiento observado vs rendimiento predicho. El área de la franja roja representa el porcentaje de variabilidad respecto al ajuste del modelo, esta medida es cuantificable y corresponde al valor de $R^2 = 0.79$, es decir entre más cercano a 1 sea R^2 es mejor la predicción y será menor la distribución alrededor de la línea roja.

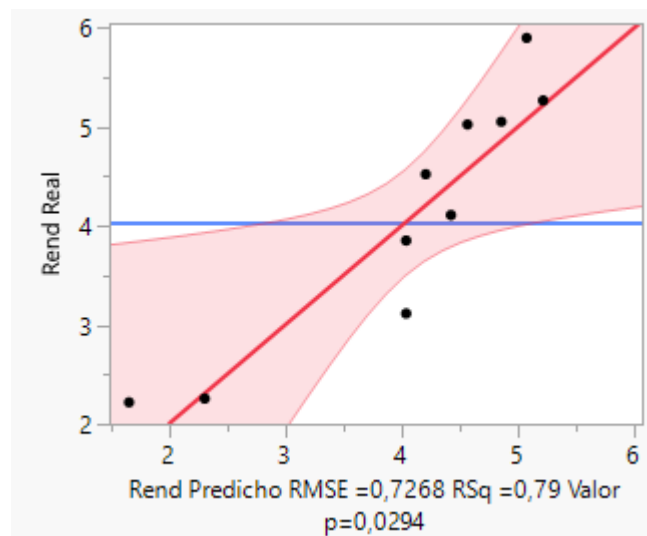


Figura 7. Grafica estadística, rendimiento real vs predichos.

Es usual indicar el valor P dentro de la ANOVA; aun así, se decidió analizar por separado, como se observa en la Tabla 4. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores respecto al error promedio de los puntos centrales. En este caso, se han descartado ciertos cruces de variables, además del factor independiente: densidad (ρ), con el fin de mejorar el ajuste del proyecto. Cuando el valor-P es menor que 0.05, indica que existe una influencia fuerte respecto al rendimiento con un 95.0 % de nivel de confianza. En orden de mayor a menor los factores que tienen un efecto significativo sobre la respuesta es el cruce de Temperatura (T) y % Relación de Etanol (E), seguido de las mismas variables de forma independiente y con la probabilidad del 25% de estar equivocados se podría analizar detenidamente el cruce de densidad y temperatura.

Tabla 4. Valores P del análisis de factores.

Fuente	Log utilidad		Valor p
T*E	1.643		0.02277
E	1.402		0.03966
T	1.239		0.05762
ρ *T	0.597		0.25281

La Tabla 5 muestra el análisis de varianza de rendimiento (media de los cuadrados) y la razón F es el cociente de la varianza (ajuste y error). Al ser un valor alto se entiende que hay una probabilidad considerable de que el modelo no tenga un buen ajuste, es decir, ciertos puntos de respuesta son dispersos respecto a la media [33].

Tabla 5. Análisis de varianza de rendimientos obtenidos de las extracciones.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
E (%)	1	3.6224	3.6224	6.08	0.069
ρ (g/cm ³)	1	0.5194	0.5194	0.87	0.403
T (°C)	1	2.8997	2.8997	4.87	0.092
Interacción de 2 términos	3	5.9979	1.9993	3.36	0.136
E (%) * ρ (g/cm ³)	1	0.2673	0.2673	0.45	0.540
E (%) * T(°C)	1	4.8853	4.8853	8.20	0.046
ρ (g/cm ³) * T(°C)	1	0.8453	0.8453	1.42	0.299
Error	4	2.3830	0.5957		
Falta de ajuste	2	2.0257	1.0128	5.67	0.150
Error puro	2	0.3573	0.1787		
Total	10	15.4223			

La Figura 8 muestra la gráfica de predicción del modelo, al comparar el comportamiento de los tres factores por separado que al combinarse predicen el porcentaje de rendimiento. Dentro de las pendientes graficadas es posible moverse de izquierda a derecha y viceversa, la finalidad es buscar la mejor combinación de las variables experimentales con relación al porcentaje de rendimiento.

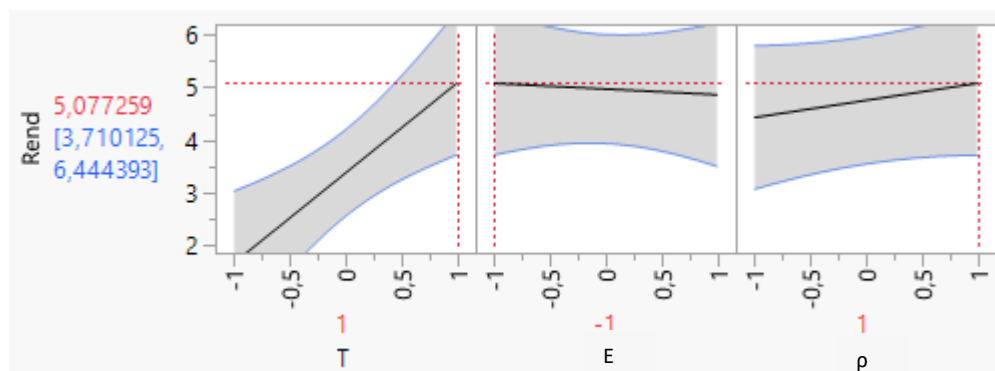


Figura 8. Grafica de predicción del modelo.

Según la Figura 8 la combinación de variables para obtener un rendimiento del 5.08% es operar el equipo de extracción bajo las condiciones de temperatura y densidad en sus máximos (62 °C y 0.9 g/cm³). Esta observación puede tener sentido bajo el concepto de que a densidades altas se encuentra un mayor número de moléculas de solvente por volumen definido asegurando que la distancia promedio entre las moléculas sea menor, lo que podría mejorar las interacciones para solubilizar el soluto [15].

Teóricamente el solvente (etanol) tiene efecto sobre las extracciones por servir como medio de transporte y por sus propiedades como solvente. Esto es coherente ya que al usar etanol los rendimientos están por encima del 3%; no obstante, al interpretar la Figura 8 y realizar la simulación se infiere que el efecto es negativo porque el modelo optimiza este recurso al evaluar que los rendimientos no son muy diferentes en ese rango de porcentaje de etanol usado (0 a 5%) y adicional hay puntos del diseño donde el rendimiento del extracto sin etanol alcanzó altos rendimientos al operar en el límite superior con las condiciones restantes.

En resumen, el modelo que describe el proyecto de extracción es la Ecuación 2, siendo el objetivo la variable del rendimiento, esto se logra al producir una relación de los efectos combinados de la densidad, temperatura y % relación de etanol.

$$y = 4.041 + 0.602T + 0.673E + \rho(0.325T) + T(-0.781E) \quad (2)$$

donde: y = rendimiento de extracción (%),

T = temperatura de extracción (°C),

ρ = densidad del CO₂ (g/cm³),

E = relación de etanol (%).

4.4 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO

De acuerdo con la metodología de Brand-Williams, la prueba de DPPH, para el antioxidante se formaron varias soluciones con el extracto y n-Hexano a diferentes concentraciones que varían de la siguiente forma: 2, 4, 6, 8 y 10 % g/mL.

Es evidente que las muestras experimentan una degradación de DPPH, ya que la solución de DPPH es de coloración púrpura y una vez se añade el extracto cambia progresivamente a una tonalidad amarilla. La Figura 9 es un ejemplo de la corrida 5, muestra el cambio de la coloración de DPPH en contacto con el extracto.

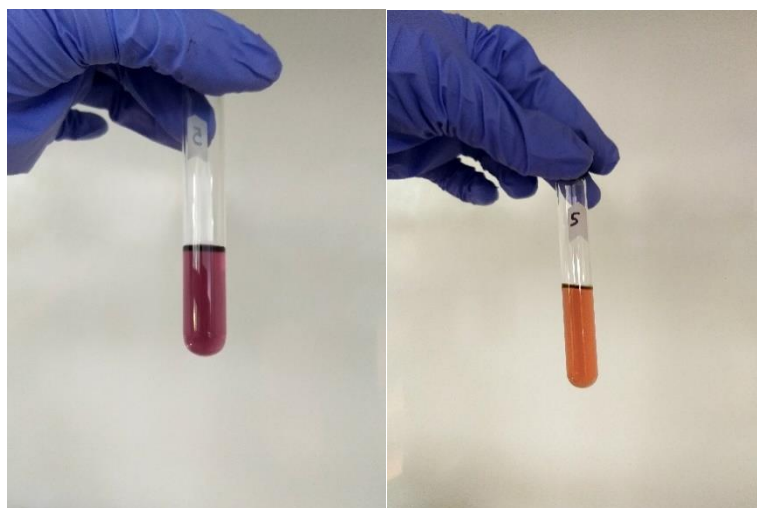


Figura 9. Cambio de coloración de DPPH al agregar extracto.

Para la medición de la concentración de DPPH se analizaron cinco muestras seleccionando en su mayoría las corridas con rendimientos altos y se nota que en tres de las muestras el factor de densidad es significativo cuando está en el límite superior. Se consideran puntos de interés todas las corridas con densidad igual a 0.9 g/cm^3 , siendo estas la 3, 5, 8 y 9 y se tomó una última muestra (corrida 4) con un rendimiento alrededor del 5% que particularmente se extrajo con condiciones de operación en el límite inferior excepto por el uso de cosolvente al 5%.

Las curvas de calibración de concentración de DPPH vs absorbancia, se obtienen al diluir DPPH con n-Hexano en 2, 4, 6, 8 y 10 % g/mL. Las curvas se usan como medio de relación entre la absorbancia y concentración del DPPH a partir de la ecuación lineal resultante. De esta forma se puede conocer la concentración en el tiempo durante la reacción del reactivo con el extracto.

En las Figuras 10 a 14 se visualiza el comportamiento de la concentración de DPPH en un periodo de tiempo experimental en contacto con el extracto de las corridas anteriormente nombradas.

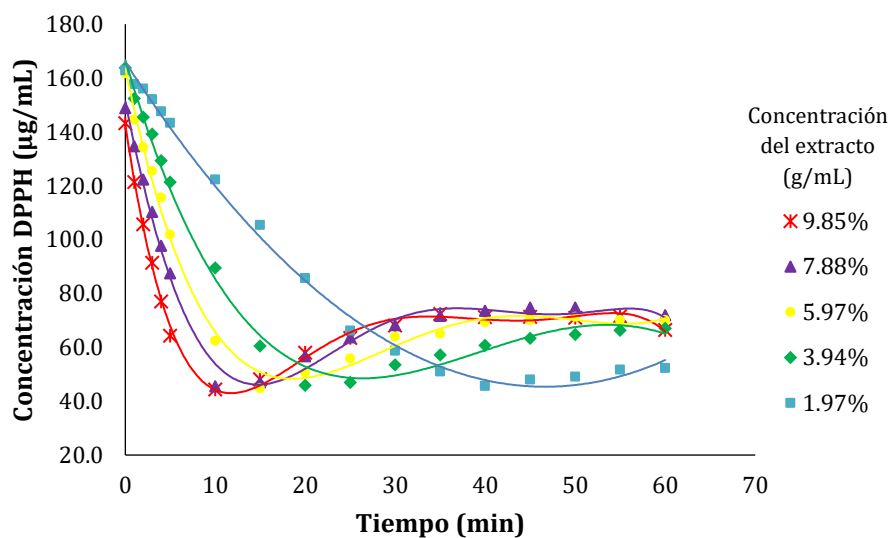


Figura 10. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 3.

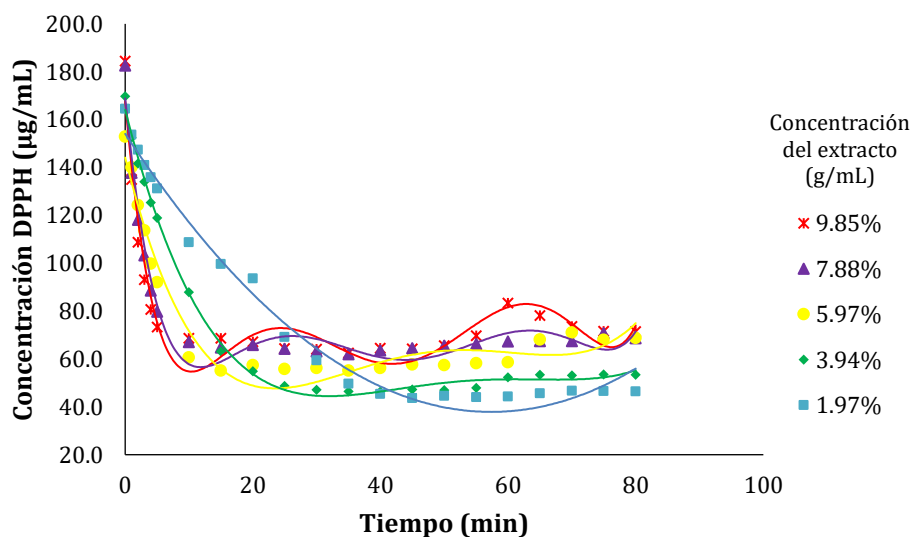


Figura 11. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 4.

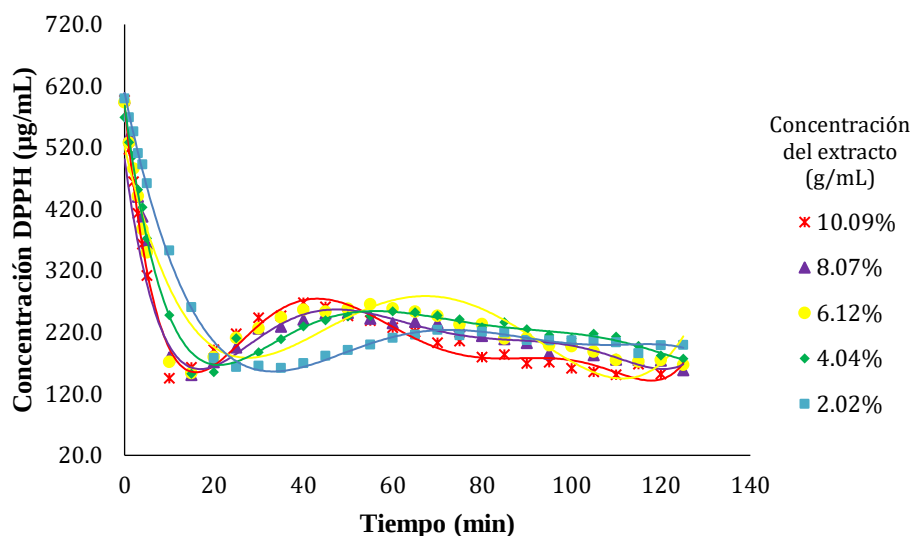


Figura 12. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 5.

De acuerdo con el método de Brand-Williams las curvas deberían decrecer y llegar a una estabilidad en el tiempo, es decir, la concentración de DPPH debería disminuir por la presencia del antioxidante, dado que el antioxidante captura los radicales libres presentes en la solución.

En las Figuras 10, 11 y 12 se observa una tendencia de disminución de la concentración del DPPH, pues su concentración baja alrededor del 50% en los primeros 15 min, esto indica la presencia de un antioxidante. Después de ese tiempo hay pequeñas oscilaciones de la concentración de DPPH y se esperaría que a un tiempo mayor de análisis la variación de la concentración de DPPH se estabilice.

Además, las curvas de las Figuras 10, 11 y 12 indican que la disminución del reactivo DPPH en la solución es proporcional a la cantidad adicionada del extracto, en otras palabras, a menor cantidad de extracto en contacto con el DPPH la reacción ocurre de forma más lenta, al capturar menor cantidad de radicales libres.

En las figuras 13 y 14, se observa que el comportamiento de la absorbancia cambia en el tiempo, presentando un incremento de la concentración de DPPH, una de la razón de este suceso es la gran cantidad de material no soluble en las muestras. Se cree que los sólidos son principalmente ceras y aunque el extracto se filtre antes de la medición, la particularidad de estos componentes es que después de un tiempo se vuelven a precipitar imposibilitando que la medición de espectrofotometría arroje un dato preciso de la absorbancia. Los sólidos

presentes en la muestra provocan un efecto Tyndall, el cual hace que la luz se disperse en diversas direcciones [34].

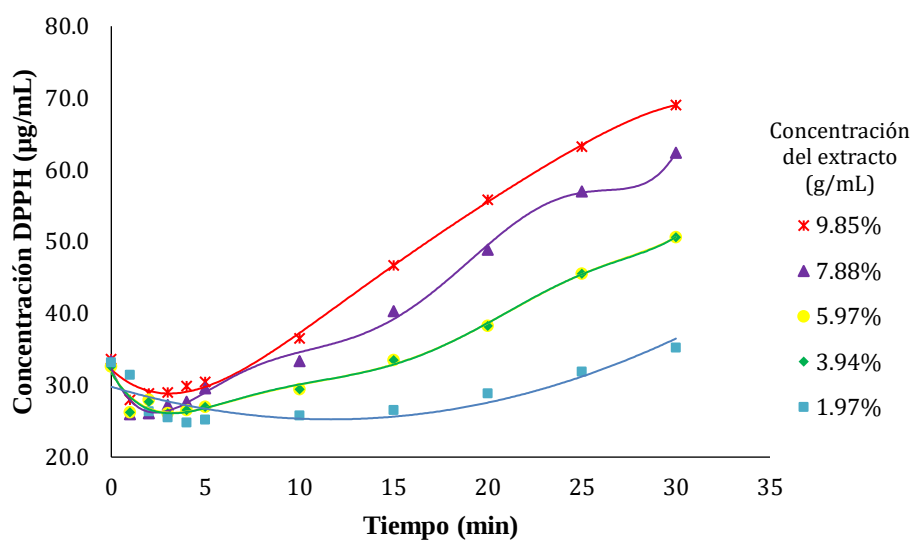


Figura 13. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 8.

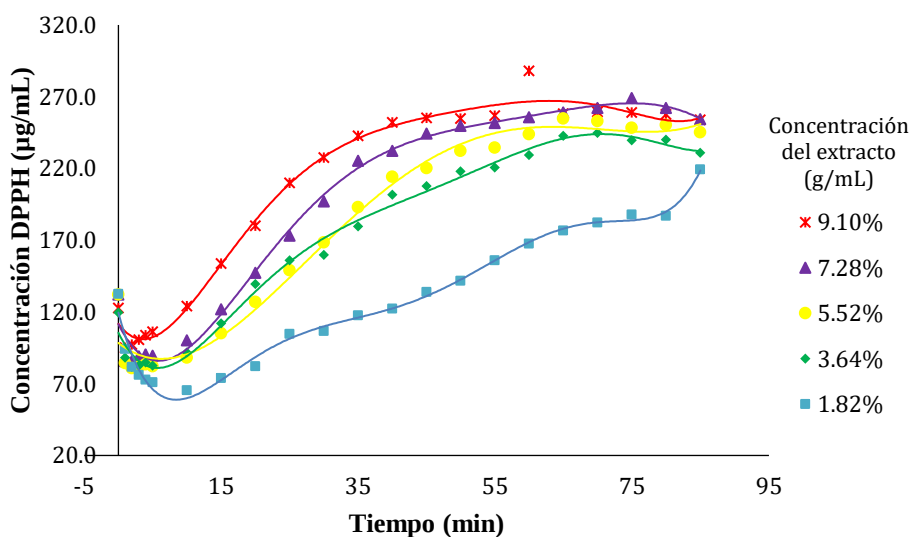


Figura 14. Comportamiento de la concentración de DPPH a través del tiempo en reacción con el extracto de la corrida 9.

La Figura 15 es un claro ejemplo del material sólido que se filtró en medición de la corrida 9. Se cree que por la naturaleza compleja de los extractos naturales a las condiciones de operación se extraen diferentes concentraciones de sólidos.

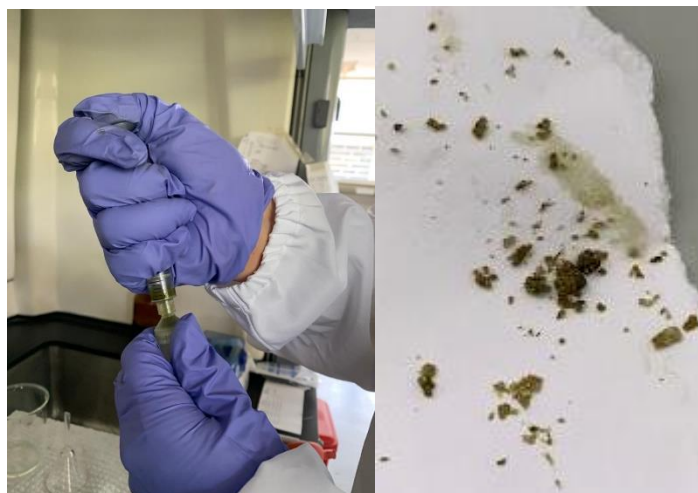


Figura 15. Material sólido filtrado de la corrida 9.

Con la información obtenida en las figuras 10,11 y 12 se estima la concentración de DPPH remanente que se refiere a la concentración restante después de que la reacción alcanza su estado estable en el tiempo. El interés de conocer la concentración de DPPH es determinar la cantidad mínima de extracto necesaria para disminuir los radicales libres en un 50 %, a esto se le llama EC_{50} .

El criterio de EC_{50} se realiza para las muestras de las corridas 3, 4 y 5, donde se puede observar un comportamiento más estable de las curvas de concentración de DPPH en el tiempo respecto a las otras pruebas. Cabe resaltar que el EC_{50} solo aplica para sustancias puras y solubles, en este caso dicho comportamiento se evidencia en el tiempo inicial de la reacción antes de que los sólidos presentes en la solución vuelvan a precipitar.

Teniendo en cuenta lo anterior, en las Figuras 16, 17 y 18 se graficó la concentración de DPPH remanente en un tiempo final de 15 min de cada medición en función de la concentración del extracto. La elección del intervalo de tiempo radica en que el material sólido presente en la medición de absorbancia no interfiere en los primeros minutos; sin embargo, es claro que después de un tiempo prolongado el material insoluble queda suspendido en la muestra y no es favorable para el análisis.

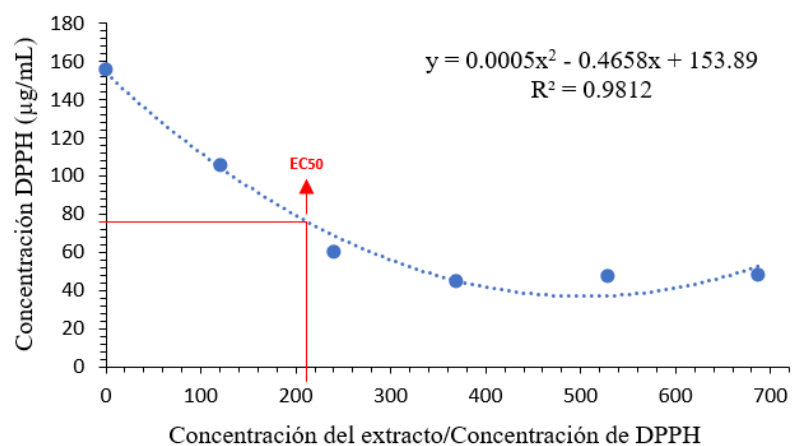


Figura 16. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 42°C, 0.9 g/cm³ y 0% de etanol.

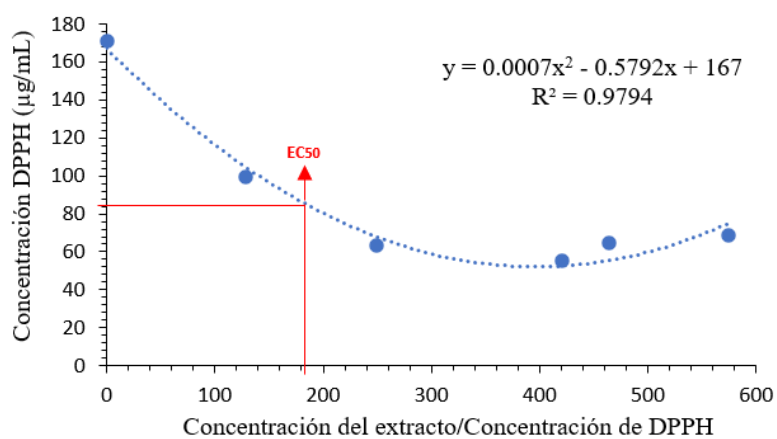


Figura 17. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 42°C, 0.7 g/cm³ y 5% de etanol.

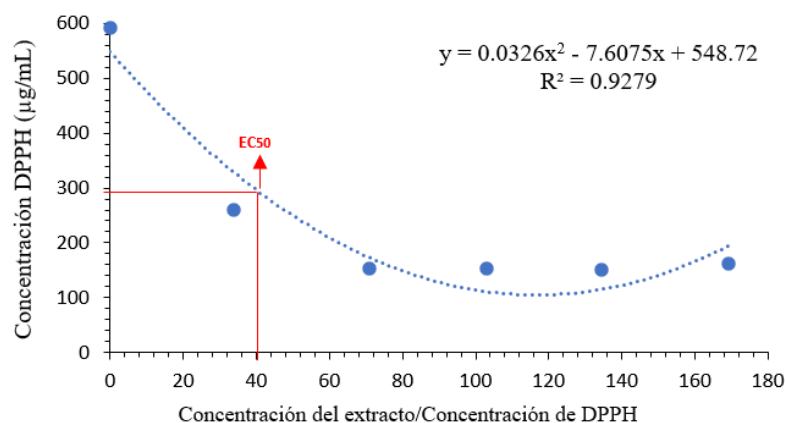


Figura 18. Curva de capacidad mínima inhibitoria a 62°C, 0.9 g/cm³ y 0% de etanol.

Los valores de EC_{50} con su respectivo ajuste se muestran en la Tabla 6. Los resultados indican que la muestra con mayor capacidad antirradical es el extracto de la corrida 5, al arrojar el menor valor de EC_{50} ; lo que significa que se requiere de menor cantidad de extracto de semilla de uva para disminuir considerablemente la concentración de radicales libres del reactivo.

Tabla 6. EC_{50} de las corridas 3, 4 y 5.

Temperatura (°C)	Densidad del CO ₂ (g/cm ³)	Relación EtOH/CO ₂ (%)	Rendimiento (%)	EC_{50} (g Ao/g DPPH)	R^2
42	0.9	0	2.23	210.36	0.98
42	0.7	5	5.26	179.99	0.97
62	0.9	0	5.9	40.16	0.92

Se tiene como referencia que el BHT que es un antioxidante puro tiene un EC_{50} de 0.1 gAO/g DPPH. Por otro lado, el EC_{50} de la corrida es significativamente mayor por ser un extracto crudo.

5. DISEÑO PRELIMINAR DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

5.1 ESCALAMIENTO DEL PROCESO.

Inicialmente se tomó la decisión de no usar cosolvente para el escalamiento del proceso. El etanol disuelve varios componentes naturales presentes en las semillas de uva, y en consecuencia se observó mayor presencia de solutos en las corridas que usaron concentraciones del 2.5 a 5% de este cosolvente, en comparación con las corridas donde el porcentaje de etanol fue nulo. Los sólidos suspendidos en el extracto alteran la medición de absorbancia y el análisis de la actividad antioxidante del método de Brand-Williams.

Teniendo en cuenta los dos criterios desarrollados durante la experimentación donde se buscan altos rendimientos y poder antioxidante, se llegó a la conclusión de seleccionar 6250 psi y 62 °C correspondientes a una densidad del CO₂ de 0.9 g/cm³ como las condiciones de extracción más favorables para el proceso.

De la corrida 5 se obtuvieron aproximadamente 2.47 g de aceite de un total de 42.12 g de semillas, lo cual corresponde a un rendimiento de 5.90 % en un tiempo de extracción de 1 h. En este caso el extracto se recolectó en 4 tubos que se cambiaron cada 15 min, en el tubo número 4 el aceite pesó 0.07 g, es decir, que pasado este tiempo de extracción sería mínimo lo que se obtiene y no justificaría los insumos requeridos para extender el tiempo de extracción; sin embargo, se optó por dejar un tiempo final de extracción de 2 h, incluyendo la despresurización del sistema (0.5 h).

En los extractos naturales es común que el rendimiento máximo sea alrededor del 5 %, por ello se cree que no es necesaria una corrida exhaustiva ya que el rendimiento de la corrida 5 fue satisfactorio para el propósito del proyecto.

Según una estadística realizada en el año 2019, el Valle del Cauca es el departamento con la mayor producción de uva Isabella en Colombia, registrando 19513 ton/año [35]. Para determinar la cantidad de desechos y especialmente la de semilla, se toma de la literatura que de 100 kg de uva procesada el 25% corresponde a desechos, de los cuales el 25% equivale a semillas, dato anteriormente mencionado. Entonces, de 1 kg de uva el 6% corresponde a semilla.

La cantidad de semillas disponibles es entonces aproximadamente 1170.8 ton/año; ahora bien, sería difícil disponer el 100% de la materia prima. En este caso los sectores de foco serían Ginebra y Santa Elena, populares por la siembra de uva y la producción de vino. Se asumió que se recogería un 4% del material bruto por cuestiones de logística, en otras palabras, una cantidad cercana a 47 ton/año entendiendo que la producción anual de uva varía.

Los parámetros iniciales que se especificaron para la extracción se resumen en la Tabla 7, algunos de estos parámetros se explican más detalladamente en el Apéndice B.

Tabla 7. Parámetros del proceso de extracción.

Parámetro	Valor
<i>Proceso: Batch</i>	
Número de corridas/día	8
Densidad de empaque	0.6 g/cm ³
Número de extractores	4
Volumen del extractor	7 L
Porcentaje de extracción	90%
Total días de operación	341
Tiempo de extracción	1.5 horas
Tiempo de carga y descarga	0.5 horas
Cantidad de semillas secas	36 kg/día
Cantidad de CO ₂	6726 kg/día
Flujo másico de CO ₂	6 kg/h

5.2 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO.

El diagrama de procesos para la extracción de semillas de uva se enfoca en dos unidades primordiales para la marcha de la planta. Se propone que en la unidad 100 se realice pretratamiento de materia prima y en la unidad 200 la extracción del producto de interés.

5.2.1 Descripción del proceso Unidad 100

En la Figura 19 se encuentra el diagrama PFD de la unidad 100. La materia prima es un desecho, por ello la planta debe estar preparada para recibir una mezcla de ramas, hollejos y semillas principalmente. La mezcla pasa por un secado al aire hasta que se retire un 10% de humedad. Las semillas son la materia prima de interés, por lo cual los residuos se someten a

un proceso de separación en una zaranda vibratoria (S-101) debido a su funcionalidad para clasificar productos sólidos por granulometría e inclusive sólidos de líquidos. Además, su construcción puede incluir una cubierta que proteja a las semillas de la luz [36].

Una vez se obtienen las semillas se llevan a la etapa de secado para retirar la humedad, que equivale al 65% aproximadamente. En este proceso se usa un horno convectivo (E-101) que funciona con aire seco. Sobre las semillas secas que se transportan se deja caer nitrógeno líquido (flujo controlado por una válvula) una vez lleguen al molino, de esta forma las semillas disminuyen su temperatura hasta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un proceso conocido como molienda criogénica.

El molino de rodillos con su respectiva criba (M-101) es útil ya que la cantidad de energía necesaria es menor al ser proporcional a la dureza del material [37], y las semillas no se consideran un material de difícil molienda. Las perforaciones de las cribas varían de 0.5 a 10 mm, para este proyecto puntualmente se admiten las partículas de tamaño PM8/RM14. Las semillas trituradas que no cumplan con el tamaño de partícula se recirculan nuevamente al molino, mientras que el resto de insumo aprobado se transfiere a una tolva de almacenamiento (TV-101) con destino a la unidad 200 y el material restante que se convierte en polvo se rechaza y equivale a un 4%.

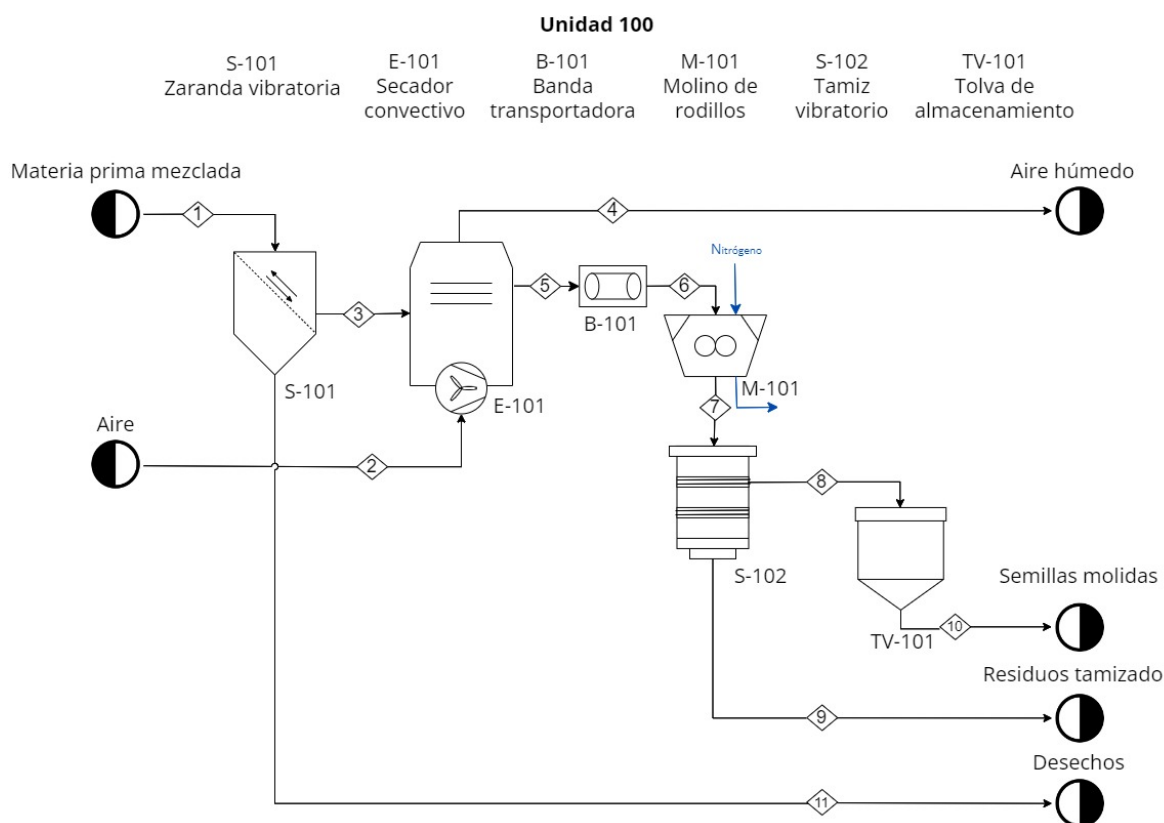


Figura 19. PFD de la unidad 100, pretratamiento de semillas de uva.

5.2.2 Descripción del proceso Unidad 200

En la Figura 20 se puede observar el diagrama PFD para la unidad 200, la cual corresponde a la etapa de extracción supercrítica usando CO₂. Se empieza la operación al cargar los extractores con las semillas de uva trituradas provenientes de la tolva (TV-101). Se plantea que la instalación tenga dos extractores (EX-201 y EX-202) y dos más (EX-203 y EX-204) que funcionen como reemplazo, lo cual permite disminuir el tiempo de carga y descarga al alternar los extractores en cada corrida.

Las semillas dentro del extractor se ponen en contacto con el CO₂ supercrítico que está almacenado en un recipiente (V-201). Para iniciar la extracción, el CO₂ se debe enfriar (E-201), luego comprimir (P-201) a alta presión (6280 psi) y por último se calienta (E-202) hasta alcanzar la temperatura de operación (62°C).

Se estima que el CO₂ en contacto con las semillas disuelve alrededor del 90% del aceite esencial y el 10% corresponde a los componentes insolubles que se desecha junto con el material sólido de las semillas. El CO₂ y el extracto se separan utilizando un separador ciclónico (S-201) que está conectado a un filtro en línea que impide que partículas de extracto contaminen la tubería de recuperación del gas. El CO₂ se recircula al proceso (V-201) con un rendimiento del 99.8% y antes de cada corrida se realiza una reposición del 2%.

Por último, se obtiene un extracto que debe almacenarse rigurosamente, es decir, que el contacto con el ambiente y la luz sea mínimo, a fin de no reducir la capacidad antioxidante. Además, se incluye realizar pruebas de análisis que evalúen la actividad antioxidante para mantener la calidad del producto y competir dentro de los estándares.

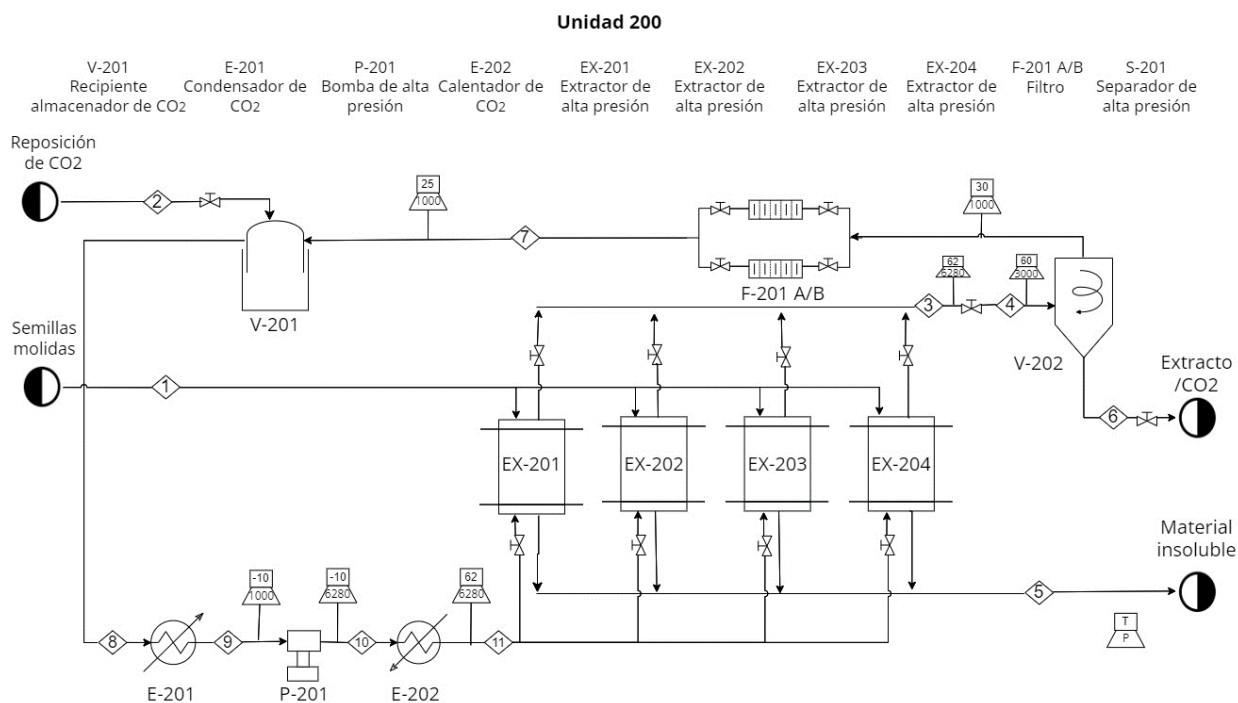


Figura 20. PFD de la unidad 200, planta de extracción de residuos de uva Isabella.

El balance de materia se realizó fijando un porcentaje de extracción en el proceso igual al 90%. Esto significa que en la planta se producen 627.44 kg/año de extracto de semilla de uva. Las Tablas 8 y 9 contienen los balances de materia de las unidades 100 y 200, respectivamente.

Tabla 8. Balance de materia para la unidad 100.

Corriente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°C)	25	40	25	25	40	25	-20	15	20	25	25
Presión (psi)	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69	14.69
Flujo másico (kg/día)											
Sólidos insolubles	142.60	-	34.05	-	34.05	34.05	34.05	32.69	1.36	32.69	108.55
Extracto	2.13	-	2.13	-	2.13	2.13	2.13	2.05	0.09	2.05	-
Agua	268.80	-	67.20	67.20	-	-	-	-	-	-	201.60
Aire	-	1152	-	1152	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (kg/día)	413.54	1152	103.38	1219.20	36.18	36.18	36.18	34.74	1.45	34.74	310.15

Tabla 9. Balance de materia para la unidad 200.

Corriente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temperatura (°C)	25	40	62	60	25	25	25	25	-10	-10	62
Presión (psi)	14.69	1000	6280	3000	14.69	14.69	1000	1000	1000	6280	6280
Flujo másico (kg/día)											
Sólidos insolubles	32.69	-	-	-	32.69	-	-	-	-	-	-
Extracto	2.05	-	1.84	1.84	0.20	1.84	-	-	-	-	-
Agua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂	-	4.13	206.54	206.54	-	4.14	202.41	206.54	206.54	206.54	206.54
Total (kg/día)	34.74	4.13	208.38	208.38	32.89	5.98	202.41	202.41	202.41	202.41	202.41

5.3 DISEÑO DE EQUIPOS.

En la Tabla 10 se consigna las principales especificaciones de diseño de la unidad 100.

Tabla 10. Especificaciones de equipos Unidad 100.

Equipo	Especificaciones
Zaranda vibratoria (S-101) [36]	Material: Acero al carbón
	Malla: 6 mm y fondo
	Capacidad alimentación (kg/día) 400
	Diámetro (m) 0.9
	Consumo energía (kW) 0.38
Secador convectivo (E-101) [38]	Material: Acero inoxidable 1.4301
	Capacidad máx de alimentación (kg/día) 120
	Consumo energía (kW) 1.8
	Flujo de aire (kg/h) 75
	Velocidad de aire (m/h) 1000
	Trampilla (%) 50
	Ventilador (%) 50
Tanque de almacenamiento nitrógeno líquido	Material: Acero al carbón
	Capacidad de almacenamiento (L) 400
	Diámetro interno (m) 0.60
	Altura (m) 1.49
	Espesor de la pared (m) 0.01
Molino de criba (M-101 y S-102) [37]	Consumo energía (kW) 0.75
	Malla 8 (2.38 mm)
	Malla 14 (1.41 mm)
	recipiente fondo
Tolva de almacenamiento Materia prima (TV-101)	Material: Acero inoxidable 316
	Diámetro (m) 0.23
	Altura (m) 1.16
	Espesor de la pared (m) 0.01

En la Tabla 11 se registra las principales especificaciones de diseño de la unidad 200

Tabla 11. Especificaciones de equipos Unidad 200.

Equipo	Especificaciones	
Tanque de almacenamiento CO ₂ (V-201)	Diámetro (m)	0.47
	Altura (m)	0.95
	Espesor de la pared (m)	0.03
Bomba de alta presión (P-201)	Tipo: desplazamiento positivo	
	Potencia requerida (kW)	11.27
	Flujo de diseño (kg/s)	0.25
	Presión de descarga de diseño (psi)	9000
	Presión de succión (psi)	1000
Separador ciclónico de alta presión (V-202)	Material: Acero inoxidable 316	
	Diámetro Superior (m)	0.38
	Altura (m)	0.75
	Espesor de la pared (m)	0.02
Extractores (E-201 a E-204)	Material: Acero inoxidable 316	
	Diámetro interno (m)	0.11
	Altura (m)	0.57
	Espesor de la pared (m)	0.25
Condensador (E-201)	Doble tubo	
	Consumo energía (kW)	15
	Presión coraza (psi)	14.7
	Presión tubo (psi)	1000
	Presión de diseño (psi)	6000
Calentador (E-202)	Doble tubo	
	Material: Acero inoxidable 304	
	Presión coraza (psi)	14.7
	Presión tubo (psi)	7000
	Presión de diseño (psi)	9000

En el Apéndice B, se explican algunas de las consideraciones para calcular las especificaciones de los equipos.

5.4 FACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL PROCESO.

El análisis económico es esencial dentro del proyecto, pues ayuda a definir la factibilidad económica del proceso. Se utilizó el método propuesto por Turton [32]. Los principales costos de manufactura del método (COM) se calculan usando la siguiente ecuación:

$$COM = 0.304 FCI + 2.73C_{OL} + 1.23(C_{UT} + C_{WT} + C_{RM}) \quad (3)$$

donde: FCI = Inversión de capital,
 COL = Costo de mano de obra,
 CUT = Costo de servicios,
 CWT = Costo de tratamiento de residuos,

C_{RM} = Costo de materia prima.

5.4.1 Inversión de capital (FCI)

La inversión inicial incluye los costos de equipos, accesorios, instalación y espacio necesarios para el funcionamiento de la planta. La Tabla 12 indica el valor en dólares de los equipos de la unidad 100. Los precios se calcularon bajo los parámetros de diseño dependiendo del material y la mayoría con un proveedor directo.

Tabla 12. Especificaciones y costos de equipos de la unidad 100.

Equipo	Especificaciones	Cantidad	Costo por unidad (USD)	Costo total (USD)
Zaranda vibratoria (S-101)	Material: CS	1	10400	10400
	Malla: 6 mm y fondo			
	D (m)0.9			
	Consumo de energía (kW)0.38			
Secador convectivo (E-101)	Material: SS 1.4301	1	2987	2987
	Capacidad máx de alimentación (kg/día)120			
	Flujo de aire (kg/h)75			
	Velocidad de aire (m/h)1000			
Tanque de almacenamiento Nitrógeno líquido	Material: CS	1	5800	5800
	Capacidad (L)400			
	Di (m)0.44			
	H (m)1.10			
	t (m)0.01			
Molino de criba (M-101 y S-102)	Material: SS 304	1	25000	25000
	Consumo energía (kW)0.75			
	Malla 8 (2.38 mm)			
	Malla 14 (1.41 mm)			
	Recipiente fondo			
Tolva de almacenamiento Materia prima (TV-101)	Material: SS 316	1	7320	7320
	Di (m)0.24			
	H (m)1.19			
	t (mm)0.01			
COSTO TOTAL DE EQUIPOS (USD)				51507

La unidad 200, se consigue en el mercado completa (equipos, accesorios, tubería y sistema de control). El proveedor que se seleccionó fue CAREDDI [39] con amplia experiencia en el mercado y diseño de extractores de alta presión. Se realizó una cotización respecto a la necesidad de la planta y se obtuvo un valor por el total de los equipos con algunas modificaciones, como se registra en la Tabla 13.

Tabla 13. Especificaciones y costos de equipos de la unidad 200.

Equipo	Especificaciones	Cantidad	Costo total unidad (USD)
Tanque de almacenamiento CO ₂ (V-201)	Diámetro (m)	0.47	1
	Altura (m)	0.95	
	Espesor de la pared (m)	0.03	
Bombas de alta presión (P-201)	Tipo: desplazamiento positivo		1
	Potencia requerida (kW)	11.27	
	Flujo de diseño (kg/s)	0.25	
	Presión de descarga de diseño (psi)	9000	
	Presión de succión (psi)	1000	
Separador ciclónico de alta presión (V-202)	Material: SS 316		2
	Presión máx de trabajo (psi)	3000	
	Capacidad vessel 1 (L)	5	
	Capacidad vessel 2 (L)	2	
Extractores (E-201 a E-204)	Material: SS 316		4
	Presión de diseño (psi)	10152	
	Di (m)	0.11	
	H (m)	0.57	
	t (mm)	0.25	
Condensador (E-201)	Doble tubo		1
	Material: SS 304		
	Área (m ²)	2	
	Presión coraza (psi)	14.7	
	Presión tubo (psi)	1000	
Calentador (E-202)	Doble tubo		1
	Material: SS 304		
	Área (m ²)	2	
	Presión coraza (psi)	14.7	
	Presión tubo (psi)	7000	
	Presión de diseño (psi)	9000	
COSTO TOTAL DE EQUIPOS (USD)			69800

El precio del terreno y la instalación se asume como el 15% y 8% del costo total de los equipos respectivamente. En general el proveedor incluye los fletes a su cargo, por ello no se tiene en cuenta el costo de envío de los equipos.

Sumando los costos totales de equipos, terreno e instalación FCI= 149207 USD

5.4.2 Costo de mano de obra (COL)

Inicialmente la planta trabajará dos turnos de 8 horas laborales, lo cual demanda un personal por turno de dos operarios, un analista de laboratorio y un ingeniero de procesos. En la Tabla 14 se resume el costo de mano de obra como salario base y las prestaciones sociales (salud, pensión, horas nocturnas y prima) como salario total.

Tabla 14. Costos de mano de obra de la planta.

Personal	Cantidad	Salario base (USD/año)	Salario total (USD/año)
Operario	4	\$20 129	\$31 199
Analista de laboratorio	2	\$18 945	\$30 311
Ingeniero de procesos	2	\$21 313	\$34 100
Costo total mano de obra (USD/año)			\$95 611

5.4.3 Costo de servicios (CUT)

El costo de servicios es la suma del costo de consumo eléctrico de equipos como secador convectivo, bomba, compresor y resistencias eléctricas. La energía consumida por el resto de los equipos, entre ellos, zaranda y molino de criba se asume como 12%.

Sí el costo de energía industrial por kWh es de 0.19 USD y la planta consume 589 kWh de energía por día, CUT es igual a 38139 USD/año

5.4.4 Costo de tratamiento de residuos (CWT)

Los residuos resultantes de la unidad 100 son las pieles y tallos, de la unidad 200 las semillas secas sin extracto, es decir, este material no requiere de tratamiento para ser directamente desechado como material orgánico, el costo estaría relacionado con el impuesto de basuras. En resumen, C_{WT} no se considera dentro del análisis económico.

5.4.5 Costo de materia prima (CRM)

La materia prima que se identificó para la producción del aceite dentro de la extracción son:

- Semilla de uva
- Nitrógeno
- Dióxido de carbono

La cantidad de semilla de uva se considera sobre los costos del transporte ya que la semilla es un desecho. La cantidad de semilla se estaría recogiendo 2 veces al mes, alrededor de 1.5 ton. Sin embargo, las industrias procesadoras de uva entregan la mezcla de pieles, tallo y semillas, es decir, 6 ton por carga de transporte aproximadamente. El costo de transporte

desde los municipios hasta a ciudad de Cali se puede calcular considerando la distancia por tramo (50 km) y el valor de 0.75 USD/km.

El nitrógeno líquido tiene un precio de 2.36 USD//L y al año se consume una cantidad de 6549 L. El dióxido de carbono tiene un valor de 10 USD//L y se consume 1795 L/año

En resumen, CRM= 35203 USD/año

5.4.6 Otros costos

Esta sección se refiere a los costos que no aplican en la anterior clasificación, pero que está implícito para que la planta esté en funcionamiento

- Mantenimiento
- Costo administrativo
- Laboratorio

En la Tabla 15 se resume el costo de manufactura y el costo económico total del proyecto.

Tabla 15. Resumen del costo económico del proyecto.

Tipo de costo	Valor (USD/año)
Inversiones de capital (FCI)	149 207
Costo de servicios (C_{UT})	38 139
Costo de mano de obra (C_{OL})	95 611
Costo de materia prima (C_{RM})	35 203
Costo de manufactura (COM)	318 160
Costos administrativos	6 363
Mantenimiento	5 968
Laboratorio y marketing	9 545

A nivel mundial Colombia participa en menos del 3% de importaciones totales de los aceites esenciales su fuerte son los aceites esenciales de origen cítrico. En el año 2021, *The Observatory of Economic Complexity* (OEC) reportó que Colombia importó 17.8 Mill USD principalmente de Estados Unidos, India y Argentina y exportó 1.46 Mill USD a destinos como Reino Unido, México y Panamá de aceites esenciales [40].

El modelo de negocio que se propone es *Bussiness to Customer* (BTC). Para entrar al mercado se debe cumplir con medidas de calidad y alto contenido de antioxidante. Uno de los ingredientes de interés es el resveratrol, que ha causado gran interés en las industrias farmacéuticas, de alimentos e inclusive de cosméticos por las propiedades para neutralizar

radicales libres. Por esta razón se suma a los costos un porcentaje de 3% destinados al área de laboratorio y marketing.

Para determinar el precio del producto se realizó un sondeo del mercado visitando lugares oficiales como Mercado Libre, Amazon, entre otros, en su mayoría la presentación del aceite esencial semilla de uva y el resveratrol se comercializa de 30 a 100 mL y sus precios varían de 8 a 45 USD. Además, la concentración presente es de un 3 a 10% del peso neto. Se observa que hay una oportunidad de negocio al ofrecer un producto que aspira a cumplir con medidas de calidad y a fijar un precio de 14.93 USD y una presentación de 30 mL. Este precio es acorde al costo de producción que es 495 USD/kg y el precio de venta sería 553USD/kg.

La Figura 21 representa el flujo de ingresos del proyecto de extracción durante 10 años. Para calcular el flujo efectivo, valor presente neto (VPN) y la tasa de retorno (TIR) se tuvieron en cuenta los siguientes puntos:

- La participación en el mercado y el incremento anual de participación es igual al 2%
- El incremento anual de precios es del 5%
- El primer año de producción las ventas serán del 60% de inventario.
- Se estima una depreciación a 10 años.

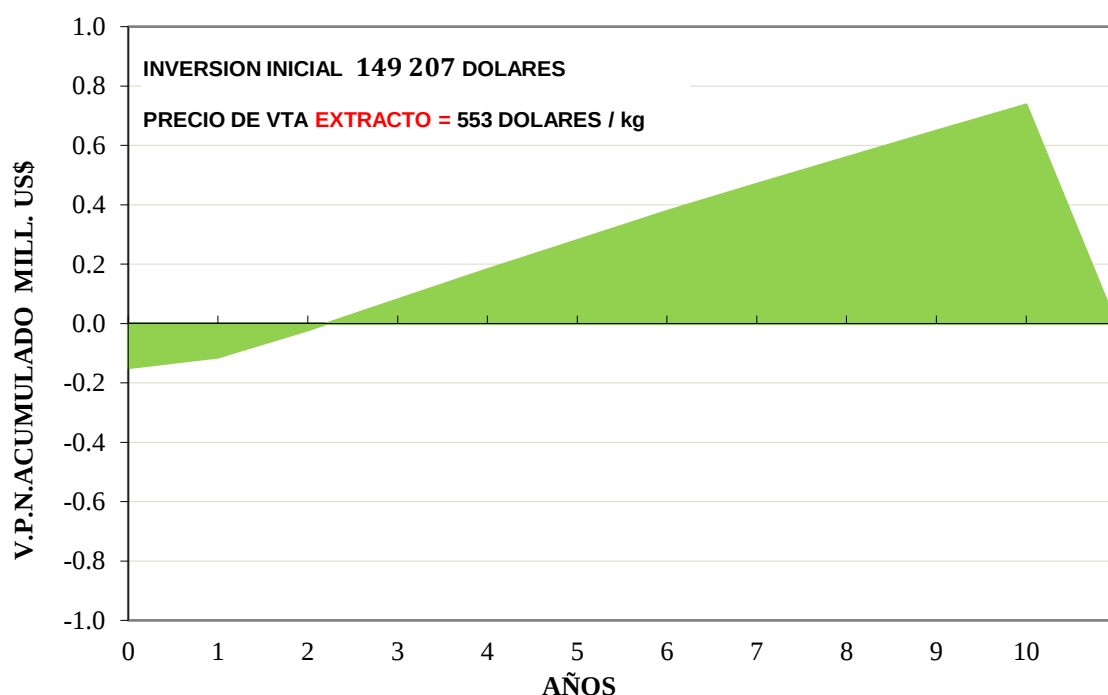


Figura 21. Flujo de ingresos del proyecto de extracción de semilla de uva durante 10 años.

La Figura 21 indica que alrededor de 2 años se podría recuperar la inversión inicial (FCI) y después de 10 años se obtiene un ingreso de 737000 USD. El análisis económico arroja que el proyecto es factible y se observa que el VPN es positivo con una TIR de 47%. Además, el proyecto sería interesante para inversionistas por su rentabilidad y bajo costo de inversión entendiendo que es una planta pequeña, pero podría aumentar su capacidad al aumentar 1 turno laboral y llevar a un nivel máximo la producción utilizando un extractor más en la operación.

6. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIÓN

De la semilla de uva se obtuvieron altos rendimientos de extracto, y se puede afirmar que estos resultados estuvieron directamente relacionados con las condiciones de operación, donde el mayor rendimiento fue 5.9% a 62 °C y 6280 psi, que posteriormente se seleccionaron como las condiciones de escalamiento.

En la primera hora de extracción se obtiene la mayor cantidad de extracto, y pasado este tiempo la producción en una corrida baja considerablemente hasta un 3% aproximadamente. Los extractos se caracterizan por ser aceites bastantes densos y de color es amarillo verdoso, con un fuerte olor a fermentado de uva.

El método de Brand-Williams se aplicó a 5 de 11 muestras, las cuales se eligieron por sus altos rendimientos y una de ellas por ser un punto central del diseño experimental. En el análisis de la capacidad antioxidante se determinó que en tres muestras de las corridas 3, 4 y 5 hay una presencia notoria de antioxidantes. Además, hay una relación proporcionalmente inversa entre la concentración de extracto y concentración de DPPH. En las corridas 8 y 9 no se puede aplicar el método por la presencia de material sólido en las muestras resultado de la extracción.

Se demostró que el extracto de la corrida 5 (62 °C y 6280 psi) obtuvo el menor EC_{50} igual a 40 g/mL y es considerablemente menor respecto a las otras corridas donde el valor de EC_{50} ronda en 200 g/mL. El menor resultado de EC_{50} es favorable ya que significa que se necesitó una menor concentración de extracto para reducir la concentración de radicales libres a su mitad.

Por medio del análisis de prefactibilidad económica se encontró que el proyecto es factible y se observa que hay una oportunidad de negocio para un producto con estudios de calidad y cumplimiento de parámetros de salud tanto para el consumo humano como para su aplicación tópica, ya que muchas de las presentaciones en el mercado son extractos artesanales que no cuentan con un respaldo.

Según el diseño técnico preliminar de la planta la inversión inicial es baja (149207 USD) respecto a otros proyectos de ingeniería donde se implementa la extracción supercrítica. Su

explicación radica en el tamaño de la planta (capacidad de 629 kg/año), la búsqueda de equipos automatizados que disminuya la cantidad de personal durante los primeros años de producción y la materia prima principal es un desecho. El objetivo es recuperar la inversión al cabo de 2 años y a 10 años un VPN acumulado de 737000 USD.

En resumen, el proyecto sería llamativo para inversionistas puesto que cuenta con una rentabilidad (TIR) del 47%. La planta está diseñada para ser ubicada en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, con la finalidad que a futuro se comercialice el producto en la zona sur occidente y centro del país. Se resalta que el negocio de los aceites esenciales que ha tomado fuerza en los últimos años por la cantidad de beneficios en el área de la salud y Colombia se ha posicionado en el puesto 88 en exportaciones de aceites.

6.2 RECOMENDACIONES

En este proyecto se sugiere realizar una caracterización del extracto de semilla de uva por medio de una cromatografía la cual permite identificar los componentes químicos y su concentración en el extracto, debido a que este es una mezcla multicomponente. Sumado a ello el producto final requiere cumplir con parámetros de calidad que establezca el tipo de antioxidantes que están presentes y su porcentaje.

El análisis de varianza enfatiza que hay influencia en el rendimiento al usar de etanol, este solvente favorece la extracción del antioxidante, pero también la de otros componentes los cuales se solidifican y alteran la medición de absorbancia del DPPH. La materia prima puede contener sustancias muy afines con el etanol, capaces de afectar la medición pese a que son filtrados. Por esta razón se aconseja no usar etanol, además el proyecto es pequeño lo que implicaría incrementar el costo de inversión al instalar una unidad de separación del extracto-solvente.

Según lo mencionado se recomienda complementar el método de Brand-Williams para el análisis de capacidad del antioxidante con otros métodos estandarizados colorimétricos como ABTS, FRAP. Es relevante profundizar sobre los métodos, puesto que las muestras donde no fue posible analizar la capacidad, indirectamente indicaban la presencia de un antioxidante ya que la solución de DPPH tomaba una coloración amarilla al añadir el extracto.

La planta está diseñada para usar 3 extractores en caso de que la demanda incremente; sin embargo, al observar las ganancias sería adecuado proponer que el volumen de los extractores se aumente a 10 L. La mayoría de los equipos están diseñados para procesar una cantidad mayor a la del proyecto, esto podría disminuir los costos de manufactura respecto al producto.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Resultados de la extracción y medición de DPPH de la Muestra 5

(T=62°C y P=6200 psi)

La cantidad obtenida de aceite en la prueba de extracción de la corrida 5 se registran en la Tabla A.1, se usó un total de 40 g de semillas trituradas y se obtuvo 2.4461 g que corresponde a un rendimiento del 5.9%

Tabla A.1. Resultados de la extracción a 62°C y 6280 psi

Tiempo (min)	Peso inicial tubo (g)	Peso final tubo (g)	Peso del extracto (g)	Peso acumulado del extracto (g)
15	18.9698	20.7683	1.7985	1.7985
30	19.0258	19.5153	0.4895	2.2880
45	19.1688	19.2575	0.0887	2.3767
60	18.9410	19.0104	0.0694	2.4461

La Figura A.1 es la curva de calibración que permite correlacionar la concentración en función de la absorbancia y que posteriormente se utiliza para determinar la concentración de DPPH al mezclar con el extracto.

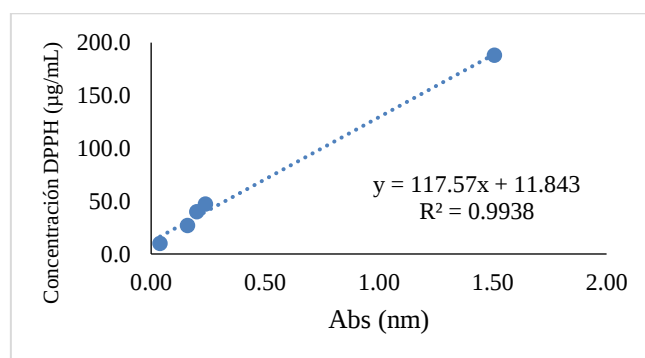


Figura A.1. Curva de calibración

La Tabla A.2 es la recopilación de datos en la medición de la actividad antioxidante durante la reacción entre el reactivo DPPH y antioxidante (extracto). A esta muestra en se le hizo un análisis durante 2 h, de hecho, es una de las pruebas más estables en el tiempo respecto a las otras muestras. Pasadas las 3 h se tomó un dato final para seguir su comportamiento.

Tabla A.2. Medición de absorbancia de DPPH

t (min)	Tubo 1 (10.09% g/mL)		Tubo 2 (8.07% g/mL)		Tubo 3 (6.12% g/mL)		Tubo 4 (4.04% g/mL)		Tubo 5 (2.02% g/mL)	
	Abs	[] DPPH µg/mL	Abs	[] DPPH µg/mL	Abs	[] DPPH µg/mL	Abs	[] DPPH µg/mL	Abs	[] DPPH µg/mL
0	1.213	596.572	1.22	599.983	1.206	593.162	1.156	568.800	1.219	599.496
1	1.05	517.154	1.095	539.079	1.072	527.873	1.073	528.360	1.156	568.800
2	0.942	464.533	0.019	14.819	0.986	485.971	1.029	506.922	1.109	545.901
3	0.836	412.887	0.892	440.172	0.894	441.146	0.915	451.378	1.037	510.820
4	0.734	363.189	0.825	407.527	0.784	387.551	0.856	422.631	0.999	492.305
5	0.629	312.030	0.736	364.164	0.706	349.547	0.753	372.447	0.937	462.097
10	0.287	145.397	0.356	179.016	0.341	171.708	0.497	247.716	0.712	352.470
15	0.323	162.937	0.297	150.269	0.304	153.680	0.302	152.706	0.524	260.871
20	0.382	191.684	0.34	171.220	0.357	179.503	0.307	155.142	0.354	178.042
25	0.435	217.507	0.389	195.095	0.421	210.686	0.42	210.199	0.324	163.425
30	0.488	243.330	0.452	225.790	0.453	226.277	0.373	187.299	0.328	165.374
35	0.495	246.741	0.458	228.714	0.489	243.818	0.417	208.737	0.321	161.963
40	0.538	267.692	0.482	240.407	0.515	256.486	0.459	229.201	0.337	169.759
45	0.525	261.358	0.502	250.152	0.509	253.562	0.48	239.433	0.361	181.452
50	0.495	246.741	0.504	251.126	0.518	257.947	0.493	245.767	0.381	191.197
55	0.479	238.945	0.485	241.869	0.533	265.256	0.495	246.741	0.399	199.967
60	0.455	227.252	0.47	234.560	0.519	258.435	0.51	254.050	0.421	210.686
65	0.441	220.431	0.474	236.509	0.508	253.075	0.506	252.101	0.432	216.046
70	0.405	202.890	0.47	234.560	0.495	246.741	0.496	247.228	0.448	223.841
75	0.41	205.326	0.459	229.201	0.466	232.611	0.483	240.894	0.43	215.071
80	0.357	179.503	0.427	213.609	0.467	233.099	0.456	227.739	0.441	220.431
85	0.366	183.888	0.417	208.737	0.419	209.712	0.473	236.022	0.439	219.456
90	0.336	169.271	0.404	202.403	0.42	210.199	0.45	224.816	0.414	207.275
95	0.34	171.220	0.369	185.350	0.397	198.993	0.431	215.558	0.413	206.788
100	0.32	161.476	0.411	205.814	0.393	197.044	0.419	209.712	0.413	206.788
105	0.308	155.629	0.363	182.427	0.375	188.273	0.435	217.507	0.414	207.275
110	0.298	150.757	0.348	175.118	0.347	174.631	0.425	212.635	0.406	203.378
115	0.334	168.297	0.347	174.631	0.342	172.195	0.394	197.531	0.37	185.837
120	0.3	151.731	0.345	173.657	0.347	174.631	0.362	181.939	0.396	198.505
125	0.313	158.065	0.313	158.065	0.331	166.835	0.352	177.067	0.398	199.480
200	0.233	119.087	0.252	128.344	0.222	113.727	0.249	126.882	0.298	150.757

APÉNDICE B

Parámetros para el diseño de equipos de la planta de extracción

La capacidad de la planta se calculó teniendo como referente la materia prima disponible en la región del Valle, anteriormente se mencionó dos regiones que destacan por practicar la viticultura Santa Elena y Ginebra, asumiendo que por logística se pueda acceder al 7% de los desechos, es decir, _ ton/año

Tener en cuenta las siguientes observaciones:

- El tiempo de extracción por carga de semilla es de 2 horas.
- La operación es Batch; sin embargo, el tiempo de carga, descarga y limpieza del extractor es irrelevante dentro de la operación porque se cuenta con otro extractor previamente cargado que puede reemplazar e iniciar la siguiente corrida de inmediato.
- Se propone una planta piloto que trabajará 2 turnos diarios de 8 horas, donde se realizará un total de 4 corridas.
- La capacidad de cada extractor es de 7 L.
- La planta estará en operación por 341 días, debido a que se destinarán 2 días de paro a limpieza y mantenimiento.
- El flujo de CO₂ requerido para una presión de 6280 psi se estimó midiendo el volumen de agua bombeada en un tiempo de 1, 2 y 3 min, la prueba se realizó a diferentes presiones y se estimó el flujo a la presión de interés.

La cantidad de materia prima que puede procesar el extractor se calcula con la densidad de empaque de la semilla de uva triturada que tiene un valor de 0.6 kg/L, entonces:

$$0.6 \frac{kg}{L} \times 7L = 4.2 \text{ kg de semilla de uva}$$

La humedad de la semilla es 65%, con este parámetro se calcula la cantidad de materia prima (semilla) sin secar que debe entrar a la unidad 100.

$$4.2 \text{ kg} \div 65\% = 6.46 \text{ kg de semilla de uva}$$

6.46 kg de semilla sin secar es lo que requiere el proceso para un solo extractor en una corrida. En un turno laboral se pueden realizar 4 corridas, la cantidad total de materia sería 25.84 kg/turno. Por lo tanto, la planta debe ser diseñada para procesar 35.25 ton/año.

B.1 DISEÑO DEL EXTRACTOR

La planta funcionará con cuatro extractores, dos operando en paralelo y el resto estarán en limpieza y carga de semillas. Los extractores serán recipientes de alta presión, de forma cilíndrica cerrados con bridas por una unión de junta de anillo y se construirán en acero inoxidable 316. (SS 316).

Cada extractor se dotará de una canastilla interna reforzada con una malla en acero inoxidable 316 que facilitará la carga y descarga de la semilla. Debido a las altas presiones y una tubería de ¼ in, las tapas de los extractores poseerán sellos de anillos en carbón.

El extractor por su forma cilíndrica se opta por la relación L/D, que varía entre 5 y 10, se asume la mínima (5). Conociendo el volumen (7 L) se tiene que el diámetro interno es:

$$D_{int} = \sqrt[3]{\frac{4V}{6\pi}} = 0.11 \text{ m} \quad (\text{B.1})$$

A continuación, se calcula el espesor de la pared tomada del Manual del Ingeniero Químico. Para evitar riesgos se diseña para 10000 psi en caso de que la presión de operación oscile por encima de lo previsto (6300 psi).

$$t = \frac{PR}{SE - 0.6P} \quad (\text{B.2})$$

donde:

- t = grosor mínimo de pared (in),
- P = presión de diseño (10000 psia),
- R = radio interno (2.25 in),
- S = máximo esfuerzo permisible (17430 psia en Acero 316),
- E = factor junta de soldadura (1, sin soldadura).

El máximo esfuerzo permisible para el acero inoxidable 316 es de 17430 psi, con un factor de junta igual a 1, puesto que no hay soldadura. Posteriormente se obtienen los siguientes resultados:

Diámetro interno	=	0.11 m
Altura (5 veces el diámetro)	=	0.57 m
Espesor de la pared (m)	=	0.25 m
Diámetro externo (m)	=	0.61 m

B.2 SECADOR CONVECTIVO E-101

Las semillas de uva tienen una humedad del 65%, este equipo retira la humedad presente utilizando aire del ambiente (humedad relativa 70 % y temperatura 25°C). El aire pasa por una resistencia que aumenta su temperatura a los 50°C y disminuye la humedad a 30%. Este pasa por todas las semillas con la ayuda de un ventilador que envía el aire a una velocidad de 1000 m/h, el proceso dura 1 hora y 30 minutos.

Las propiedades del aire se toman de la carta psicométrica a 1018 msnm:

Haire (25°C, Humedad relativa: 70%) = 65.3 kJ/kg aire seco.

Haire (50°C, Humedad relativa: 30%) = 119.8 kJ/kg aire seco.

Entonces, el evaporador requiere de 3924 kJ suministro de energético por corrida. Para suministrar 4 extractores y realizar las 8 corridas por día, se requiere secar 103 kg de semilla aproximadamente, por lo tanto, se propone el equipo UF75 de la empresa Memmert, que tiene una capacidad máxima de 120 kg.

B.3 TANQUE DE NITRÓGENO

La cantidad de semillas que debe enfriar el tanque de nitrógeno es 8.4 kg por corrida para dos extractores. En la preparación de la materia prima se abre una válvula que vierte directamente nitrógeno líquido sobre las semillas durante el proceso de molienda. La cantidad de nitrógeno se calcula con el balance de la Ecuación D.2.

$$m_{sem}C_p\Delta T = m_N\Delta H_N \quad (B.3)$$

donde:

- m_{sem} = masa de la semilla de uva (kg),
- C_p = Capacidad de calor específica de semilla (1.37 kJ/kg.°C),
- ΔT = diferencia de temperatura (°C),
- m_N = masa del nitrógeno (kg),
- ΔH_N = diferencia de entalpía del nitrógeno (-130.56 kJ/kg).

Se despeja m_N de la ecuación y se obtiene un valor de 1.98 kg esto significa que se gasta 15.8 kg de nitrógeno por día. Entonces, se diseñaría un tanque (Dewar industrial) para almacenar 400 L de este insumo, que debe ser llenado por el proveedor cada 15 días.

B.4 INTERCAMBIADOR DE CALOR E-201

El intercambiador E-201 se encarga de disminuir la temperatura del CO₂ y se usa etilenglicol como fluido refrigerante.

Las condiciones del CO₂ se extraen del NIST (web book):

$$H_{\text{CO}_2} (25^\circ\text{C}, 1000 \text{ psi}) = 269.77 \text{ kJ/kg.}$$

$$H_{\text{CO}_2} (-10^\circ\text{C}, 1000 \text{ psi}) = 174.91 \text{ kJ/kg.}$$

El calor que se debe retirar para un flujo de CO₂ por corrida es -612.2 kJ

B.5 INTERCAMBIADOR DE CALOR E-202

El intercambiador E-202 se encarga de aumentar la temperatura del CO₂ y se usa agua como de baja presión.

Nuevamente, las condiciones del CO₂ se extraen del NIST (web book):

$$H_{\text{CO}_2} (-10^\circ\text{C}, 1000 \text{ psi}) = 174.91 \text{ kJ/kg.}$$

$$H_{\text{CO}_2} (62^\circ\text{C}, 6280 \text{ psi}) = 307.75 \text{ kJ/kg.}$$

El calor que se debe suministrar para un flujo de CO₂ por corrida es 857.4 kJ

B.3 BOMBA DE ALTA PRESIÓN P-201

Bomba de desplazamiento positivo y se diseñará para una capacidad de 10000 psi y presión de succión 1000 psi y la de salida 6280 psi. La tasa de flujo se destinará para una capacidad de aproximadamente el doble del flujo que normalmente utiliza el sistema. La potencia de la bomba se reduce a la siguiente ecuación:

$$W = \Delta h_{\text{CO}_2} \tag{B.4}$$

donde: W = Potencia de la bomba (kg),

Δh_{CO_2} = Entalpía (3.71 kJ/kg).

Entonces, con una eficiencia de 80% la potencia resultante es 11.27 kW.

REFERENCIAS

- [1] D'Amario, M. (2018). *Extracción y caracterización de compuestos bioactivos remanentes en orujos y su utilización en la industria alimentaria con fines tecnológicos*. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Bromatología, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- [2] Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, L., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2): 206-212.
- [3] González, J., & Aramburo, K. (2011). *Extracción de aceite de germen de maíz (Zea Mays L.) usando CO₂ supercrítico*. Tesis de pregrado. Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- [4] Gil, G. (2012). *Identificación, cuantificación y capacidad antioxidante de compuestos fenólicos extraídos con CO₂ supercrítico a partir de residuos de berenjena*. Tesis de Maestría en ciencias. Centro de investigación de alimentación y desarrollo A.C, Hermosillo, México.
- [5] Gonzalez, L., Montenegro, S., & Abad, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2): 141-150.
- [6] Vargas Corredor, Yury & Pérez, Liliana. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1):59-72.
- [7] Agencia UNAL. (2020). Desechos de la uva serían materia prima de cosméticos y alimentos. Universidad Nacional de Colombia, (846). <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/desechos-de-la-uva-serian-materia-prima-de-cosmeticos-y-alimentos>
- [8] Gordillo, D., & Jaramillo, L. (2018). *Diseño de un sistema de costos de producción de uva por lote en la finca San Sebastián*. Tesis de pregrado. Facultad de las Ciencias de la Administración, Universidad del Valle, Zarzal, Colombia.
- [9] Ruales Salcedo, A. (2015). *Evaluación del potencial energético y bioactivo de residuos generados en la producción y transformación de la uva*. Tesis de maestría. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

- [10] Velasco, Reinaldo J, Villada, Héctor S, & Carrera, Jorge E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1):53-66.
- [11] Mojica, J., & Pérez, W. (2019). *Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales de la Industria Vinícola del Valle de Sáchica*. Servicio Nacional de Aprendizaje-SENA, Bogotá, Colombia.
- [12] Librán, C., Mayor, L., Garcia-Castello, E., & Vidal-Brotons, D. (2013). Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences*, 4 (9B): 56-62.
- [13] López García, E. (2007). *Diseño de una planta multifuncional para la extracción de hollejo de uva tinta mediante disolventes a alta presión*. Gestionado por el Área de Biblioteca, Archivo y Publicaciones. Ingeniería química, Universidad de Cádiz.
- [14] Yépez, B., Espinosa, M., Bolaños, G. (2001). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria*, 194:879-874.
- [15] Iglesias S. (2012). *Extracción y encapsulamiento del aroma de residuos de piña manzana (ANANAS comosus L.) usando CO₂ supercrítico*. Tesis de pregrado. Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- [16] Rey, W. (2012). *Extracción de tocotrienoles a partir de la semilla del achiote (Bixa orellana), usando CO₂ supercrítico como solvente*. Tesis de pregrado. Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- [17] Bulnes del Valle, P. (2012). *Extracción subcrítica de orujo de uva Cabernet Sauvignon pre y post fermentación vínica. Identificación de flavonoides y capacidad antioxidante*. Tesis de maestría. Ciencias de la Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- [18] Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186:253–261.
- [19] Palsikowski, P., Besen, L., Santos, K., da Silva, C., & da Silva, E. (2019). Supercritical CO₂ oil extraction from Bauhinia forficata link subsp. pruinosa leaves: Composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 153, 104588.
- [20] Barrera, D., & Carreño, L. (2018). *Extracción subcrítica de orujo de uva Cabernet Sauvignon pre y post fermentación vínica. Identificación de flavonoides y*

capacidad antioxidante. Tesis de pregrado. Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

- [21] Sato, T., Ikeya, Y., Adachi, S., Yagasaki, K., Nihei, K., & Itoh, N. (2019). Extraction of strawberry leaves with supercritical carbon dioxide and entrainers: antioxidant capacity, total phenolic content, and inhibitory effect on uric acid production of the extract. *Food and Bioprocess Processing*, 117:160-169.
- [22] Porras, K. (2019). Este es el panorama del cultivo de uva Isabella en Colombia. Periódico *El Campesino – La voz del campo colombiano*. Bogotá, Colombia. <https://elcampesino.co/este-es-el-panorama-del-cultivo-de-uva-isabella-en-colombia/>
- [23] Obregón, H., Huayta, F., & Cárdenas, F. (2018). Optimización del proceso de extracción por fluidos supercríticos en la obtención de aceite de semillas de uva con el empleo de la metodología Taguchi y Superficie de Respuesta. In: *The 16th LACCEI International Multi-Conference for Engineering*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, (Perú).
- [24] Hernández, J., Trujillo, Y., & Durán, D. (2011). Contenido fenólico e identificación de levaduras de importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de Villa del Rosario (Norte de Santander). *Vitae*, 18 (1):17-25.
- [25] Paladino, S. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (Vitis vinifera)*. Tesis de maestría. Magister en Alimentos, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- [26] Tirado, D. F., Fuente, E. D. L. & Calvo, L. (2019). A selective extraction of hydroxytyrosol rich olive oil from alperujo. *Journal of Food Engineering*, 263:409-416.
- [27] Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (diciembre 5, 2022). *Extracción mediante CO₂ supercrítico*. <https://www.ucm.es/otri/complutransfer-extraccion-mediante-co2-supercritico/>
- [28] Tradematt (Henan) Industry Co. (2017). *Supercritical CO₂ Fluid Extraction Equipment*. Cntradematt.com. https://www.cntradematt.com/scfe/scfe.html?gclid=Cj0KCQiAoY-PBhCNARIsABcz772QrqGrR8wIU3FVPdhCfOPxC_ZrE1YoYfWYdgv74c4lt865RI5N6AaAkYIEALw_wcB
- [29] Martínez, C., & Ceballos, C. (2012). *Determinación de actividad antioxidante en aceite de semillas de uva Isabella (Vitis labrusca) extraído con CO₂ supercrítico*. Tesis de pregrado. Escuela de Ingeniería de alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

- [30] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*. 28(1):25-30.
- [31] Bohorquez, R. (2016). *Determinación de actividad antioxidante de extractos de hoja de Diplostephium phyllicoides (Kunth) Wedd.* Tesis de pregrado. Química, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A., Bogotá, Colombia.
- [32] Turton, R., Bailie, R., et al. Analysis, synthesis and design of chemical process. Prentice Hall, New Jersey, Estados Unidos, 1998.
- [33] MiniTab, Comprensión del Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba F. <https://blog.minitab.com/es/compression-del-analisis-de-varianza-anova-y-la-prueba-f>
- [34] Becker, R., & Wentworth, W. (1977). Disoluciones- Sistemas con dos componentes, *Química general* (Vol. 1, pág. 474). Reverté, S.A
- [35] AGRONET. (2021). Cultivo de uva Isabella no necesita tanto nitrógeno. <https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Cultivo-de-uva-Isabella-no-necesita-tanto-nitr%C3%B3geno.aspx>
- [36] Vibrotech, Zaranda vibratoria. <https://vibrotech.com.ar/m/3/4/10/productos/clasificacion/zarandas-vibratorias>
- [37] Hosokawa, Molino de criba. <https://www.hosokawa-alpine.es/procesamiento-de-solidos/maquinas/molinos-de-criba/>
- [38] Memmert, UF75. <https://www.memmert.com/es/el-producto/estufas-estufas-de-secado/estufa-universal/UF75/>
- [39] CAREDDI, CO₂ Extraction Machine. <https://www.careddisupercritical.com/products.html>
- [40] The Observatory of Economic Complexity. <https://oec.world/es/profile/bilateral-product/essential-oils/reporter/col>