

**EXTRACCIÓN ASISTIDA POR HIDRODESTILACIÓN Y ULTRASONIDO DE ACEITES
ESENCIALES DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y LIMONCILLO
(*Cymbopogon citratus*)**



TATIANA MARCELA MUÑOZ HURTADO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018**

**EXTRACCIÓN ASISTIDA POR HIDRODESTILACIÓN Y ULTRASONIDO DE
ACEITES ESENCIALES DE CÁSCARA DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y
LIMONCILLO (*Cymbopogon citratus*)**

TATIANA MARCELA MUÑOZ HURTADO

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director

JAIME MARTÍN FRANCO Ph. D.

PROFESOR TITULAR DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POPAYÁN

2018

Nota de aceptación

Director _____

Jaime Martín Franco. Ph.D.

Jurado _____

Edier Humberto Pérez Ph. D.

Jurado _____

Rodrigo Sarria Villa Ph.D

Fecha y lugar de sustentación: Popayán, Febrero 07 de 2018

Dedicado A:

Dios, por su poder infinito me dio la vida, colocándome en el momento y lugar correcto.

Mis padres: Lida Hurtado y Ramiro Muñoz C. por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.

Carlos A. Cerón, compañero de vida, junto a sus padres Francly y Jesús me enseñaron que la familia va más allá de los lazos de sangre.

Mis hermanas Diana y Paola, son mis mejores amigas. Las quiero mucho.

Mis hijos Janna y Matías. Mi luz y razón para cumplir mis metas. Este logro es para ellos.

Mi tío Jeremías y mi abuelo Jobino. Sus vidas fueron muy valiosas e importantes para mi formación como persona. Los quiero y los llevo en mi corazón

Profesor Jaime Martín Franco, por brindarme todo su apoyo, paciencia y sabiduría en este proceso y en toda la carrera

Mis compañeros universitarios. Los momentos vividos con ustedes los atesoraré en mi corazón

“nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhí

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jaime Martín Franco por dirigir este trabajo de grado; sus conocimientos y consejos ayudaron a culminar este proceso.

Al grupo de investigación Química de Productos Naturales (QPN), por permitirme hacer parte de él, acogiéndome como una integrante más de esta familia.

A Jeison Cortés; por su interés en mi trabajo y la ayuda en las dificultades que se presentaban cada día.

A los jurados, anticipadamente, por las correcciones y valiosos aportes, importantes en la estructuración definitiva de este documento.

A la Unidad de Análisis Industrial, dirigida por el profesor Germán Cuervo Ochoa, por facilitarme los equipos que se utilizaron para la realización de éste trabajo.

Al grupo de investigación GIQA por facilitarme el equipo ultrasonido para completar la fase experimental del trabajo de grado.

Al grupo de investigación AGROQUÍMICA por abrir las puertas del laboratorio cuando más lo requería.

A todos los profesores del Departamento de Química, por sus valiosas enseñanzas, que sirvieron para formarme profesionalmente y como persona.

A la universidad del Cauca por brindarme el privilegio de pertenecer a su comunidad. Siempre; donde esté, llevaré en alto su nombre.

Y en general a todas las personas que estuvieron a mi lado: tíos, primos, abuelos y amigos.

GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN-----	1
2. MARCO TEÓRICO-----	3
2.1 Metabolitos secundarios-----	3
2.2 Aceites esenciales (AE) -----	3
2.2.1 Composición química de los AE-----	3
2.2.2 Aplicaciones de los AE-----	5
2.2.3 Secreción de los AE-----	5
2.3 Extracción de AE-----	5
2.3.1 Métodos de extracción clásicos o convencionales-----	6
• Hidrodestilación (Hd) -----	6
• Hd por arrastre de vapor-----	7
• Extracción con solventes orgánicos-----	8
• Prensado en frío-----	8
2.3.2 Métodos de extracción innovadores-----	9
• Extracción con fluidos supercríticos-----	9
• Extracción asistida por microondas-----	9
• Extracción asistida por ultrasonido (US) -----	9
2.4 Limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>) -----	11
2.4.1 Características morfológicas y Origen-----	11
2.4.2 Clasificación taxonómica-----	11
2.4.3 AE de Limoncillo-----	12
2.4.4 Usos y aplicaciones del AE de Limoncillo-----	12
2.5 Cáscara de naranja (<i>citrus sinensis L.</i>)-----	12

2.5.1 Características morfológicas y origen-----	12
2.5.2 Clasificación taxonómica-----	13
2.5.3 AE de Cáscara de naranja -----	13
2.5.4 Usos y aplicaciones del AE de Cáscara de naranja -----	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	15
4. OBJETIVOS-----	16
4.1 OBJETIVO GENERAL-----	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	16
5. METODOLOGÍA-----	17
5.1 MATERIALES Y REACTIVOS-----	17
5.2 Obtención y tratamiento del material vegetal-----	18
5.2.1 Limoncillo-----	18
5.2.2 Cáscara de naranja-----	18
5.3 Extracción del AE de limoncillo y cáscara de naranja-----	19
5.3.1 Método clásico: Hd por arrastre de vapor-----	19
5.3.2 Método innovador: extracción asistida por US-----	19
5.4 Diseño experimental de optimización-----	20
5.4.1 Hd por arrastre de vapor-----	20
5.4.2 Extracción asistida por US-----	21
5.5 Análisis estadístico-----	24
5.6 Caracterización de los aceites esenciales extraídos-----	24
5.6.1 determinación de propiedades físicas del AE-----	24
• Densidad relativa del AE a 20 °C-----	24
• Índice de refracción de los AE-----	25
• Solubilidad en etanol 70% (v/v) -----	25
5.6.2 Análisis instrumental-----	25

• Espectroscopía infrarroja (IR) -----	25
• Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/MS) -----	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	26
6.1 Optimización diseño Hd por arrastre de vapor-----	26
6.1.1 Limoncillo-----	27
6.1.2 Cáscara de naranja-----	31
6.2 Optimización diseño extracción asistida por ultrasonido-----	35
6.2.1 Limoncillo-----	35
6.2.2 Cáscara de naranja-----	37
6.3 Ensayo con los puntos óptimos-----	40
6.4 Comparación de los métodos de extracción-----	40
6.5 Caracterización de los AE extraídos-----	42
6.5.1 Análisis sensorial-----	42
6.5.2 Análisis físico-----	43
6.5.3 Análisis instrumental-----	43
7. CONCLUSIONES-----	50
8. RECOMENDACIONES-----	51
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	52
10. ANEXOS-----	55

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceites esenciales
ATR	Attenuated total reflection (cristal con reflejo total atenuado)
%E	Concentración de extracto en porcentaje
(DC) Stapf	Se emplea para indicar a Augustin Pyrame de Candolle y Otto Stapf como autoridades en la descripción y clasificación científica del <i>C. citratus</i> .
DCC	Diseño compuesto central
FDA	Food and Drug Administration (administración de alimentos y drogas)
Hd	Hidrodestilación
ISO	Organización Internacional de Normalización
NAS	National Academy of Sciences (academia nacional de ciencias)
Osbeck	Se emplea para indicar a Pehr Osbeck como autoridad en la descripción y clasificación científica del <i>C. sinensis</i> L.
SD	Desviación estándar
T	Temperatura
t-extrac.	Tiempo de extracción
ts	Tiempo de secado de la muestra
tr	Tiempo de retención
US	Ultrasonido
w	Peso muestra

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de algunos compuestos principales de AE-----	4
Figura 2. Métodos de extracción de AE-----	6
Figura 3. Hidrodestilador convencional: 1. alambique; 2. Condensador-----	7
Figura 4. Ilustración de un equipo de extracción de AE por arrastre de vapor-----	8
Figura 5. Mecanismo de la interrupción de la pared celular. a) rotura de la pared celular debido a la cavitación; b) difusión del disolvente en la estructura celular---	10
Figura 6. Hojas de <i>C. citratus</i> recolectado en el ingenio INCAUCA-----	11
Figura 7. Imágenes del tratamiento del limoncillo. a) limoncillo recolectado; b) proceso de selección; c) secado; d) limoncillo seco y cortado-----	18
Figura 8. Imágenes del tratamiento a la cáscara de naranja. a) cáscara lavada; b) pelado de la fruta; c) cascara de naranja en proceso de secado; d) corte de la cáscara de naranja-----	19
Figura 9. Equipos utilizados para la extracción de AE a) Hidrodestilador tipo Clevenger y b) baño de US-----	20
Figura 10. %E de AE obtenido a partir de limoncillo a diferentes relaciones de Etanol/agua-----	23
Figura 11. %E de AE obtenido a partir de Cáscara de naranja a diferentes relaciones de Etanol/agua-----	23
Figura 12. Diagrama de Pareto para %E de AE limoncillo-----	28
Figura 13. Gráfico de efectos principales para %E de AE limoncillo-----	29
Figura 14. Gráfico de interacción para %E de AE limoncillo-----	30
Figura 15. Superficie de respuesta estimada-----	30
Figura 16. Diagrama de Pareto para %E de AE limoncillo-----	32
Figura 17. Gráfico de efectos principales para %E de AE de cáscara de naranja-----	33
Figura 18. Gráfico de interacción para %E de AE de cáscara de naranja-----	33

Figura 19. Gráfico de superficie estimada para %E de AE de cáscara de naranja---	34
Figura 20. Diagrama de Pareto para %E de AE limoncillo-----	36
Figura 21. Gráfico de efectos principales para la extracción de AE limoncillo-----	36
Figura 22. Gráfico de interacciones para %E de AE limoncillo-----	36
Figura 23. Gráfico de superficie de respuesta para %E de AE limoncillo-----	37
Figura 24. Diagrama de Pareto para %E de AE de cáscara de naranja-----	38
Figura 25. Gráfico de efectos principales para la extracción de AE de cáscara de naranja-----	39
Figura 26. Gráfico de interacciones para %E de AE de cáscara de naranja-----	39
Figura 27. Gráfico de superficie de respuesta para %E de AE de cáscara de naranja-----	39
Figura 28. AE extraídos; a) AE limoncillo (LH: Hidrodestilación - LU: Ultrasonido) y b) AE de cáscara de naranja (CH: Hidrodestilación - CU: Ultrasonido) -----	42
Figura 29. Espectros de IR para AE limoncillo extraído por Hd y US-----	44
Figura 30. Espectros IR para extracción de AE de cáscara de naranja por Hd y US-----	45
Figura 31. Perfil cromatográfico del AE limoncillo extraído por: a) Hd y b) US-----	46
Figura 32. Espectro de masas del Neral y su posible fraccionamiento -----	47
Figura 33. Perfil cromatográfico del AE cáscara de naranja extraído por: a) Hd y b) US -----	48
Figura 34. Espectro de masas del limoneno y su posible fraccionamiento-----	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos, equipos de laboratorio y material de vidrio utilizados-----	17
Tabla 2. Condiciones experimentales para Hd donde ts . Tiempo de secado; w . peso de la muestra y t-extrac . Tiempo de extracción-----	21
Tabla 3. Niveles alto y bajo para cada factor estudiado en el diseño experimental DCC-----	22
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA para porcentajes de extracción de AE limoncillo-----	27
Tabla 5. Combinación óptima para maximizar %E de AE limoncillo-----	31
Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para %E de AE de cáscara de naranja-----	31
Tabla 7. Niveles óptimos de los factores que maximizan %E de AE de cáscara de naranja-----	34
Tabla 8. Análisis de varianza ANOVA para %E de AE limoncillo-----	35
Tabla 9. Niveles óptimos de los factores para la extracción de AE limoncillo por US-----	37
Tabla 10. Análisis de varianza ANOVA para %E de AE de cáscara de naranja-----	38
Tabla 11. Valores óptimos de los factores para %E de AE de cáscara de naranja-----	40
Tabla 12. %E de AE en los puntos óptimos-----	40
Tabla 13. Prueba t para muestras relacionadas-----	41
Tabla 14. Comparación de tiempo de extracción y temperatura en la extracción de AE por los métodos de Hd y US-----	42
Tabla 15. Análisis físico de los AE extraídos-----	43
Tabla 16. Composición química del AE limoncillo usando los métodos de Hd y US-----	46
Tabla 17. Composición química del AE de cáscara de naranja usando los métodos de HD y US-----	49

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.	Porcentaje de AE Obtenido a diferentes relaciones de Etanol/agua----	55
ANEXO 2.	Tabla 1. Diseño experimental Hidrodestilación para Limoncillo-----	56
	Tabla 2. Diseño experimental Hidrodestilación para Cáscara de naranja-----	57
	Tabla 3. Diseño experimental Ultrasonido para Limoncillo-----	58
	Tabla 4. Diseño experimental Ultrasonido para Cáscara de naranja---	58
ANEXO 3.	Valores en los puntos de optimización de los diseños experimentales-----	59

RESUMEN

Se optimizaron los parámetros de extracción de aceites esenciales de Limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y Cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) por las técnicas de Hidrodestilación por arrastre de vapor y Ultrasonido; para ello se realizaron dos diseños experimentales, uno factorial para la técnica de hidrodestilación, teniendo como variables independientes: tiempo de secado de la muestra, tiempo de extracción y cantidad de muestra; y un diseño compuesto central para ultrasonido que tiene como variables independientes: temperatura de extracción, relación etanol/agua (solvente) y concentración de la muestra. Los porcentajes de extracción obtenidos para el aceite esencial de limoncillo por Hidrodestilación y Ultrasonido fueron 0,91% y 1,38%; mientras que, la cáscara de naranja rindió 0,59% y 1,29% respectivamente, siendo la técnica de Ultrasonido más eficiente en ambos casos. Las propiedades físicas y características sensoriales de los aceites esenciales extraídos por ambas técnicas fueron similares, incluyendo los espectros de IR, que mostraron los mismos grupos funcionales. Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fueron identificados los componentes mayoritarios de los aceites esenciales.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas llevan a cabo varios procesos metabólicos para respirar y realizar la fotosíntesis. En primer lugar se encuentran los del metabolismo primario, que involucran la producción de compuestos orgánicos esenciales, denominados metabolitos primarios, los cuales están clasificados en cuatro grupos: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. A partir de algunos de estos compuestos se generan otros procesos agrupados en el metabolismo secundario, los cuales no son esenciales para el desarrollo vital del organismo. La dinámica bioquímica de la planta abarca la producción de una gran variedad de sustancias, distinguiéndose los aceites volátiles, taninos, cumarinas, flavonoides, saponinas, alcaloides, esteroides, glicósidos y poliaminas¹.

En el mundo hay más de 17000 especies de plantas que producen aceites esenciales (AE). En la obtención se utilizan flores, hierbas, brotes, hojas, frutas, corteza, ralladura y semillas. La composición puede variar con el lugar de origen, el momento de recolección y el método de extracción, entre otros. Los AE se clasifican de acuerdo a la consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios^{1,2}.

Los AE generan gran interés, especialmente en investigación. El rendimiento de la extracción depende de la técnica y generalmente es muy bajo, aproximadamente, el 1%¹. Los métodos clásicos de extracción son prolongados (3-6 h) y poco eficientes, en este grupo se incluye la hidrodestilación, el arrastre por vapor de agua, vapor hidrodestilación, vapor-destilación e hidrodifusión. En su mayoría, se caracterizan por utilizar calor, por lo que llegan a generar alteraciones químicas en las moléculas componentes del AE. También se incluyen en este grupo los métodos con disolvente orgánico y prensado en frío, que no necesitan calor, pero al igual que los anteriores, tienen bajos rendimientos. Las técnicas modernas son más eficientes, no requieren el uso excesivo de solventes, ni calentamiento o si lo requieren es muy suave; se destacan la extracción asistida por ultrasonido, microondas y fluidos supercríticos². La primera es una técnica limpia, no degradante y eficiente, debido al aumento de la penetración del disolvente en las células vegetales por la cavitación³.

En este documento se presentan los resultados experimentales de la optimización en la extracción de los AE de limoncillo y de cáscara de naranja, los cuales se analizaron estadísticamente. En la literatura se han encontrado porcentajes de extracción por la técnica de Hidrodestilación; entre ellos se tienen a Rodríguez-Pérez. *W et al* (2006), el cual obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0,43% en la

extracción de AE de limoncillo⁴ y León-Méndez. G *et al* (2015) que obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0,42% en la extracción del AE de cáscara de naranja⁵.

El limoncillo (*Cymbopogon citratus*) es una planta perenne y alta, de las hojas angostas y largas de las cuales se extrae el AE conformado mayoritariamente por neral, geranial y β -mirceno⁴. Se usa principalmente en sectores como el farmacéutico, cosmético, de alimentos y en agricultura. Los usos terapéuticos incluyen el tratamiento de afecciones nerviosas y molestias gastrointestinales; también se usa como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio y sedante. En la literatura hay reportes sobre la capacidad antioxidante, antimicrobiana y anti fúngica del AE del limoncillo^{2,6}.

La naranja por su parte, es la fruta más cultivada en el mundo (100 millones de toneladas por año)⁷. Aproximadamente el 40% de la producción se destina a la elaboración de jugo, generando más de doscientos mil toneladas de residuos de cáscara, constituida por flavedo, albedo (parte no comestible de la fruta) y semillas que se transforman en alimentos para animales. El AE de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L.) contiene terpenos, ácidos grasos, carotenoides y el D-limoneno, un monoterpeno volátil, considerado el más abundante y representativo de todos ellos (71-95%)⁸.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios se definen como compuestos de bajo peso molecular que no tienen un papel reconocido en el mantenimiento de los procesos de vida fundamentales en las plantas que los sintetizan, pero tienen un papel importante en la interacción de la planta con su medio ambiente⁹.

Las primeras plantas terrestres aparecieron hace aproximadamente 450 millones de años; al pasar de un ambiente acuático a un ambiente terrestre, estas plantas primitivas tuvieron grandes desafíos, como cambios de temperatura rápidos, exposición UV, ocupación de microorganismos entre otros. La necesidad de adaptación para superar estos y más inconvenientes genera la producción de metabolitos secundarios; y gracias a la especiación (hace 145 años aproximadamente), hay una explosión de producción de metabolitos secundarios (100000 descubiertos hasta hoy) productores de aromas, colores y sabores en las plantas^{9,10}.

2.2 Aceites esenciales (AE).

La Farmacopea Europea, define los AE como productos odorantes, generalmente de composición compleja, obtenidos de materias primas vegetales botánicamente definidas, mediante métodos físicos de arrastre con vapor de agua, destilación en seco o métodos mecánicos sin calentamiento, comúnmente, de bajo impacto en la composición química del AE².

2.2.1 composición química de los AE.

Los AE son mezclas naturales muy complejas que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes en diferentes concentraciones, dos o tres de ellos son componentes principales en concentraciones variadas (20-70%), que incluso, dan lugar a las propiedades biológicas del AE. Los terpenoides son considerados los componentes más importantes, porque determinan las propiedades, usos y aplicaciones del AE. Éstos compuestos se derivan de cadenas de isopreno (C5), presentándose mayoritariamente como monoterpenos (C10),

sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20). Se clasifican en alifáticos o aromáticos; según la presencia de grupos funcionales en alcoholes, como el mentol y bisabolol; fenoles, como el timol y carvacrol; aldehídos, como el geranial y citral; también se incluyen las acetonas tipo alcanfor y thuyona; los ésteres, tales como el acetato de bornilo, acetato de linalilo y silicato de metilo; los éteres, representados por el 1,8 – cineol y también los peróxidos, como el ascaridol. Entre los alquenos, se encuentran los hidrocarburos R(+) limoneno, S(-) limoneno, α pineno y β pineno. En la Figura 1 se exhibe la estructura de algunos componentes principales de varios AE¹¹.

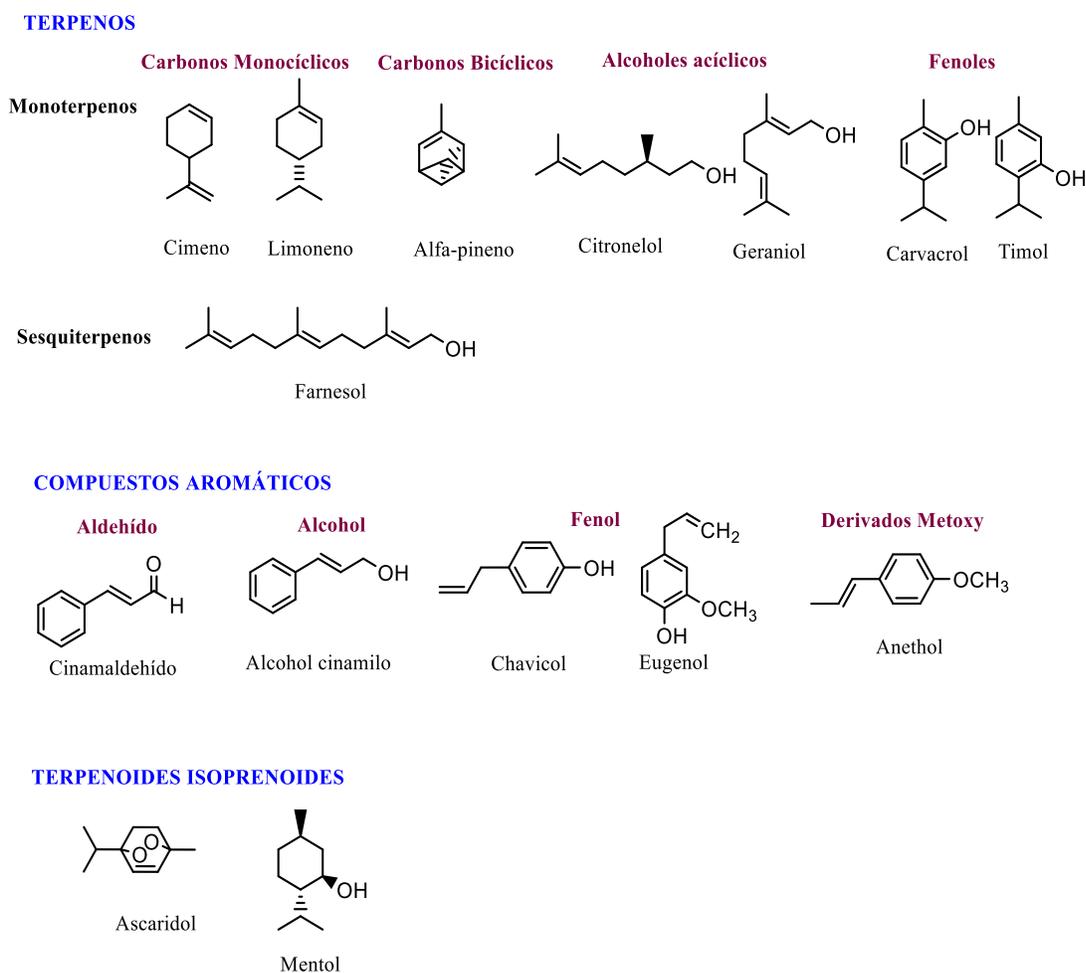


Figura 1. Estructura de algunos compuestos principales de AE².

2.2.2 Aplicaciones de los AE.

Se sabe que los AE de las plantas actúan como aditivos naturales, por ejemplo como agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc. Sus actividades varían según la fuente de las plantas, la composición química, los métodos de extracción, entre otros. La industria alimentaria utiliza principalmente el AE de canela, cítricos, clavo de olor, limoncillo, cilantro, orégano, salvia, pimienta morrón, tomillo y romero como conservantes y estabilizantes¹².

2.2.3 Secreción de AE.

En las plantas los AE se biosintetizan y se almacenan en glándulas secretoras, éstas glándulas se dividen en dos tipos: las ubicadas en las superficies de la planta con secreción exógena y aquellas localizadas dentro de la planta en órganos internos con secreción endógena².

2.3 Extracción de AE.

La extracción de AE ha sido objeto de gran interés por sus aplicaciones anteriormente mencionadas. Las técnicas de extracción han sido también centro de debate por los científicos, puesto que la definición de AE según la Organización Internacional de Normalización (ISO) limita sus métodos de obtención. De acuerdo con la norma ISO 9235.2, el AE se define como “un producto obtenido a partir de materia prima vegetal ya sea por destilación con agua o vapor; o del epicarpio de la fruta por un proceso mecánico, o por destilación seca”¹².

Actualmente, se están utilizando técnicas sistematizadas de extracción de AE, las cuales están siendo reconocidas por su mayor eficiencia tanto en rendimiento como en tiempos de extracción. En la Figura 2 se muestran las técnicas convencionales y las innovadoras aplicadas en la extracción de AE.



Figura 2. Métodos de extracción de AE.

2.3.1 Métodos de extracción clásicos o convencionales.

Utilizan generalmente el calentamiento de la muestra, generando posibles cambios en la composición de los AE extraídos. A continuación se describen las más comunes.

- **Hidrodestilación (Hd).**

Es el método más simple y antiguo que se ha utilizado para extraer AE de las plantas. La Figura 3 muestra un esquema de un hidrodestilador convencional tipo Clevenger. En este equipo se coloca la muestra con agua dentro de un alambique y se calienta hasta ebullición. El agua y las moléculas de los AE forman una mezcla heterogénea que alcanza la fase gaseosa a una temperatura inferior a la temperatura de ebullición del agua, en un proceso de destilación azeotrópica, que involucra posteriormente la condensación de los componentes y separación por decantación².

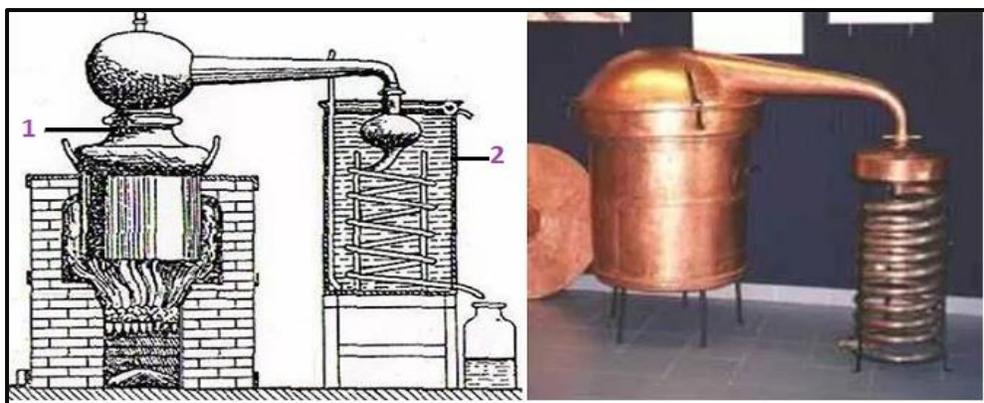


Figura 3. Hidroddestilador convencional: 1. alambique; 2. condensador.

Tomado de: <https://aloucadosperfumes.com/2012/12/20/metodos-de-producao-ii-hidrodestilacao-e-enfloragem-enfleurage>. abril de 2017

La ventaja de la Hd es la facilidad en la separación del AE y el solvente, ya que son inmiscibles. Las desventajas son el tiempo de extracción, entre 3 y 6 horas; el sobrecalentamiento de la muestra, que causa generalmente alteraciones químicas en los terpenos que componen el AE y finalmente, la pérdida de moléculas polares que pasan al agua en la extracción².

- **Hd por arrastre de vapor.**

Es uno de los métodos oficiales para la extracción de AE ubicados en el espacio extracelular. En este caso, la muestra no está en contacto directo con el agua que está siendo calentada, evitándose en cierta medida la oxidación de los componentes del AE o la producción de reacciones químicas indeseables. En general tarda menos tiempo y por ende el consumo energético también es menor (Figura 4)².

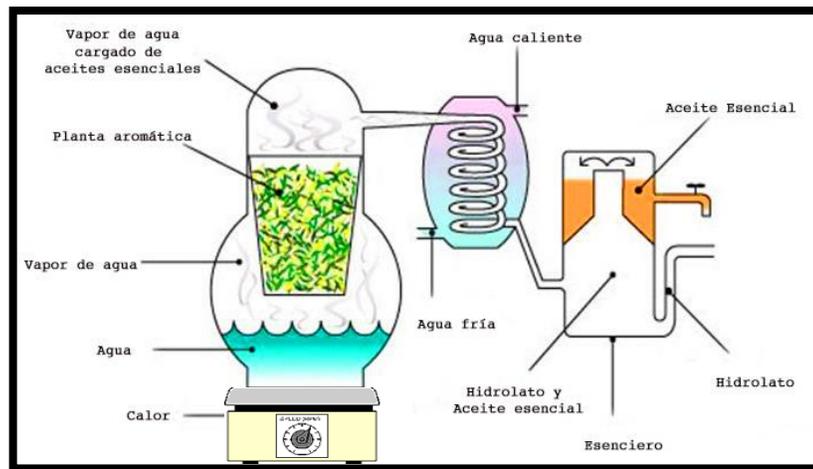


Figura 4. Ilustración de un equipo de extracción de AE por arrastre de vapor. Tomado de: <http://www.aromatherii.com/blog/categoria/aceites-esenciales/>. Abril de 2017

- **Extracción con disolventes orgánicos.**

Se utiliza principalmente, para extraer AE termolábiles como los de las flores. Para efectuarlo, se coloca la planta en un baño con el disolvente de extracción. Al cabo de un tiempo prudente, la mezcla: AE, solvente y restos de la planta, se filtran y a continuación, se elimina el solvente mediante rotoevaporación o destilación. Los solventes que más se usan en este proceso son etanol, hexano, éter de petróleo y metanol. La mayor ventaja que tiene este método es la menor vulneración de los componentes del AE, puesto que se realiza a bajas temperaturas y en tiempos cortos. Los bajos costos son otras ventajas de la extracción con solventes orgánicos; sin embargo, algunos solventes orgánicos empleados, en especial los organoclorados, son tóxicos y en cierto grado contaminantes¹³.

- **Prensado en frío.**

El prensado en frío es un método que se utiliza generalmente para extraer AE de la cáscara de cítricos y se refiere a cualquier proceso físico en el cual se rompen y se liberan los sacos de aceites volátiles que se encuentran en la capa externa del mesocarpio. El AE se separa mecánicamente mediante prensado en frío produciendo una emulsión acuosa, la cual es posteriormente centrifugada para separar los dos componentes^{14,15}.

2.3.2 Métodos de extracción innovadores.

Actualmente, las industrias están generando nuevos procesos de extracción de AE, amigables con el medio ambiente; adicionando a los métodos clásicos, otros equipos que además de contribuir a la química verde, mejoran los rendimientos y propiedades de los AE extraídos. A continuación se citan algunos.

- **Extracción con fluidos supercríticos.**

Los fluidos supercríticos se generan cuando se coloca un gas a condiciones de presión y temperatura críticas, dando como resultado un fluido con propiedades muy especiales tales como viscosidad baja, difusividad alta y densidad próxima a la de un líquido². El gas más utilizado en este tipo de extracciones, es el dióxido de carbono (CO₂), por el agarre crítico (baja presión crítica, P_c: 72,9 atm y temperatura, T_c: 31,2 °C); baja agresividad con las moléculas termolábiles de la esencia vegetal; no es inflamable; está disponible en alta pureza a un costo relativamente bajo, es de fácil eliminación del extracto, por depresión simple, es químicamente inerte y no es tóxico. Su polaridad es similar a la del pentano, siendo adecuado para la extracción de compuestos lipófilos¹⁶.

- **Extracción asistida por microondas.**

La extracción asistida por microondas ha estado atrayendo la atención de investigadores por su mecanismo de calentamiento basado en la fricción, costo razonable y buen desempeño a condiciones atmosféricas normales. Esta técnica está siendo complementada con métodos convencionales para mejorar los resultados entre ellos se tienen Hd asistida con microondas, destilación con vapor acelerada por microondas, extracción con microondas libre de solventes¹³.

- **Extracción asistida por ultrasonido (US).**

El US es una técnica novedosa verde, limpia, fácil de usar, versátil y flexible, usada para la extracción de AE¹⁷. El US permite la intensificación y la extracción selectiva de AE, al acelerar la liberación desde el material vegetal. Las ondas ultrasónicas usadas tienen una frecuencia por encima del rango audible (>20 kHz) y menores

que las frecuencias de las microondas (hasta 10 MHz). Esta región ultrasónica es importante dependiendo de para qué se vaya utilizar, por ejemplo: una sonicación de baja intensidad ($<1 \text{ W/cm}^2$) se utiliza como una técnica analítica no destructiva para el control de calidad y determinación de la composición, estructura y estado físico de la materia. Por su parte, la sonicación de alta intensidad ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) se emplea en aplicaciones de extracción y procesamiento^{2,17}.

La eficacia de la extracción mediante US se ha atribuido a la propagación de ondas de presión ultrasónicas a través del disolvente y los fenómenos de cavitación resultantes. El mecanismo de extracción procede generalmente por efectos térmicos y mecánicos de cavitación que pueden destruir las paredes celulares, reducir el tamaño de partícula y conseguir mayor transferencia de masa a través de las membranas celulares. La implosión de las burbujas de cavitación genera colisiones y perturbaciones en las partículas microporosas de la biomasa que aceleran la difusión del remolino y la difusión interna. La aplicación de US promueve la disolución de los compuestos objetivo, lo que aumenta el rendimiento empleando tiempos más cortos al alterar la pared celular. El mecanismo de la interrupción de la pared celular debido a la cavitación se ha representado esquemáticamente en la Figura 5. Debido a la cavitación, las grietas se desarrollan en la pared celular, lo que aumenta la permeabilidad de los tejidos de las plantas facilitando la entrada del disolvente en la parte interna del material, así como el lavado de los extractos. Sin embargo, más allá de cierto límite, se desperdicia energía ultrasónica, ya que no se pueden ver más aumentos debido a las limitaciones de la extracción de equilibrio. La consideración de estos hechos es muy importante para que todo el proceso de extracción sea económicamente más factible¹⁸.

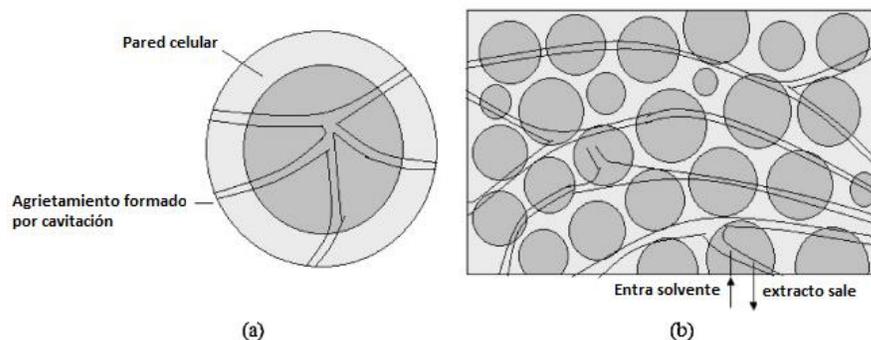


Figura 5. Mecanismo de la interrupción de la pared celular. a) rotura de la pared celular debido a la cavitación. b) difusión del disolvente en la estructura celular.

2.4 Limoncillo (*Cymbopogon citratus*).

2.4.1 Características morfológicas y Origen.

El *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (*C. citratus*) es una hierba perenne sin tallo con numerosas macollas rígidas que surgen de un patrón rizomatoso corto, que hace grandes matas. Tiene de 1 a 2 metros de largo; las hojas se adelgazan hacia la vaina (Figura 6), son estrechas, lineales y rara vez producen flores. El contenido de AE de la hierba es 0,3-0,7% y su AE contiene 74-76% de citral. Aunque su origen es desconocido, los autores Skaria BP *et al* (2012) y Mansurah A. *et al* (2015) establecen que posiblemente la planta se originó en Malasia o Sri Lanka; se cultiva en zonas preferiblemente tropicales y subtropicales con condiciones cálidas (25-30°C) y húmedas, por ejemplo Indias Occidentales, Sri Lanka, Brasil, México, China y Filipinas^{19,20}. En Colombia, es cultivado de 0 a 1900 msnm. Siendo la zona cafetera el área más representativa, encontrándose como cercas vivas alrededor de los lotes de cultivo o como cultivo protector en áreas degradadas debido a su efecto favorable en la conservación de suelos²¹.



Figura 6. Hojas de *C. citratus* recolectado en el ingenio INCAUCA.
Foto tomada por: Tatiana Muñoz

2.4.2 Clasificación taxonómica

- Reino: Plantae
- Sub-reino: Tracheobionta
- Superdivisión: espermatophyta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Liliopsida
- Subclase: Commelinidae
- Orden: Cyperales
- Familia: Poaceae

- Género: *Cymbopogon*
- Especie: *cymbopogon citratus*¹⁹

2.4.3 AE de Limoncillo.

El AE de *C. citratus* contiene geranial (41,82%), neral (35,18%), mircenol (12,75%), acetato de geranil (3,00%), metil heptano (2,62%), geraniol (1,85%), β - elemeno (1,33%), elemol (1,2%), acetato de citronelil (0,96%), citronelal (0,73%), óxido de β -cariofileno (0,61%), dipenteno (0,23%), β -cimeno (0,2%), β - caryophylleno (0,18%), β -pineno (0,24%), δ -3-catreno (0,16%), α -pineno (0,13%) y β -felandreno (0,07%) (Los valores son aproximados)¹⁹.

2.4.4 Usos y aplicaciones del AE de Limoncillo.

El limoncillo se ha cultivado por muchos años con fines medicinales. Es un remedio popular para la tos, la elefantiasis, la malaria, la oftalmía, la neumonía y los trastornos vasculares. Muchos estudios que se le han realizado al AE han demostrado que tiene propiedades antidepresivas, antioxidantes, antisépticas, astringentes, bactericidas, fungicidas, nerviosas y sedantes. También, tiene actividad antimicrobiana contra mohos, levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas²².

El citral, componente principal del AE de *C. citratus* es utilizado como materia prima para la producción de ionona, vitamina A y β -caroteno; Además, es un aditivo alimentario aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos para su uso en alimentos (FDA, GRAS, 21 CFR 182,60). El Citral ha sido registrado por la Comisión Europea como aromatizante en productos alimenticios porque no presenta riesgos para la salud del consumidor²³.

2.5 Cáscara de Naranja (*Citrus sinensis* L.)

2.5.1 Características morfológicas y Origen.

Los cítricos son los cultivos subtropicales más comunes del mundo. Entre las especies de cítricos, la *Citrus sinensis* L. Osbeck (*C. sinensis* L.) conocida comúnmente como naranja dulce es la más cultivada. Su origen no está definido, se cree que es resultante de hibridaciones entre varias especies de cítricos del sur

y este de África. El mayor productor de *C. sinensis* L es Brasil con el 37% de la producción mundial, seguido de Estados Unidos con 15%^{7,24}.

La *C. sinensis* L, pertenece a la familia de las Rutaceae, que contiene alrededor de 1700 especies que crecen en países cálidos. Es un árbol híbrido originario de la India, Vietnam y el sudeste asiático²⁴, es de tamaño mediano (7-10 m), erecto si contiene semillas y con copa ancha si está injertado, posee hojas brillantes y flores blancas y bisexuales, la fruta es redonda de aproximadamente 6-10 cm de diámetro con una cáscara ligeramente rugosa, la fruta surge a través del crecimiento y desarrollo de un ovario y consta de 8-16 carpelos agrupados alrededor y unidos al eje floral, que forma el núcleo de la fruta. Los carpelos forman lóculos, o segmentos, en los que crecen las semillas y los sacos de jugo (vesícula). El pericarpio (corteza o cáscara) se divide en exocarpio, o flavedo, y mesocarpio, o albedo. El flavedo consiste en las capas de tejido más externas, que tienen una epidermis cubierta de cutículas y células de parénquima. El flavedo es la parte exterior coloreada y el albedo es la parte interna, incolora (blanca) o a veces teñida (naranjas sanguinas)⁷.

2.5.2 Clasificación taxonómica

- Reino: Plantae
- División: Traqueofitas
- Subdivisión: Angiospermas
- Clase: Dicotiledoneas
- Subclase: Arquiclamideas
- Orden: Geraniales
- Suborden: Geraniineas
- Familia: Rutaceae
- Subfamilia: Aurantioideae
- Tribu: Citreae
- Género: *Citrus*
- Subgénero: Eucitrus
- Especies: Naranja dulce: *Citrus sinensis* L²⁵.

2.5.3 AE de Cáscara de naranja.

El AE de cáscara de naranja contiene más de 200 compuestos. En la fracción terpénica, el más abundante es el D-limoneno (71-95%), seguido del β -mirceno (4,3%), β -pineno (2,4%), y sabineno (1,2%). En la fracción oxigenada se tiene al

linalol como el mayor componente (aproximadamente 3%)²⁶. Otros compuestos en cantidades menores al 1% son: citronellal, geranial, α -pineno y geraniol^{26,27}.

2.5.4 Usos y aplicaciones del AE de Cáscara de naranja.

Se ha demostrado que el AE de cáscara de naranja, tiene muchos efectos farmacológicos, como efectos calmantes sobre el sistema nervioso central, antidiarreico, antiinflamatorio, antibacteriano, antimicótico y antioxidante²⁸. Es de recalcar que la actividad antimicrobiana del AE de cáscara de naranja se atribuye principalmente a los terpenos que constituyen la mayor parte del AE y es el resultado de la sinergia entre estos componentes; por lo tanto los efectos antibacterianos no son uniformes sobre las bacterias, depende de los compuestos presentes⁷.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia, el cultivo de naranja está en crecimiento; principalmente en el eje cafetero, donde se cultivan alrededor de 110000 toneladas de naranja por año, y son distribuidas a diferentes industrias de bebidas para la preparación de jugos, bebidas y néctares²⁴. La elaboración de estos productos genera residuos agroindustriales que en cantidades significativas pueden crear problemas ambientales, particularmente la contaminación del agua debido a la presencia de biomateriales como AE, pectina y azúcares⁶. Este proyecto plantea la extracción del AE como una alternativa para el uso de los residuos agroindustriales de cáscara de naranja para utilizarlo entre otros, en la industria de perfumes y de alimentos. Recientemente el D-limoneno, componente principal del AE de cáscara de naranja, se está utilizando como solvente verde para la extracción de grasas y aceites de semilla de olivo⁶.

El limoncillo es una hierba de muchas regiones Colombianas. El uso principal del AE de limoncillo es medicinal, pero también, se utiliza la planta completa. El AE genera valor agregado a la planta, ya que los compuestos presentes en el AE son responsables de las propiedades farmacéuticas, aromáticas y saborizantes de la planta.

La explotación con fines comerciales del AE requiere que el método de extracción sea eficiente. En este trabajo se presentan y analizan los resultados de diseños experimentales estudiados con este propósito.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Obtener limoneno y citral a partir de la cascara de naranja y limoncillo respectivamente, por los métodos de extracción de hidrodestilación y ultrasonido.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✓ Extraer aceite esencial de la cáscara de naranja y del limoncillo, por los métodos de hidrodestilación y ultrasonido.
- ✓ Optimizar los métodos de extracción teniendo en cuenta tiempo de extracción, tiempo de secado de las muestras y cantidad de muestra en el equipo para Hd por arrastre de vapor; y temperatura, relación etanol: agua como solvente y concentración de muestra en el caso del ultrasonido.
- ✓ Caracterizar los aceites esenciales extraídos mediante análisis sensorial, físico e instrumental.
- ✓ Comparar el método de Hd con la extracción asistida por ultrasonido.

5. METODOLOGÍA

5.1 REACTIVOS Y MATERIALES.

Tabla 1. Reactivos, equipos de laboratorio y material de vidrio utilizados.

Reactivos y disolventes		Especificaciones
Agua destilada		
Etanol, éter de petróleo	J.T. Baker (Xalostoc, México)	
Sulfato de sodio anhidro	Carlo Erba (Val de Reuil, Francia)	
Helio	Gas AP, Linde (Bogotá, Colombia)	
Equipos de laboratorio		
Hidrodestilador	Arrastre de vapor tipo Clevenger vertical	
Baño de Ultrasonido	BRANSONIC®, Ultrasonic cleaner 1510R-DTH	
Refractómetro manual	EXTECH, 2192	
Roto evaporador	Laborota 4003	
Balanza analítica	OHAUS, Adventure™	
Plancha de calentamiento	CORNING	
Bomba de vacío	YELLOW JACKET, SuoerEvac™	
Espectrofotómetro FT-IR	Thermo®IR-NICOLET iS10 accesorio iTR (ATR)	
Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas CG/MS	Cromatógrafo de gases Thermo TRACE1300 Cromatógrafo de masas Thermo ISQ LT	
Material de vidrio		Cantidad
Balón de fondo redondo 1000 mL		1
Embudo de separación 250 mL		1
Condensador		2
Vaso de precipitados 250 mL		2
Probeta 100 mL		1
Embudo Büchner		1
Erlenmeyer 500 mL		1
Erlenmeyer con desprendimiento lateral 250 mL		1

5.2 Obtención y tratamiento del material vegetal.

5.2.1 Limoncillo.

El limoncillo utilizado para la extracción de AE, fue recolectado en el Ingenio del Cauca, localizado al norte del Departamento del Cauca. El material se seleccionó, desechando el que estuviese en mal estado. Luego, se limpió y se secó a la sombra por 10, 20 y 30 días. En la Figura 7 se aprecia el limoncillo en las diferentes etapas de preparación, recién recolectado del ingenio, durante el proceso de selección manual, secado a la sombra y el limoncillo cortado en trozos de aproximadamente 0.5 cm de largo.



Figura 7. Imágenes del tratamiento del limoncillo. **a)** Limoncillo recolectado; **b)** proceso de selección; **c)** secado; **d)** limoncillo seco y cortado (0,5 cm).

5.2.2 Cáscara de naranja.

La cáscara de naranja común se compró en la galería de la trece, de la ciudad de Popayán, Cauca. En la Figura 8 se muestra el proceso que inicia con el lavado para de eliminar tierra y moho, secado con paño limpio y el pelado con cuchillo de acero inoxidable. La cáscara se secó durante 2 y 4 días a temperatura ambiente y en la sombra. Para efectos de comparación, también se trabajó con cáscara fresca.

Antes de someter la cascara al proceso de extracción del AE, con el fin de mejorar el rendimiento, se cortó en pedazos de aproximadamente 0,5 cm.

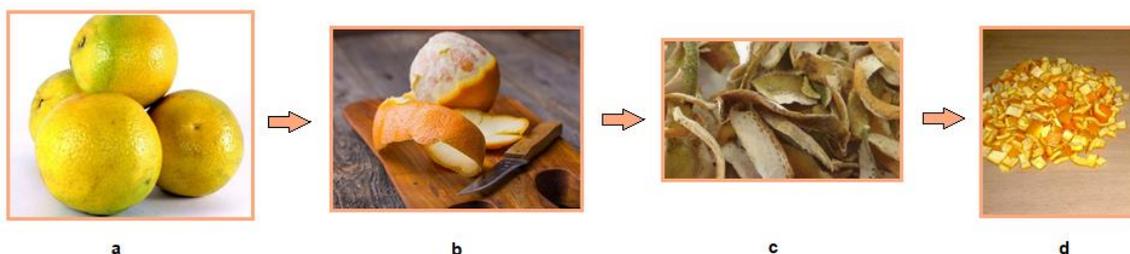


Figura 8. Imágenes del tratamiento a la cáscara de naranja. **a)** Cáscara lavada; **b)** pelado de la fruta; **c)** cáscara de naranja en proceso de secado; **d)** corte de la cáscara de naranja.

5.3 Extracción del AE de limoncillo y cáscara de naranja.

5.3.1 Método clásico: Hd por arrastre de vapor.

Se utilizó un equipo Hidrodestilador tipo Clevenger vertical, en el cual hay un compartimiento para colocar la muestra vegetal separada del balón que contiene el solvente (Figura 9(a)). La muestra vegetal de limoncillo o de cáscaras de naranja previamente pesada, se puso en una malla cilíndrica, en el compartimiento del equipo, encima del balón que contenía el agua, cuya ebullición generó el vapor que arrastró los componentes del AE. La mezcla de gases producida, se condensó y los componentes líquidos formaron dos fases, la orgánica menos densa se separó, mientras que la fase acuosa retornó al balón de origen. El AE recolectado se secó con sulfato de sodio anhidro, se pesó y se guardó en envase ámbar a una temperatura aproximada de 4°C para análisis posteriores.

5.3.2 Método innovador: extracción asistida por US.

Las muestras se colocaron en un baño de US, en un balón de fondo redondo que contenía el solvente etanol/agua, conectado a un condensador para evitar la pérdida del solvente. En la Figura 9(b), se aprecia el montaje del equipo utilizado.

Al finalizar el procedimiento se filtró la mezcla y se extrajo con éter de petróleo, luego se secó con sulfato de sodio anhidro y se rotoevaporó el solvente. Los AE recolectados se guardaron en envase ámbar a 4°C para análisis posteriores.

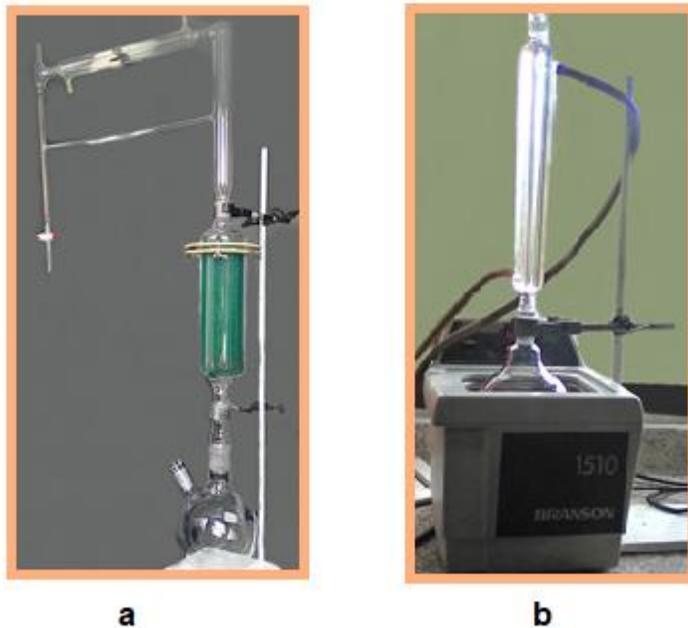


Figura 9. Equipos utilizados para la extracción de AE a) Hidrodestilador tipo Clevenger y b) baño de US.

Foto tomada por: Tatiana Muñoz

La concentración de extracto (%E) se determinó por medio de la Ecuación 1

Ecuación 1
$$\%E = \frac{w_{AE}}{w_{MV}} * 100$$

Donde, w_{AE} es el peso en g obtenido del AE y w_{MV} corresponde al peso en g del material vegetal respectivo.

5.4 Diseño experimental de optimización.

5.4.1 Hd por arrastre de vapor.

El diseño experimental se realizó con el propósito de determinar las condiciones óptimas de extracción del AE de la cáscara de naranja y del limoncillo. Se realizó

un diseño experimental factorial multinivel. La variable de respuesta es el porcentaje (%E) de extracción del AE y se evaluaron los siguientes factores:

Tiempo de extracción, t-extrac- (h)

Cantidad de muestra, peso w (g)

Tiempo de secado de la muestra, ts (días)

El diseño elegido de 3^3 , corresponde a 27 experimentos, cada uno de ellos replicado una vez, para un total de 54 experimentos por muestra de cáscaras de naranja y 54 experimentos por muestra de limoncillo. En la Tabla 2 se presentan las condiciones experimentales que se analizaron para extracción de AE de cáscara de naranja y limoncillo. Cabe mencionar que en el tiempo de secado (ts), "0" se refiere al material vegetal fresco.

Tabla 2. Condiciones experimentales para Hd, tiempo de secado ts (días); peso de la muestra w (g) y tiempo de extracción t-extrac. (h).

ts (días)	w (g)	t-extrac. (h)
Cáscara de naranja		
0	320	2
2	420	3
4	520	4
Limoncillo		
10	170	2
20	220	3
30	270	4

5.4.2 Extracción asistida por US.

En la optimización de la extracción de AE por US se utilizó un diseño de superficie respuesta llamado diseño compuesto central (DCC) en dos bloques. En este modelo se estudian los efectos de 3 factores en 18 corridas, incluyendo dos puntos centrales por bloque. Los factores experimentales fueron: concentración de la planta,

temperatura del baño de US y tiempo de extracción. La variable de respuesta es el porcentaje de extracción del AE. En la Tabla 3 se muestran los valores altos y bajos para los factores estudiados en el diseño experimental del limoncillo y la cáscara de naranja.

Tabla 3. Niveles alto y bajo para cada factor estudiado en el diseño experimental DCC.

Factores	Bajo	Alto	Unidades
Limoncillo			
Temperatura (T)	30	50	°C
Tiempo de extracción (t-extrac.)	30	60	min
Concentración de la planta	6	10	%w/v
Cáscara de naranja			
T	30	50	°C
t-extrac.	20	60	min
Concentración de la planta	10	30	%w/v

El factor concentración de la planta se determinó aplicando la Ecuación 2.

Ecuación 2 concentración planta = $\frac{W_{MV}}{V_S} \times 100$

Donde w_{MV} es el peso del material vegetal (g) y v_s es el volumen del solvente (mL).

El solvente empleado es una relación de etanol/agua, que se determinó mediante ensayos preliminares, que consistieron en dejar fijos los factores temperatura (50°C), tiempo de extracción (50 min) y peso muestra (50g) y variar solamente la relación etanol/agua.

La relación etanol/agua con mayor porcentaje de extracción de AE de limoncillo y cáscara de naranja, se presentan en las Figuras 10 y 11 respectivamente; en ellas se puede apreciar que para el limoncillo, la mejor relación fue 50/50 y para la cáscara de naranja fue 75/25; Los valores obtenidos se pueden encontrar en el anexo 1.

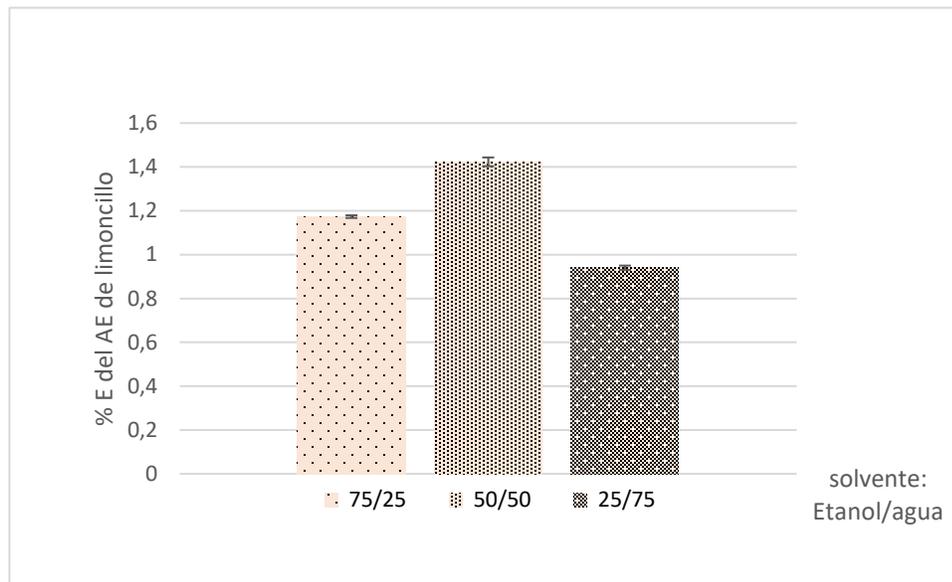


Figura 10. % E de AE de limoncillo a diferentes relaciones de Etanol/agua

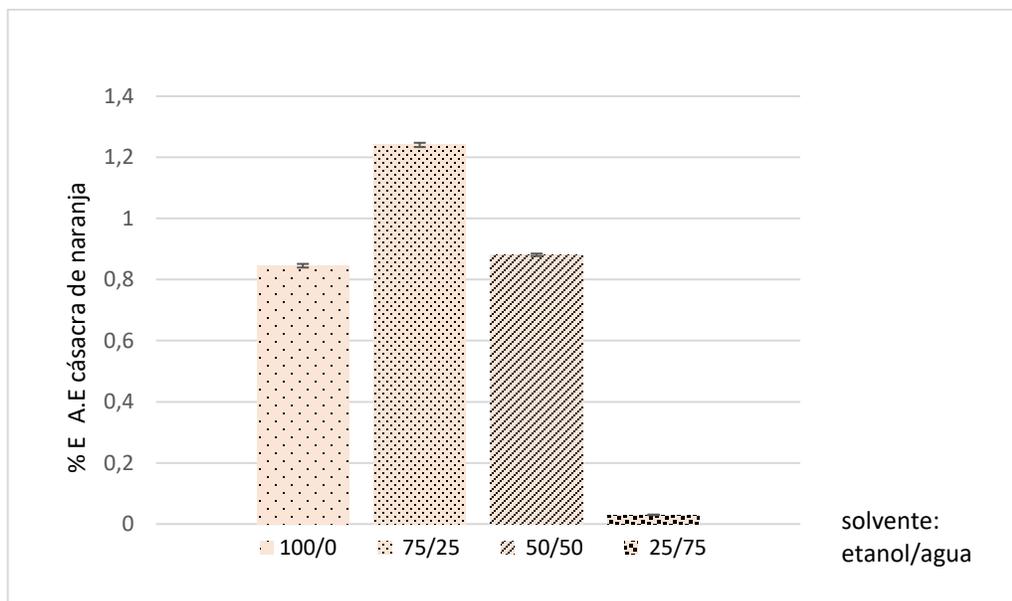


Figura 11. %E de AE obtenido a partir de Cáscara de naranja a diferentes relaciones de Etanol/agua

5.5 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como el promedio de tres valores \pm desviación estandar. El tratamiento estadístico de los diseños experimentales se efectuó con el programa STATGRAPHICS Centurión XVI.I. Adicionalmente, se realizó la prueba T para comparación de medias, con un nivel de confianza del 95%; este análisis se realizó en el software SPSS 23.

5.6 Caracterización de los aceites esenciales extraídos.

la caracterización de los AE se realizó por tres métodos: análisis sensorial (color, olor); análisis físico (densidad relativa, índice de refracción y solubilidad en etanol al 70%); y análisis instrumental (espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS).

5.6.1 Determinación de propiedades físicas del AE

- **Densidad relativa del AE a 20 °C**

para ello se utilizó un picnómetro limpio y seco de 1 mL de capacidad, se pesó vacío en una balanza analítica; seguidamente se llenó con 1 mL del AE, tapándose y limpiándose el exceso de muestra. Luego, se pesó el conjunto y por diferencia de pesos se determinó la densidad del AE empleando la Ecuación 3²⁹.

$$\text{Ecuación 3 } \rho_{AE} \text{ (g/mL)} = \frac{[(\text{peso del picnómetro+muestra})-(\text{peso picnómetro})](\text{g})}{(\text{volmunen del AE}) \text{ (mL)}}$$

A continuación, se derterminó la densidad relativa, la cual se define como el cociente de la densidad de la muestra entre la densidad del agua; esta cantidad no tiene unidades (Ecuación 4)

$$\text{Ecuación 4 } \rho_{\text{relativa}} = \frac{\rho_{AE}}{\rho_{\text{agua}}}$$

Donde ρ_{AE} es la densidad del AE y ρ_{agua} es la densidad del agua.

- **Índice de refracción de los AE.**

La prueba se realizó utilizando un refractómetro manual, con la ayuda de un capilar se depositó dos gotas de AE sobre el prisma del refractómetro y se procedió con la lectura a 20 °C²⁹.

- **Solubilidad de los AE en etanol 70 % (v/v).**

En un tubo *ependorf* de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70 % (v/v) y 2 µL del AE; la mezcla se homogenizó en un *vórtex* durante 5 min a 20 rpm²⁹.

5.6.2 Análisis instrumental.

- **Espectroscopía infrarroja (IR).**

Los AE extraídos se analizaron en un equipo marca Thermo®IR-NICOLET iS10 accesorio iTR (ATR), el barrido se efectuó entre los rangos 4000 y 400 cm⁻¹ para identificar los grupos funcionales.

- **Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS)**

El análisis de los AE extraídos por CG/MS se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases THERMO Scientific Trace 1300, acoplado a un detector de masas THERMO Scientific ISQ LT. La separación de los compuestos se realizó en una columna HP-5MS (30m x 0,250mm x 0,25 µm). Teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Temperatura del inyector 230 °C. Gas de arrastre Helio, flujo de 25 mL/min en Modo Split (flujo 50 mL/min). Se inyectó un volumen de 0,2 µL de muestra, llevando una rampa de temperatura de 45-125 (incremento de 4 °C/min). La temperatura de la fuente de ionización y del detector fue 220°C.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Optimización diseño Hd por arrastre de vapor (diseño factorial).

Para efectuar los análisis, se plantearon las hipótesis del modelo.

➤ HIPÓTESIS PARA PRUEBAS DE EFECTOS PRINCIPALES

- H_0 : no hay un efecto debido al factor tiempo de extracción (A) en el porcentaje de extracción de AE.
 H_1 : al menos hay un efecto debido al factor A en el porcentaje de extracción de AE.
- H_0 : no hay un efecto debido a la cantidad de muestra (B) en el porcentaje de extracción del AE.
 H_1 : al menos hay un efecto debido a B en el porcentaje de extracción del AE limoncillo.
- H_0 : no hay un efecto debido al tiempo de secado (C) en el porcentaje de extracción de AE.
 H_1 : al menos hay un efecto debido a C en el porcentaje de extracción de AE.

➤ HIPÓTESIS PARA INTERACCIONES

- H_0 : no hay interacción entre los factores A y B en el porcentaje de extracción de AE.
 H_1 : hay interacción entre los factores A y B en el porcentaje de extracción de AE.
- H_0 : no hay interacción entre los factores A y C en el porcentaje de extracción de.
 H_1 : hay interacción entre los factores A y C en el porcentaje de extracción de AE.

- H_0 : no hay interacción entre los factores B y C en el porcentaje de extracción de AE.
- H_1 : hay interacción entre los factores B y C en el porcentaje de extracción de AE.

6.1.1 Limoncillo.

Tras obtener los porcentajes de extracción ejecutando el modelo estadístico factorial de 3^3 (ver anexo 2 Tabla 1) planteado, se obtiene el análisis de varianza ANOVA mostrado en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA para porcentajes de extracción de AE limoncillo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: tiempo de extracción	0,0049	1	0,0049	3,90	0,0546
B: cantidad de muestra	0,01818	1	0,01818	14,47	0,0004
C: tiempo de secado	0,0114134	1	0,0114134	9,08	0,0043
AA	0,00152626	1	0,00152626	1,21	0,2764
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	3,75E-7	1	3,75E-7	0,00	0,9863
BB	0,0030189	1	0,0030189	2,40	0,1283
BC	0,00326667	1	0,00326667	2,60	0,1140
CC	0,0463349	1	0,0463349	36,88	0,0000
Error total	0,0552846	44	0,00125647		
Total (corr.)	0,143925	53			

La Tabla ANOVA particiona la variabilidad de porcentaje de extracción en piezas separadas para cada uno de los efectos. Probando la significancia estadística de cada efecto, comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Al comparar el valor-P de los tratamientos con un nivel de significancia $\alpha = 0,05^{30}$. Se puede observar que dos efectos rechazan la hipótesis nula puesto que tienen un valor-P menor que 0,05 los cuales son B y C, indicando que son

significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%, es decir los dos efectos si influyen en el porcentaje de extracción de AE de limoncillo. El factor A tiene un valor-P mayor a 0,05, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se concluye que no tiene un efecto en el porcentaje de extracción de AE limoncillo.

Para el caso de las interacciones entre los efectos, tanto AB, AC, y BC tienen un valor-P mayor a 0,05 por consiguiente se aceptan las tres hipótesis nulas es decir, no hay interacción entre los factores.

A continuación se analizó el diagrama de Pareto (Figura 12), donde se presentan en orden decreciente de importancia de los efectos estimados. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado entre su error estándar. La línea vertical se utiliza para juzgar cuáles son los efectos estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea correspondiente a efectos, es estadísticamente significativa con un 95% de nivel de confianza.

En este caso, los efectos B y C superan la línea de significancia, en consecuencia, son efectos significativos; resultado comparable con en análisis de varianza. Adicionalmente, el signo positivo de cantidad de muestra, indica que a medida que aumente la B, aumentará el %E; caso contrario a lo que ocurre con el C en el que disminuye %E, a medida que aumenta el tiempo de secado. Estos resultados son coherentes con el análisis de varianza.

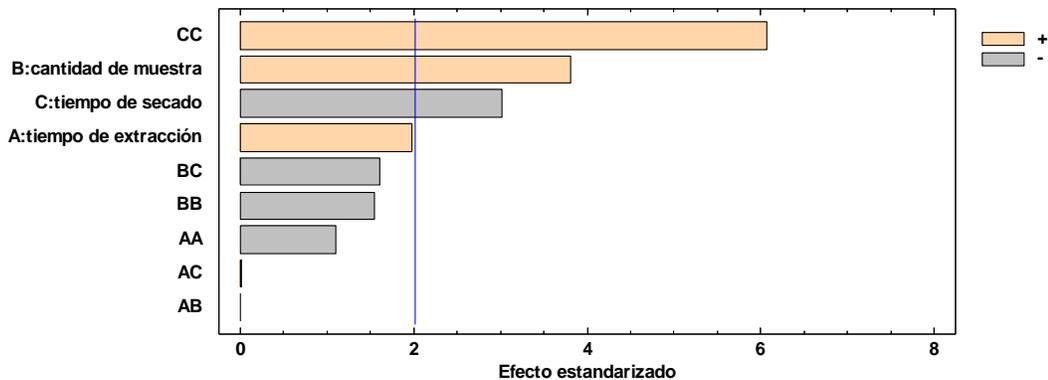


Figura 12. Diagrama de Pareto para % E de AE limoncillo.

En el ANOVA se presencié la influencia de los factores en estudio, de modo que se procedió analizar los gráficos de efectos principales y de interacciones, las que

servirán para emitir la conclusión principal que es encontrar los puntos óptimos que dan mejor %E de AE limoncillo utilizando Hd por arrastre de vapor.

En la Figura 13, se observa que tanto en el tiempo de extracción como en la cantidad de muestra, hubo un crecimiento en %E, hasta cierto punto y luego comenzó a descender, por tanto, los valores óptimos están dentro del rango de los factores. En el caso del tiempo de secado, los valores comienzan altos, van descendiendo hasta un punto mínimo y al final suben pero hasta un valor menor. Esta tendencia presumiblemente se debe a que después de cierto tiempo de secado, los compuestos volátiles de la hoja de limoncillo se oxidan y evaporan, reduciendo la proporción de ellos expuesta al extraerlos.

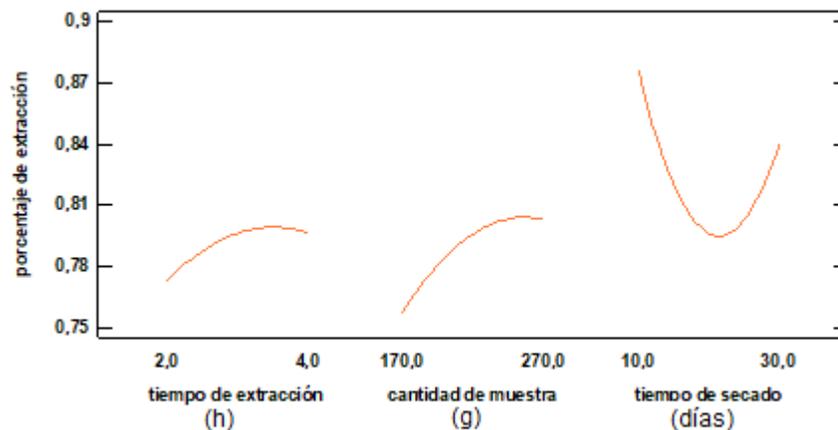


Figura 13. Gráfico de efectos principales para % E de AE limoncillo.

El gráfico de interacciones dobles presentadas en la Figura 14 muestra que no hay interacción entre los factores analizados. Estos resultados se pueden corroborar en la Tabla ANOVA, donde el valor-P para interacciones entre los tres factores es mayor a 0,05.

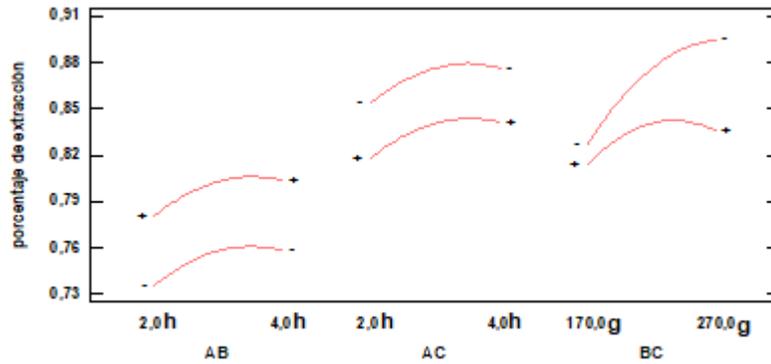


Figura 14. Gráfico de interacción para % E de AE limoncillo.

La ecuación del modelo ajustado se registra en la ecuación 5.

Ecuación 5. $\%E = 0,43606 + 0,0790833*A + 0,00370767*B - 0,0215403*C - 0,0112778* A^2 + 0,0* A*B + 0,0000125*A*C - 0,00000634444*B^2 - 0,0000233333*B*C + 0,000621389*C^2.$

La función condujo a un gráfico estimado de superficie de respuesta, exhibido en la Figura 15. Se observa en dicho gráfico que con el tiempo de extracción de 3,5 h, el mejor tiempo de secado es 10 días, con una cantidad de muestra de 270 g, correspondiendo a un %E aproximado de 0,90%. Estos datos se pueden corroborar en la Tabla 10 de optimización del diseño, la cual muestra los valores óptimos de tiempo de extracción, cantidad de muestra y tiempo de secado.

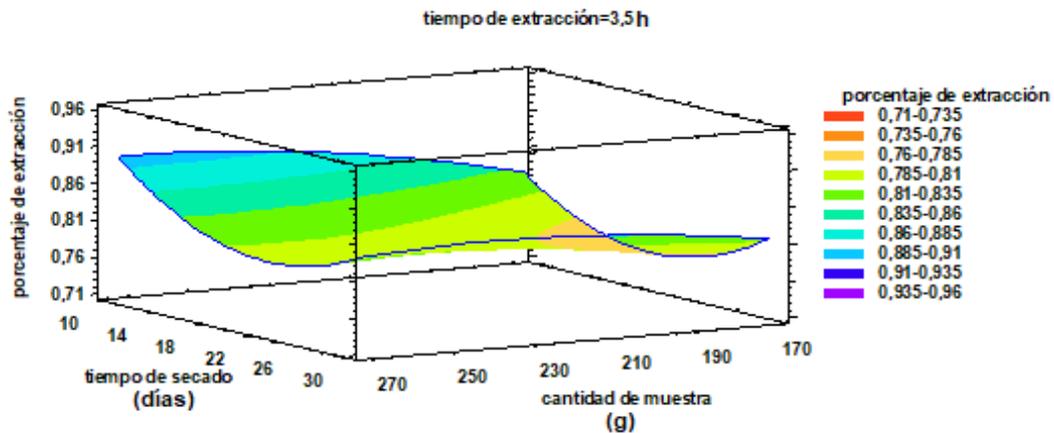


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta estimada.

Tabla 5. Combinación de tiempo de extracción (t-Extrac.), tiempo de secado (ts) y cantidad de muestra (w), para maximizar %E de AE limoncillo.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
t-Extrac.	2,0	4,0	3,5 h
w	170,0	270,0	267,0 g
ts	10,0	30,0	10,0 días

6.1.2 Cáscara de naranja.

En el anexo 2 tabla 2, se muestran los porcentajes de extracción del AE de cáscara de naranja obtenidos en cada una de las combinaciones propuestas por el diseño estadístico factorial multinivel. Con los datos obtenidos, se procedió a analizar la varianza del %E, con la Tabla ANOVA (Tabla 6)

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para %E de AE de cáscara de naranja.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:t- Extrac.	0,082944	1	0,082944	52,65	0,0000
B: w	0,0764523	1	0,0764523	48,53	0,0000
C:ts	0,445556	1	0,445556	282,80	0,0000
AA	0,0156481	1	0,0156481	9,93	0,0030
AB	0,00015	1	0,00015	0,10	0,7591
AC	0,0004335	1	0,0004335	0,28	0,6026
BB	0,00527801	1	0,00527801	3,35	0,0741
BC	0,000715042	1	0,000715042	0,45	0,5041
CC	0,515707	1	0,515707	327,33	0,0000
bloques	0,000106963	1	0,000106963	0,07	0,7957
Error total	0,0677471	43	0,00157551		
Total (corr.)	1,21074	53			

Al rechazar la hipótesis nula de A, B, y C; puesto que son menores los respectivos valores-P a un nivel de significancia $\alpha=0,05$, se concluye que los tres factores afectan significativamente %E de AE de cáscara de naranja. Lo contrario sucede con las interacciones AB, AC y BC, ya que sus valores-P están por encima del nivel

significancia $\alpha=0,05$. Por lo anterior, se aceptan las hipótesis nulas y se determina que las interacciones entre factores no afecta la extracción de AE de la cáscara de naranja.

Señalados los factores que afectan el %E, se analizó el diagrama de Pareto. Con él se pudo establecer si los factores afectan positiva o negativamente en %E. Se puede apreciar en el diagrama expuesto en la Figura 16 que A y B afectan de forma positiva en %E y C en forma negativa, además C es el que mayor efecto genera. Los resultados son coherentes con el análisis de varianza ANOVA.

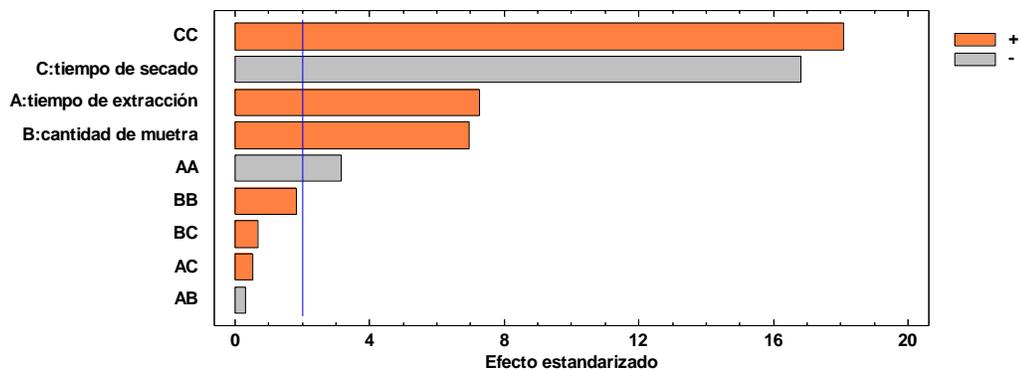


Figura 16. Diagrama de Pareto para %E

El gráfico de los efectos principales presentada en la Figura 17, muestra que el aumento del tiempo de extracción, influye en el %E de AE, el cual va aumentando de forma progresiva hasta un límite de tiempo, a partir de allí su efecto es mínimo. En cantidad de muestra el efecto, es creciente, pero no provoca un cambio fuerte en %E de AE de cáscara de naranja, efecto que si provoca el tiempo de secado, puesto que cae drásticamente %E en un tiempo de 0 a 2 días de secado y posteriormente vuelve a incrementarse ligeramente. Esto podría deberse a la misma estructura de la cáscara donde está almacenado el AE. A medida que la cáscara se va secando, la dermis se va endureciendo, impidiendo que el vapor entre con facilidad a las glándulas donde se encuentra el AE.

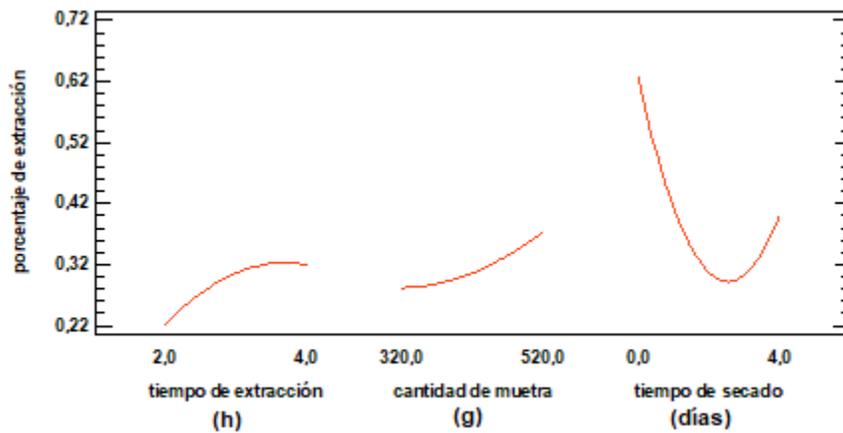


Figura 17.Gráfico de efectos principales para %E de AE cáscara de naranja

Continuando el análisis de las interacciones, en el gráfico de la Figura 18, en coherencia con el análisis de varianza se descartan efectos de las interacciones sobre el porcentaje de extracción de AE de cáscara de naranja.

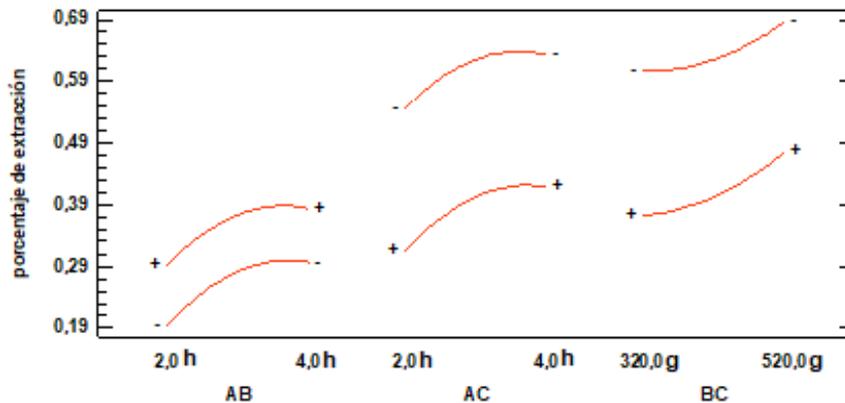


Figura 18.Gráfico de interacción para %E de AE de cáscara de naranja

A continuación se muestra la Ecuación 6 de regresión, la cual se ajusta a los datos:

Ecuación 6.
$$\%E = 0,337279 + 0,270917*A - 0,00128042*B - 0,280768*C - 0,0361111*A^2 - 0,000025*A*B + 0,002125*A*C + 0,00000209722*B^2 + 0,0000272917*B*C + 0,0518264*C^2.$$

A partir de la Ecuación del modelo ajustado, se realizó el gráfico de superficie de respuesta estimada, mostrada en la Figura 19. Según el gráfico, %E de AE de la cáscara mejora al aumentar la cantidad muestra. Cabe resaltar que la máxima cantidad de muestra utilizada fue 520 g, debido a la capacidad del hidroddestilador. A medida que la cáscara de naranja se va secando, este valor disminuye.

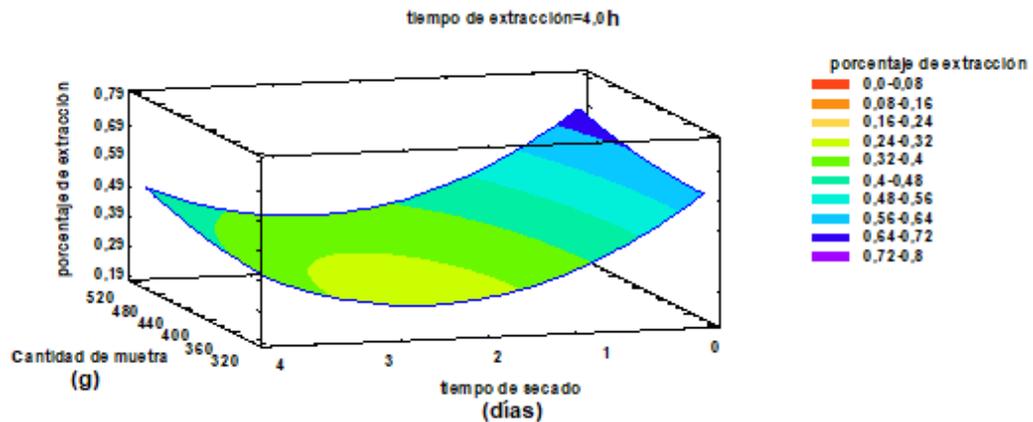


Figura 19. Gráfico de superficie estimada para %E de AE cáscara de naranja.

A continuación, se muestra en la Tabla 7 los resultados de la optimización según el diseño operado, arrojados por el analizador estadístico STATGRAPHICS Centurion. La combinación de los niveles de los factores, maximiza el %E, generando un valor óptimo teórico de 0,7%.

Tabla 7. Niveles óptimos de los factores que maximizan %E de AE de cáscara de naranja.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
t-Extrac.	2,0	4,0	3,6 h
w	320,0	520,0	520,0g
ts	0,0	4,0	0 días (fresco)

6.2 Optimización diseño extracción asistida por US (diseño superficie de respuesta DCC).

6.2.1 Limoncillo.

Los resultados de la Tabla ANOVA mostraron que el unico factor con valor-P menor a 0,05 con una influencia significativa (95%) sobre el porcentaje de extracción es la concentración de la planta. El desarrollo experimental se registra en el anexo 2, tabla 3. Los resultados del test ANOVA se muestran en la Tabla 8. El diagrama de Pareto (Figura 20) revela que el efecto individual significativo fue C, pero de forma negativa es decir, que a medida que aumentó la concentración de la planta el porcentaje de extracción fue disminuyendo, debido a que las bajas concentraciones del material vegetal o mayor proporción de solvente, condicionan una gran diferencia de la cantidad de células del interior de la planta y el solvente, lo que redundan en una difusión más rápida de los aceites esenciales. Sin embargo, un aumento adicional en la relación de solvente o disminución en la concentración de la planta prolonga la distancia de difusión que podría causar un efecto negativo en los rendimientos del extracto en tiempos cortos de extracción³¹.

Tabla 8. Análisis de varianza ANOVA para %E AE limoncillo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,00543151	1	0,00543151	0,17	0,6950
B: Tiempo de extracción	0,0405957	1	0,0405957	1,24	0,2987
C: concentración de la planta	0,534092	1	0,534092	16,25	0,0038
AB	0,00348613	1	0,00348613	0,11	0,7530
AC	0,0185281	1	0,0185281	0,56	0,4743
BB	0,135642	1	0,135642	4,13	0,0767
BC	0,00987013	1	0,00987013	0,30	0,5986
CC	0,838931	1	0,838931	25,52	0,0010
bloques	0,0878289	1	0,0878289	2,67	0,1408
Error total	0,26294	8	0,0328676		
Total (corr.)	1,83488	17			

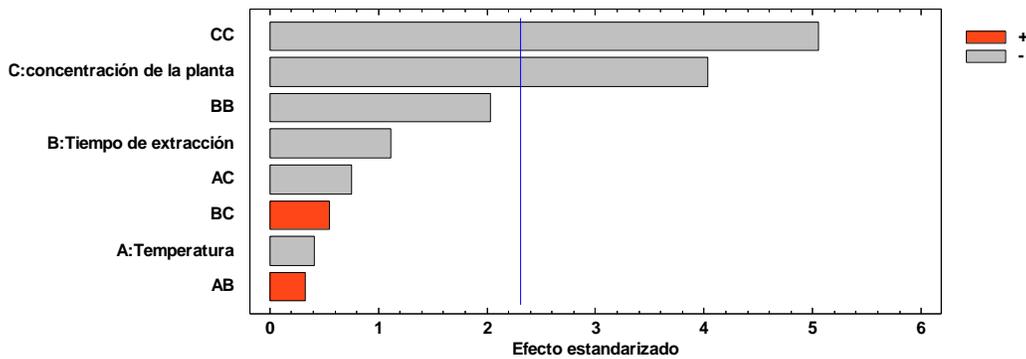


Figura 20. Diagrama de Pareto para %E de AE limoncillo.

En el gráfico de efectos principales (Figura 21) se puede notar que A no varía significativamente el %E; igualmente ocurre con B. Por su parte, C es el factor que provocó un fuerte cambio en %E de AE limoncillo. Además, no hay interacciones entre los efectos que influyen en %E de AE limoncillo por US (Figura 22) en coherencia con el resultado del análisis de varianza.

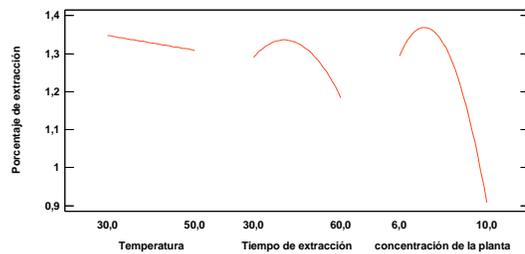


Figura 21. Gráfico de efectos principales para la extracción de AE limoncillo

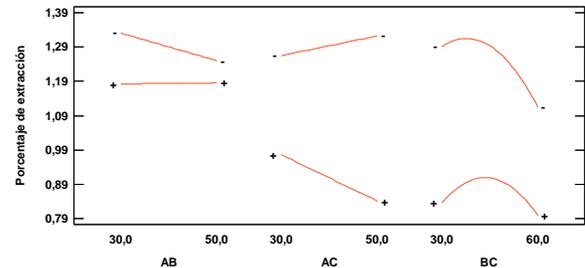


Figura 22. Gráfico de interacciones para %E de AE limoncillo

La Ecuación 7 representa el modelo ajustado para %E de AE limoncillo.

Ecuación 7.
$$\%E = -2,22278 + 0,0110454 \cdot A + 0,0180954 \cdot B + 0,856705 \cdot C + 0,000139167 \cdot A \cdot B - 0,00240625 \cdot A \cdot C - 0,000406316 \cdot B^2 + 0,00117083 \cdot B \cdot C - 0,0568398 \cdot C^2.$$

Con la función se obtuvo el gráfico de superficie de respuesta generada por el DCC mostrada en la figura 23; allí se puede apreciar que a una concentración de planta de 7,4%, la mejor temperatura de extracción está alrededor de los 22 °C y el mejor tiempo de extracción está entre los 28 y 48 min. Los valores óptimos establecidos por el diseño experimental están descritos en la tabla 9, para un porcentaje óptimo de extracción de 1,4%, la temperatura óptima es 22°C, tiempo de extracción de 37 min, a una concentración de la planta de 7,4%.

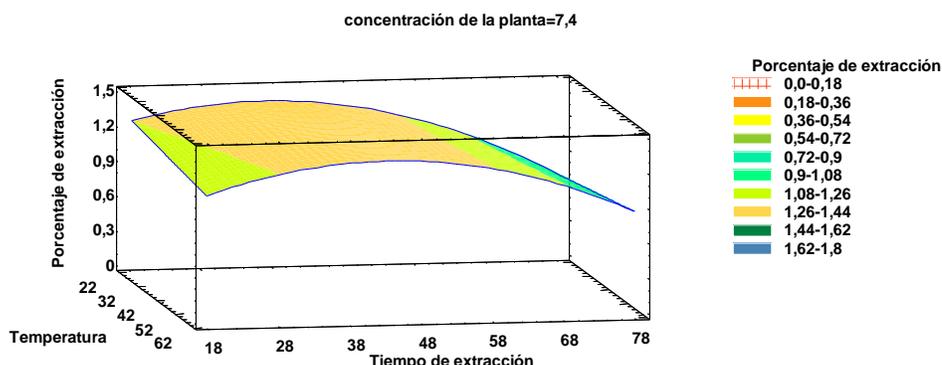


Figura 23. Gráfico de superficie de respuesta para %E de AE limoncillo.

Tabla 9. Niveles óptimos de los factores para la extracción de AE limoncillo por US.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T	22,1115	57,8885	22,0 °C
t-Extrac.	18,1672	71,8328	37,0 min
Concentración de la planta	4,42229	11,5777	7,40 w/v

6.2.2 Cáscara de naranja.

El desarrollo del diseño se encuentra en el anexo 2, tabla 4. La tabla ANOVA (Tabla 10) muestra que hay dos factores con un valor-P menor a 0,05 con un nivel de significancia de 95% los cuales son A y B. Por consiguiente, estos dos factores afectan significativamente el %E de AE de cáscara de naranja por US. Seguidamente, observando el diagrama de pareto que se encuentra en la figura 24, se puede apreciar que B es el factor que ejerce mayor efecto en %E y lo hace de forma positiva es decir, que a medida que se aumenta la temperatura, aumenta %E. En segundo lugar está A, con un efecto negativo sobre %E.

Tabla 10. Análisis de varianza ANOVA para %E de AE de cáscara de naranja.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:concentración muestra	0,0185127	1	0,0185127	6,65	0,0365
B: T	0,0388063	1	0,0388063	13,94	0,0073
C: t-Extrac.	0,00680938	1	0,00680938	2,45	0,1618
AA	0,018167	1	0,018167	6,53	0,0378
AB	0,000072	1	0,000072	0,03	0,8768
AC	0,0012005	1	0,0012005	0,43	0,5323
BB	0,016255	1	0,016255	5,84	0,0463
BC	0,002888	1	0,002888	1,04	0,3423
CC	0,00721998	1	0,00721998	2,59	0,1513
bloques	0,000127201	1	0,000127201	0,05	0,8368
Error total	0,0194827	7	0,00278325		
Total (corr.)	0,116238	17			

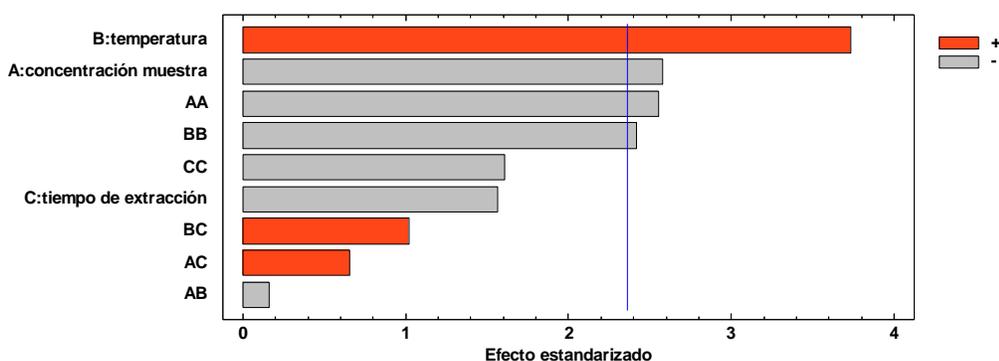


Figura 24. Diagrama de Pareto para % E de AE cáscara de naranja.

En el gráfico de los efectos principales (Figura 25) se observa que hay un fuerte decrecimiento en %E al aumentar el factor A y en B hay un fuerte crecimiento. C presentó un cambio menos significativo y de forma negativa. Al apreciar el gráfico

de interacciones entre los factores se concluye que no hubo interacciones entre ellos (Figura 26).

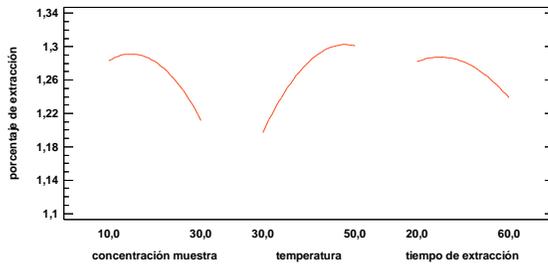


Figura 25. Gráfico de efectos principales para la extracción de AE de cáscara de naranja

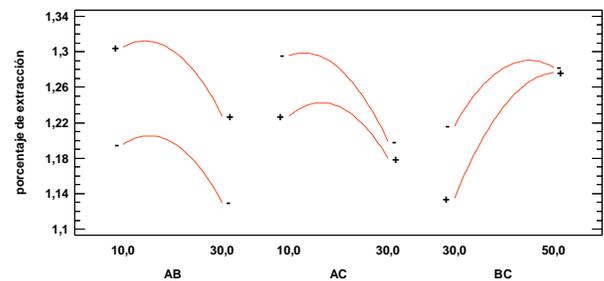


Figura 26. Gráfico de interacciones para %E de AE cáscara de naranja

La Ecuación del modelo ajustado para %E de AE de cáscara de naranja realizado con DCC se muestra en la Ecuación 8 y el gráfico de superficie estimada en la Figura 27. En ella se puede notar que a un tiempo de extracción de 40 min, la mejor temperatura de extracción está aún entre 40 y 50°C y la concentración de muestra está entre 10 y 20% para obtener un %E de 1,3%.

Ecuación 8.
$$\%E = 0,615812 + 0,00903142*A + 0,0282252*B - 0,00174133*C - 0,000346674*A^2 - 0,00003*A*B + 0,00006125*A*C - 0,000327925*B^2 + 0,000095*B*C - 0,000054637*C^2$$

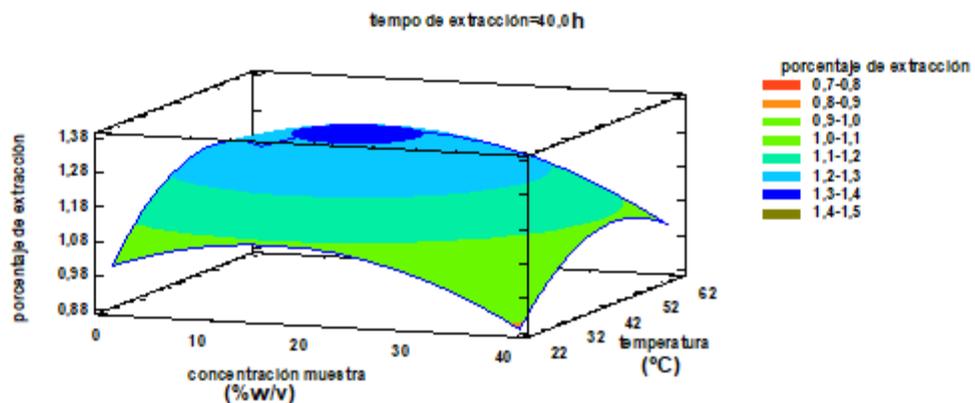


Figura 27. Gráfico de superficie de respuesta para %E de AE de cáscara de naranja.

Los valores óptimos de cada factor se muestran en la Tabla de optimización que arroja el diseño de superficie de respuesta DCC (Tabla 11) para alcanzar un porcentaje de optimización del 1,3%.

Tabla 11. Valores óptimos de los factores para %E de AE de cáscara de naranja.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración muestra	2,11146	37,8885	13,9 w/v
T	22,1115	57,8885	47,0 °C
t-Extrac.	4,22291	75,7771	33,0 min

6.3 Ensayo con los puntos óptimos.

Al finalizar los diseños experimentales y teniendo los valores para la optimización de cada diseño, se realizaron ensayos por triplicado de esos puntos, los valores obtenidos se pueden apreciar en la Tabla 12.

Tabla 12. %E de AE en los puntos óptimos.

%E (\pm SD, n=3)		
Muestra vegetal	Hd por arrastre de vapor	Extracción asistida por US
Limoncillo	0,91 \pm 0,02	1,38 \pm 0,02
Cáscara de naranja	0,59 \pm 0,02	1,29 \pm 0,01

6.4 Comparación de los métodos de extracción.

Hipótesis para la prueba T:

H₀: no hay diferencia significativa entre los métodos de extracción.

H₁: hay diferencia significativa entre los métodos de extracción.

La Tabla 13 de la prueba T con un alpha de 0,05 (ofrece el nivel de significación 1-0,05 = 0,95= 95%). Los valores tabulados se pueden ver en el anexo 3.

Para %E de AE limoncillo por los métodos de Hd y US muestra una diferencia entre las medias de -0,463333 y el límite aceptable está comprendido entre -0,54 y -0,38.

Como puede verse, la diferencia se encuentra dentro de este intervalo, por lo tanto se asume que las medias son diferentes. Se puede ver el estadístico t que vale -25,248 y junto a él su significación o valor-P que vale 0,002. Dado que este valor es menor que 0,025 ($0,05/2=0,025$ por ser un contraste bilateral) se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se concluye que hay diferencias significativas entre los métodos de extracción de AE limoncillo. La comparación de los métodos de extracción de AE de cáscara de naranja es similar al limoncillo, la diferencia entre las medias es de -0,700333; el límite aceptable está comprendido entre -0,54 y -0,38 y el valor-P 0,001 es menor a 0,025, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula aceptando que hay diferencia significativa entre los dos métodos.

Tabla 13. Prueba t para muestras relacionadas.

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. bilateral
	Media	Desviación típ.	Error típ. De la media	95% interv. confianza para la diferencia				
				inferior	superior			
Par 1 Hd – US Limoncillo	-,463333	,031786	,018352	-,542293	-,384373	-25,248	2	,002
Par 2 Hd – US cáscara	-,700333	,031021	,017910	-,777395	-,623272	-39,102	2	,001

Las diferencias entre los métodos se encuentran en el tiempo de extracción y la temperatura; como se puede apreciar en la Tabla 14, el tiempo de extracción utilizando Hd fue 3,5 h para la extracción de AE limoncillo, el cual es mucho mayor comparado con el US que fue de 37 min. Adicionalmente, la temperatura es mucho menor en el método por US (22°C) comparada con la temperatura del Hidrodestilador (98°C); una baja temperatura favorece a los compuestos volátiles ya que no sufrirán de descomposición térmica. Para la extracción de AE de cáscara de naranja, el tiempo de extracción y temperatura utilizados en el US también estuvieron por debajo de las utilizadas en el hidrodestilador.

Tabla 14. Comparación de tiempo de extracción y temperatura en la extracción de AE por los métodos de Hd y US.

Factores	AE limoncillo		AE de cáscara de naranja	
	Hd	US	Hd	US
Tiempo de extracción	3,5 h	37 min	3,6 h	33 min
temperatura	98 °C	22°C	98°C	47°C

6.5 Caracterización de los AE.

6.5.1 Análisis sensorial.

Los AE variaron su color según el método de extracción. Se puede observar en la Figura 28, los AE extraídos por Hd fueron de una tonalidad clara, amarilla en el caso del AE limoncillo (Figura 28(a) LH) y translúcida para el AE de cáscara de naranja (Figura 28b CH). Las tonalidades que tuvieron los AE extraídos por US fueron más intensos como es el caso del AE limoncillo que fue un toco amarillo oscuro (Figura 28a LU) y el AE de cáscara de naranja fue amarillo (Figura 28(b) CU).

El olor que tenían los AE extraídos por ambos métodos fue similar; el AE de limoncillo olía fuerte a limón, y el AE de cáscara de naranja tenía un olor fuerte a naranja.

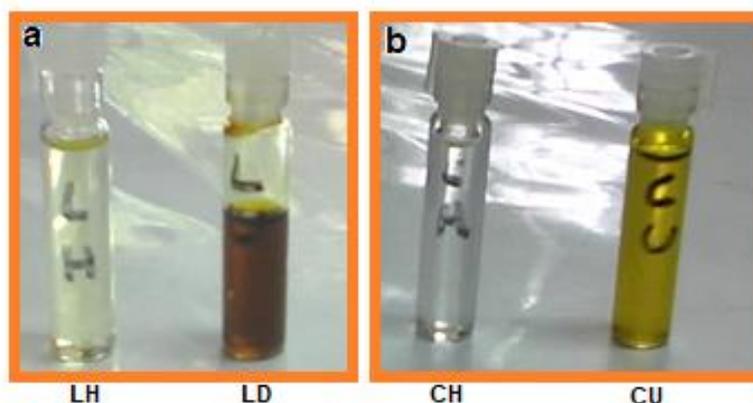


Figura 28. AE extraídos; **a:** AE limoncillo (LH: Hidrodestilación - LU: Ultrasonido) y **b:** AE de cáscara de naranja (CH: Hidrodestilación - CU: Ultrasonido).

6.5.2 Análisis físico.

Tabla 15. Análisis físico de los AE extraídos

	Densidad relativa			Índice de refracción			Solubilidad en Etanol 70%
	Referencia ³²	Hd	US	Referencia ³⁰	Hd	US	
AE limoncillo	0,869-0,894	0,880	0,893	1,483-1,489	1,483	1,484	Soluble
AE de cáscara de naranja	0,840-0,844	0,841	0,843	1,471-1,474	1,472	1,471	Soluble

La densidad relativa, índice de refracción y solubilidad en etanol encontrados en los AE extraídos, se compararon con los reportados en el NAS: Food Chemical Codex (1996)³². Valores que se pueden apreciar en la Tabla 15. En ambos casos, los valores están dentro de las referencias citadas, concluyendo así, que los AE extraídos están dentro de los estándares de calidad establecidos.

6.5.3 Análisis instrumental

Espectroscopia Infrarrojo (IR)

Los AE extraídos se analizaron en un espectrofotómetro Thermo[®]IR-NICOLET iS10 accesorio iTR (ATR), se realizó un barrido espectral para identificar los grupos funcionales de los AE extraídos.

Las técnicas de extracción de AE limoncillo, generaron dos espectros con pocas diferencias, esto se puede apreciar en la Figura 29. Dentro de las bandas encontradas, se pueden ver dos bandas a longitudes de onda entre 2967 y 2954 cm^{-1} , en ambos espectros, las cuales son características de los grupos alifáticos y se debe a la vibración de estiramiento asimétrica de CH_3 . La banda de absorción a 1850 cm^{-1} se atribuye al estiramiento asimétrico del CH_2 . En el espectro de Hd, hay una banda intensa a 1673 cm^{-1} que se genera por el estiramiento del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), por otro lado, el espectro de US tiene una banda suave a 1676 cm^{-1} , atribuible al mismo grupo funcional pero su baja intensidad sugiere que hay menos compuestos con este grupo funcional comparado con el espectro de Hd. Las otras bandas son similares en los dos espectros, como la banda suave que está a una

longitud de onda de 1632 cm^{-1} que se atribuye a la tensión de carbonos con dobles enlaces conjugados; además del pico doble a 1441 y 1376 cm^{-1} que se debe a flexión de tijera del metileno.

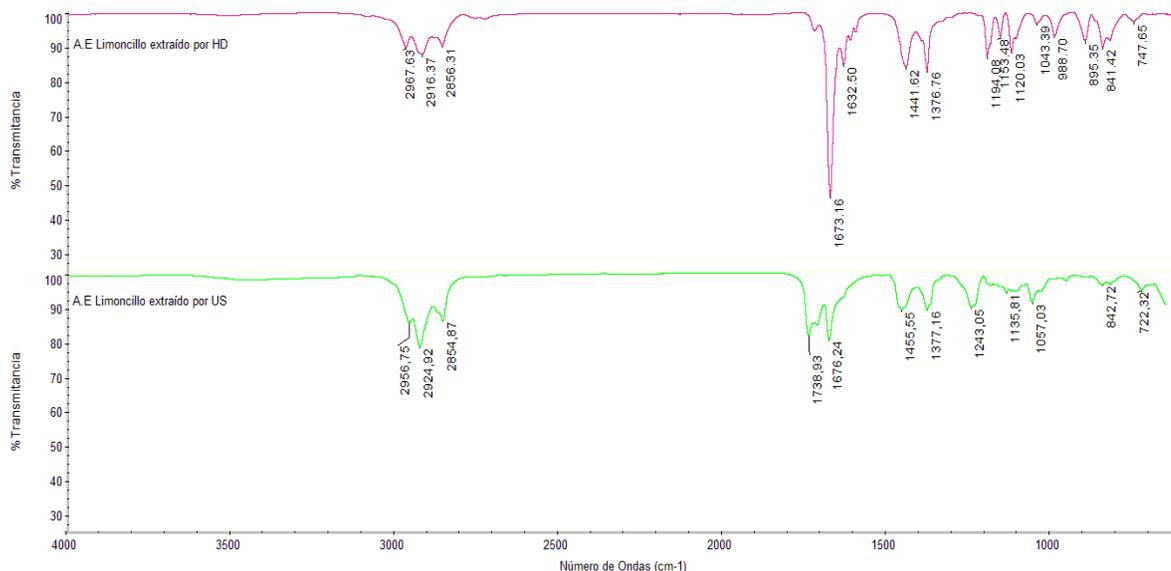


Figura 29. Espectros de IR para AE limoncillo extraído por HD y US.

Los espectros del AE de cáscara de naranja extraído por Hd y US (ver Figura 30) mostraron las mismas absorciones en el infrarrojo. Las bandas por encima de 3000 cm^{-1} , sugieren la presencia de insaturados $=\text{CH}-$ (alquenos aromáticos). La vibración de estiramiento asimétrica CH_3 se produce a $2975\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, mientras que la absorción de CH_2 se produce a aproximadamente 2930 cm^{-1} . Las frecuencias de tensión del enlace $\text{C}=\text{C}$ forman una banda a 1644 y 1436 cm^{-1} aproximadamente. De las bandas fuera del plano (debajo de 900 cm^{-1}) se puede destacar una intensa a 885 cm^{-1} atribuible a una flexión asimétrica de metileno terminal.

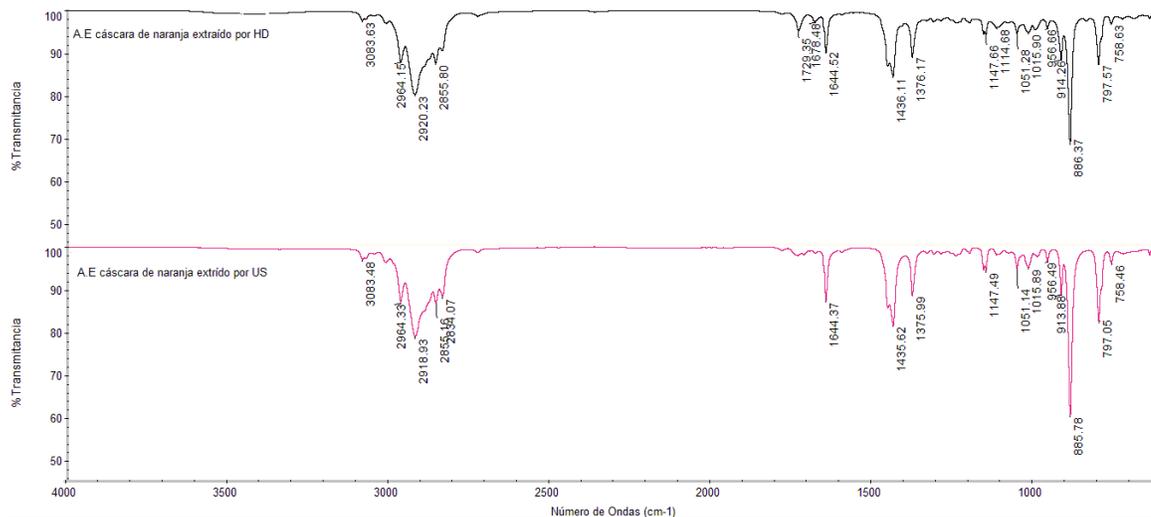


Figura 30. Espectros IR para extracción de AE cáscara de naranja por HD y US.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS)

En los cromatogramas expuestos en las Figuras 31 y 33 se pueden apreciar los componentes que se lograron identificar de los AE de limoncillo y cáscara de naranja respectivamente. La abundancia de cada componente se determinó por porcentaje de área (%A) y su identificación se logró con base a los cromatogramas de masas.

En la Tabla 16 se muestra la composición química del AE limoncillo. Según el porcentaje de área, el citral (neral +geranial) es el compuesto mayoritario (>70%) en los AE extraídos por las dos técnicas estudiadas. El mirceno está presente en el AE extraído por Hd pero no lo están en el AE extraído por US, caso contrario a lo que sucede con el nerol que solo se encuentra en el AE extraído por US. En el caso de linalol, no se puede asegurar su presencia en el AE extraído por US, ya que el espectro presenta mucho ruido (ver Figura 31a y 31b).

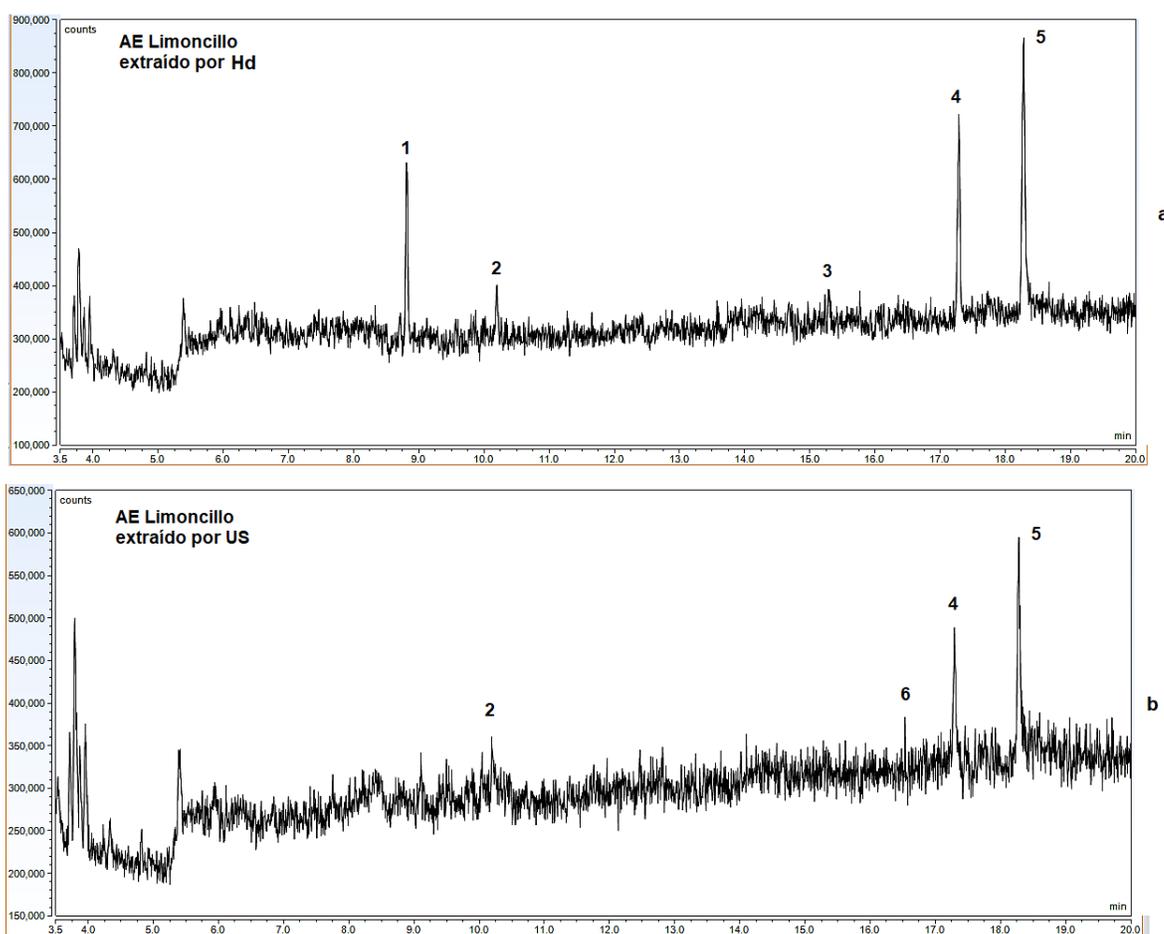


Figura 31. Perfil cromatográfico del AE limoncillo extraído por: **a.** Hd y **b.** US

Tabla 16. Composición química del AE limoncillo usando los métodos de Hd y US.

Nº	Compuesto	tr (Hd)	% A (Hd)	tr (US)	%A (US)
1	Mirceno	8,81	22,07	--	--
2	limoneno	10,20	6,62	10,19	20,22
3	linalol	15,28	5,68	--	--
4	Neral	17,29	25,20	17,29	28,19
5	geranial	18,28	40,44	18,28	44,66
6	nerol	--	--	16,53	6,93

tr: tiempo de retención (min); %A porcentaje de área

Como se expresó anteriormente, el citral es el mayor componente del AE de limoncillo; y uno de sus isómeros es el neral, el cual está identificado en el perfil cromatográfico de gases como la señal #4 y en la Figura 32 se puede apreciar su espectro de masas y el posible fraccionamiento.

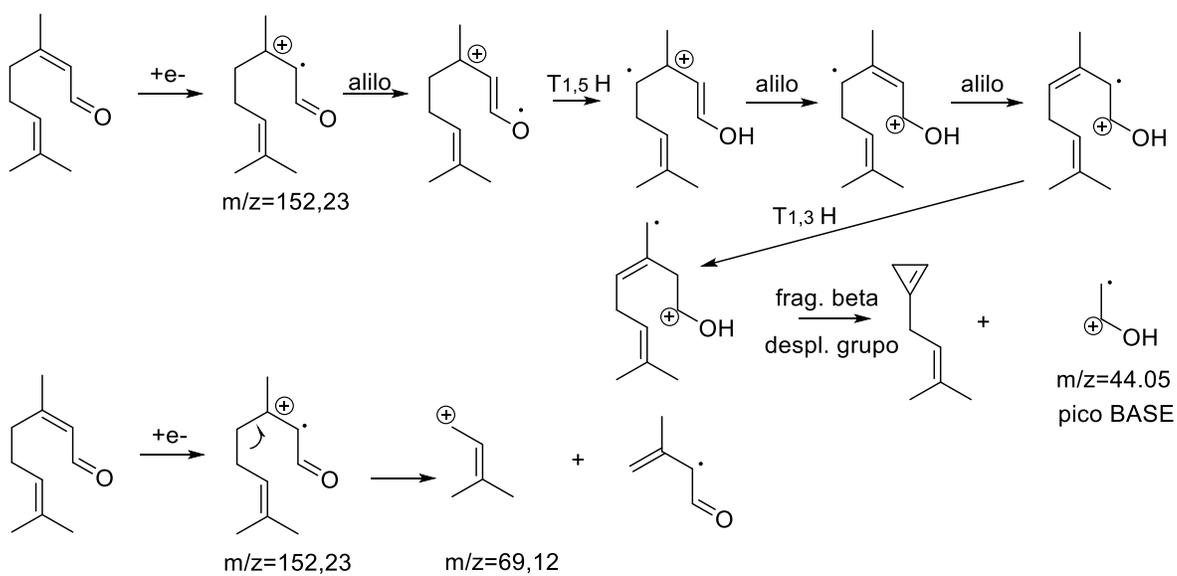
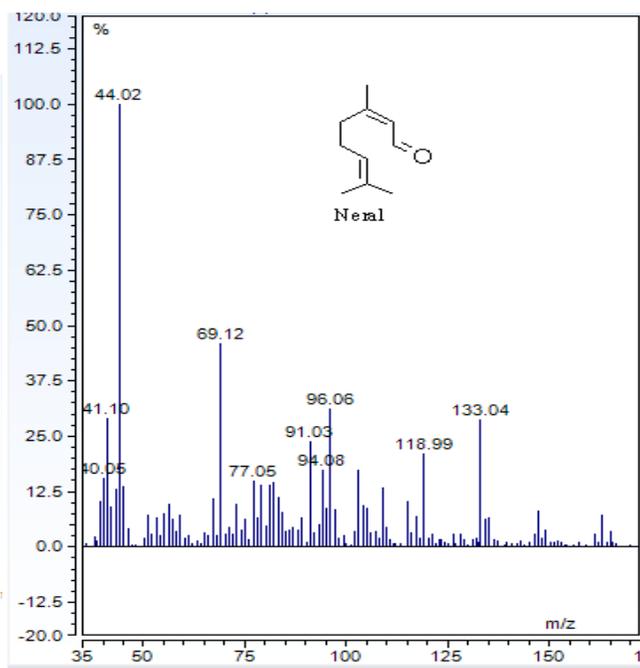


Figura 32. Espectro de masas del neral y fraccionamiento principal.

El fraccionamiento del ión molecular ocurre con participación del catión y el radical alilo; igualmente, hay participación de transposiciones de hidrógeno 1,5 y 1,3 produciendo el catión radical etenol de masa $m/z=44,05$.

A continuación se analizaron los AE de cáscara de naranja que se extrajeron por los métodos de Hd (Figura 33a) y US (Figura 33b). Los perfiles cromatográficos de gases muestran los mismos picos pero con diferentes áreas, por lo que se deduce que los AE tienen los mismos componentes, pero en diferente concentración.

El componente mayoritario es el limoneno en ambos casos (ver Tabla 17). La variabilidad en la composición del AE no se debe al método de extracción, puesto que la muestra fue recolectada en una galería y por tanto no hay una procedencia única, determinando que las características no sean homogéneas en cuanto al cultivo, propiedades del suelo y el clima, que determinan la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

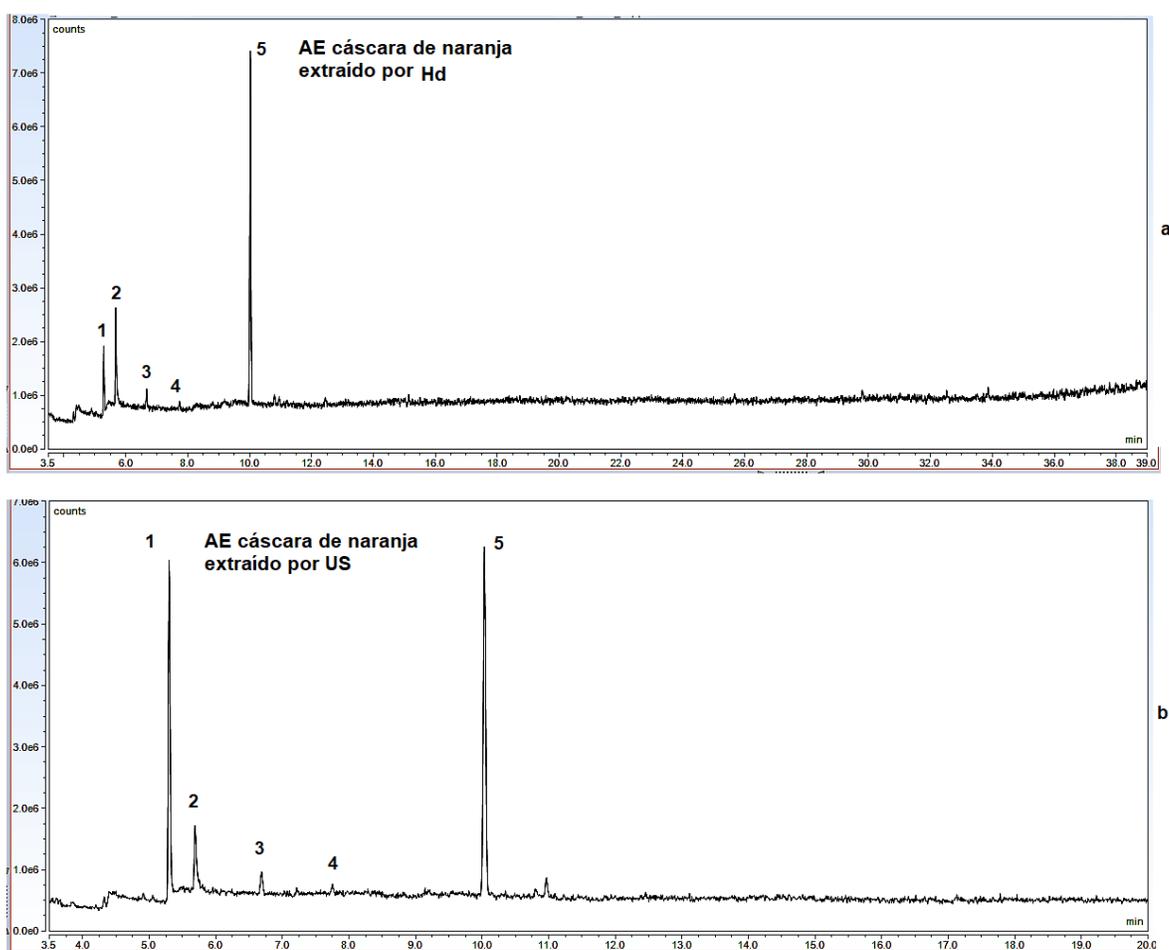


Figura 33. Perfil cromatográfico del AE cáscara de naranja extraído por: **a.** Hd y **b.** US.

Tabla 17. Composición química de AE de cáscara de naranja, extraído por Hd y US

Nº	Compuesto	tr (Hd)	% A (Hd)	tr (US)	%A (US)
1	α -pineno	5,29	10,03	5,30	34,22
2	β -pineno	5,67	18,39	5,69	10,05
3	mirreno	6,67	4,45	6,69	3,23
4	p-cimeno	7,74	1,83	7,75	1,60
5	limoneno	10,02	65,30	10,03	50,90

TR: Tiempo de retención (min); %A: porcentaje de área

Según el cromatograma de gases, el limoneno es el componente mayoritario del AE de cáscara de naranja; por lo tanto se analizó la fragmentación verificada en el espectro de masas. En la Figura 34 se muestran los patrones posibles.

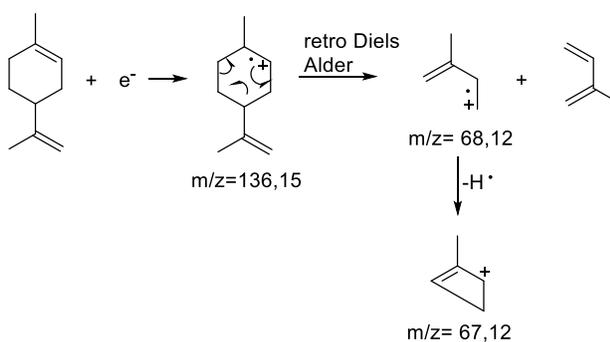
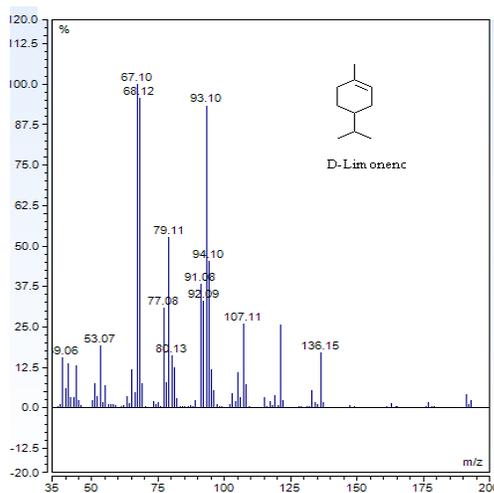


Figura 34. Espectro de masas del limoneno y el patrón de fraccionamiento que genera el pico base.

7. CONCLUSIONES

- ✓ La mejor técnica para extraer citral y limoneno de limoncillo y cáscara de naranja respectivamente según el análisis experimental es por ultrasonido.
- ✓ Las características físicas y sensoriales de los aceites esenciales extraídos son similares en ambos casos a excepción de la intensidad de color de los aceites, puesto que la coloración era más intensa en los AE extraídos por US. Pero en general, la calidad del AE extraído no varía.
- ✓ Analizando los espectros IR de los AE extraídos por las dos técnicas, se notó que fueron pocas las diferencias entre ellos, ya que mostraron los mismos grupos funcionales, pero con diferentes intensidades.
- ✓ El perfil cromatográfico del AE limoncillo extraído por los métodos de Hd y US generado por CG/MS fue comparable, siendo en ambos casos el componente mayoritario el citral (72,4 para Hd y 79,4 para US); distinto a lo que ocurrió con el AE de cáscara de naranja, en el que el contenido del componente principal (limoneno) varió en los dos métodos, pasando de 65,7% para Hd a 44,3% para US.

8. RECOMENDACIONES

Realizar la extracción de AE en un procesador Ultrasónico con el fin de comparar los porcentajes de extracción obtenidos allí y en los obtenidos por el baño de ultrasonido que fue en el que se realizó este trabajo.

Realizar la extracción de AE por lotes de cultivo, para analizar la variación del porcentaje de extracción y los componentes de los AE según las características agroclimáticas del sitio de cultivo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Svoboda KP, Greenaway RI. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *Int J Aromather.* 2003;13(4):196-202.
2. Asbahani A EI, Miladi K, Badri W, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015;483(1-2):220-243.
3. Périno-Issartier S, Ginies C, Cravotto G, Chemat F. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J Chromatogr A.* 2013;1305:41-47.
4. Rodríguez-pérez W, Ledys C, Sánchez-chacon Y, Gómez-mesa JE, Correa-munera MA. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon citratus*. *Momentos Cienc.* 2006;3(1):44-50.
5. León-Méndez G, Osorio M del R, Martínez SR. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Rev Cuba Farm.* 2015;49(4):742-750.
6. Pérez Cordero AF, Chamorro Anaya LM, Vitola Romero DC, Hernández Gómez JM. Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agron Mesoam.* 2017;28(2):465.
7. Farhat A, Fabiano-Tixier AS, Maataoui M EI, Maingonnat JF, Romdhane M, Chemat F. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chem.* 2011;125(1):255-261.
8. Franco-Vega A, Reyes-Jurado F, Cardoso-Ugarte G.A, Sosa-Morales M.E, Palou E L-MA. *Chapter 89 - Sweet Orange (Citrus Sinensis) Oils.*; 2015.
9. Oksman-Caldentey KM, Inzé D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 2004;9(9):433-440.
10. Delgoda R, Murray JE. *Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites.* Elsevier Inc.; 2017.
11. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-475.
12. Dima C, Dima S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Curr Opin Food Sci.* 2015;5:29-35.
13. Stratakos AC, Koidis A. Methods for Extracting Essential Oils. In: Preedy VR,

- ed. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego; 2016:31-38.
14. Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour Fragr J*. 2007;22:494–504.
 15. Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *J Food Eng*. 2009;90(3):409-413.
 16. Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J Chromatogr A*. 2007;1163(1-2):2-24.
 17. Tiwari BK. Ultrasound : A clean , green extraction technology. *Trends Anal Chem*. 2015;71:100-109.
 18. Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chem Eng Process Process Intensif*. 2012;53:10-23.
 19. Skaria BP, Joy PP, Mathew G, Mathew S, Joseph A. Lemongrass. In: Peter K V., ed. *Handbook of Herbs and Spices*. 2nd ed. Woodhead; 2012:348-370.
 20. Mansurah A, Abdulmalik S, Bolanle D. Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Preedy V. R. San Diego; 2016:509-516.
 21. Álvarez Morales L, Salazar Yepes M. Caracterización morfológica de las Royas (PUCCINIALES) que afectan el limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) en Colombia. *Bioagro*. 2014;26(3):171-176.
 22. Naik MI, Fomda BA, Jaykumar E, Bhat JA. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Med*. 2010;3(7):535-538.
 23. Ajayi EO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. *Food Chem*. 2016;209:262-266.
 24. Pérez-Acero J. Cultivo: Hortalizas y Frutales. Origen de la naranja. *UNAD*. 2000;2.
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/issue/download/204/81>.
consultado el 30/11/17.
 25. González Peláez CA, Augusto C. Identificación de materiales de naranja para la agroindustria de jugos y concentrados de exportación, adaptados a las condiciones agroecológicas de la zona cafetera central. *instnameUniversidad Nac Abierta y a Distancia*. 2014.
<http://repository.unad.edu.co/handle/10596/2747>. consultado el 30/11/17.

26. Ferhat MA, Meklati BY, Smadja J, Chemat F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J Chromatogr A*. 2006;1112(1-2):121-126.
27. Gonçalves D, Teschke MEE, Koshima CC, Gonçalves CB, Oliveira AL, Rodrigues CEC. Fractionation of orange essential oil using liquid-liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilib*. 2015;399:87-97.
28. Mirghafourvand M, Charandabi SM-A, Hakimi S, Khodaie L, Galeshi M. Effect of orange peel essential oil on postpartum sleep quality: A randomized controlled clinical trial. *Eur J Integr Med*. 2016;8(1):62-66.
29. Alarcón MET, Melo GEM, González JG, Méndez GL. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Rev Cuba Farm*. 2015;49(3):512-523.
30. Viñán A AB. "Diseño estadístico para el estudio de la respuesta del Maiz (*Zea Mays* L) a la aplicación edáfica complementaria de tres tipos de abono sintético a dos dosis en la comunidad de Peñas, Canton Tiwintza, Provincia de Morona Santiago.
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2014/1/226T0019.pdf>.
consultado el 01/12/17.
31. Tekin K, Akalin MK, Şeker MG. Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Ind Crops Prod*. 2015;77:954-960.
32. Academy N. *NAS: Food Chemicals Codex (1996)*. Vol 552. 4th ed. Washington D.C; 1996.

10. ANEXOS

ANEXO 1.

Porcentaje de AE obtenido a diferentes relaciones de Etanol/agua

Etanol/agua	Etanol 100%	75/25	50/50	25/75
Limoncillo		1,170	1,400	0,950
		1,180	1,440	0,980
		1,170	1,430	0,960
media		1,173	1,423	0,963
SD		0,006	0,021	0,015
Cáscara de naranja	0,852	1,243	0,878	0,031
	0,839	1,239	0,886	0,029
	0,845	1,229	0,879	0,030
media	0,007	0,007	0,004	0,001
SD	0,845	1,237	0,881	0,030

ANEXO 2

Tabla 1. Diseño experimental hidrodestilación para Limoncillo.

#	BLOQUE	T (h)	w (g)	T (días)	%E
1	1	2	170	10	0,791
2	1	3	170	10	0,810
3	1	4	170	10	0,810
4	1	2	220	10	0,826
5	1	3	220	10	0,845
6	1	4	220	10	0,845
7	1	2	270	10	0,939
8	1	3	270	10	0,952
9	1	4	270	10	0,952
10	1	2	170	20	0,779
11	1	3	170	20	0,809
12	1	4	170	20	0,809
13	1	2	220	20	0,784
14	1	3	220	20	0,799
15	1	4	220	20	0,799
16	1	2	270	20	0,735
17	1	3	270	20	0,770
18	1	4	270	20	0,770
19	1	2	170	30	0,761
20	1	3	170	30	0,781
21	1	4	170	30	0,781
22	1	2	220	30	0,829
23	1	3	220	30	0,853
24	1	4	220	30	0,853
25	1	2	270	30	0,843
26	1	3	270	30	0,864
27	1	4	270	30	0,864
28	2	2	170	10	0,796
29	2	3	170	10	0,821
30	2	4	170	10	0,821
31	2	2	220	10	0,829
32	2	3	220	10	0,857
33	2	4	220	10	0,857
34	2	2	270	10	0,878
35	2	3	270	10	0,905
36	2	4	270	10	0,912
37	2	2	170	20	0,769
38	2	3	170	20	0,795
39	2	4	170	20	0,795
40	2	2	220	20	0,790
41	2	3	220	20	0,806
42	2	4	220	20	0,806
43	2	2	270	20	0,718
44	2	3	270	20	0,737
45	2	4	270	20	0,737
46	2	2	170	30	0,755
47	2	3	170	30	0,785
48	2	4	170	30	0,785
49	2	2	220	30	0,843
50	2	3	220	30	0,861
51	2	4	220	30	0,861
52	2	2	270	30	0,810
53	2	3	270	30	0,838
54	2	4	270	30	0,838

Tabla 2. Diseño experimental hidrodestilación para Cáscara de naranja.

#	BLOQUE	t (h)	w (g)	T (días)	%E
1	1	2	320	0	0,550
2	1	3	320	0	0,585
3	1	4	320	0	0,603
4	1	2	420	0	0,535
5	1	3	420	0	0,583
6	1	4	420	0	0,616
7	1	2	520	0	0,618
8	1	3	520	0	0,736
9	1	4	520	0	0,738
10	1	2	320	2	0,205
11	1	3	320	2	0,313
12	1	4	320	2	0,322
13	1	2	420	2	0,220
14	1	3	420	2	0,315
15	1	4	420	2	0,329
16	1	2	520	2	0,244
17	1	3	520	2	0,343
18	1	4	520	2	0,336
19	1	2	320	4	0,253
20	1	3	320	4	0,357
21	1	4	320	4	0,348
22	1	2	420	4	0,310
23	1	3	420	4	0,438
24	1	4	420	4	0,472
25	1	2	520	4	0,442
26	1	3	520	4	0,452
27	1	4	520	4	0,461
28	2	2	320	0	0,582
29	2	3	320	0	0,609
30	2	4	320	0	0,561
31	2	2	420	0	0,503
32	2	3	420	0	0,563
33	2	4	420	0	0,606
34	2	2	520	0	0,615
35	2	3	520	0	0,738
36	2	4	520	0	0,740
37	2	2	320	2	0,201
38	2	3	320	2	0,309
39	2	4	320	2	0,376
40	2	2	420	2	0,215
41	2	3	420	2	0,325
42	2	4	420	2	0,353
43	2	2	520	2	0,259
44	2	3	520	2	0,350
45	2	4	520	2	0,332
46	2	2	320	4	0,256
47	2	3	320	4	0,350
48	2	4	320	4	0,351
49	2	2	420	4	0,306
50	2	3	420	4	0,441
51	2	4	420	4	0,463
52	2	2	520	4	0,450
53	2	3	520	4	0,461
54	2	4	520	4	0,475

Tabla 3. Diseño experimental ultrasonido para Limoncillo.

#	BLOQUE	°C	min	%	%E
1	1	40	45	8	1,428
2	1	30	30	6	1,239
3	1	50	30	10	0,921
4	1	50	60	10	0,924
5	1	50	60	6	1,283
6	1	50	30	6	1,278
7	1	30	60	10	0,994
8	1	30	30	10	0,932
9	1	40	45	8	1,420
10	1	30	60	6	1,018
11	2	22	45	8	1,217
12	2	40	72	8	0,802
13	2	40	18	8	1,145
14	2	40	45	4	1,021
15	2	40	45	11	0,056
16	2	58	45	8	0,936
17	2	40	45	8	1,426
18	2	40	45	8	1,422

Tabla 4. Diseño experimental ultrasonido para Cáscara de naranja.

#	BLOQUE	%	°C	min	%E
1	1	20	40	40	1,298
2	1	10	50	20	1,252
3	1	20	40	40	1,259
4	1	30	50	60	1,243
5	1	30	30	20	1,132
6	1	10	30	60	1,154
7	1	10	50	60	1,268
8	1	10	30	20	1,194
9	1	30	50	20	1,158
10	1	30	30	60	1,121
11	2	2	40	40	1,258
12	2	20	40	40	1,272
13	2	20	22	40	1,060
14	2	20	40	4	1,316
15	2	20	40	40	1,299
16	2	20	40	76	1,113
17	2	38	40	40	1,089
18	2	20	58	40	1,299

ANEXO 3.

Valores en los puntos de optimización de los diseños experimentales.

Material vegetal	Hd	US
	0,897	1,350
limoncillo	0,942	1,380
	0,901	1,400
Cáscara de	0,600	1,270
naranja	0,568	1,300
	0,591	1,290