

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



“EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LA CÁSCARA DE NARANJA DULCE
(*Citrus Sinensis*. L Osbeck) MEDIANTE PULSOS DE VAPOR”

TESIS PRESENTADO POR:

Bachiller: MAYO SOLIS, Esther

Bachiller: DIAZ AGUERO, Giohanny Mitchel

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ASESOR: Ingeniero: FLORES ARIZACA, Jesús
Manuel

PUERTO MALDONADO-2022

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
FACULTA DE INGENIERIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



“EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LA CÁSCARA DE NARANJA DULCE
(*Citrus Sinensis*. L Osbeck) MEDIANTE PULSOS DE VAPOR”

TESIS PRESENTADO POR:

Bachiller: MAYO SOLIS, Esther

Bachiller: DIAZ AGUERO, Giohanny Mitchel

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ASESOR: Ingeniero: FLORES ARIZACA, Jesús
Manuel

PUERTO MALDONADO-2022

DEDICATORIA

Esther Mayo Solís

Un agradecimiento profundo a Dios por haberme permitido terminar exitosamente mi carrera, por dotarme de sabiduría y brindarme salud.

A mis tan apreciados padres, Victoria Solís de Mayo y Demetrio Mayo Turpo, por siempre estar para mí brindándome su apoyo desinteresado.

A mis hermanas, Raquel Mayo, Claudia Mayo y Jesica Mayo, por ser mi compañía y por alentarme a no desistir para continuar cuando creía no poder. Me brindaron todo lo que necesite, sembraron en mí valores, principios que hoy en día me caracterizan como la persona soy.

Mitchel G. Díaz Aguero

A mi madre Lucila Aguero Cárdenas por su amor y apoyo incondicional que desde niño me brindo, por enseñarme a ser responsable y por sembrar en mí el deseo de superación, por ser mi motivación para culminar con éxito todos mis objetivos propuestos.

A Dios, por haberme brindado a la mejor madre y a los mejores hermanos que uno puede tener.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sentimiento de gratitud.

A Dios por bendecirme día a día y por permitirme lograr todos mis objetivos propuestos.

A mi tan querida UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS por haberme albergado en sus aulas durante los cinco años de formación profesional.

A mi asesor de tesis Ingeniero Jesús Manuel Flores Arizaca, por sus conocimientos y experiencias compartidas, por la paciencia demostrada durante todo el proceso de asesoramiento, por la motivación y constante apoyo brindado.

A todas personas que confiaron en mí y que de alguna forma contribuyeron a que culmine con éxito la realización de la presente tesis.

TURNITIN_ESTHER MAYO Y MITCHEL DIAZ

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unamad.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.usil.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	www.ictsl.net Fuente de Internet	<1%
9	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%

INTRODUCCIÓN

La naranja dulce forma parte de la familia de las Rutáceas, familia que está compuesta por aproximadamente unas 1700 especies de plantas que suelen crecer en países que poseen clima cálido y templado, siendo el continente africano quien alberga un mayor número de estas especies.

Para fines de la presente tesis, como materia prima se eligió al *C. sinensis* L Osbeck, ello para incrementar la producción de naranja en la región de “Madre de Dios” (DRA, 2020), la misma que podría convertirse en una fuente importante de biocomponentes. Yáñez et al., (2007) refieren que, del fruto de la naranja no solo se debe aprovechar los jugos alimenticios, ya que su cascara también puede ser aprovechado para la obtención de aceites esenciales como aromatizantes en distintas industrias de alimento, en la perfumería, en la agronomía como fitobiocida y la farmacéutica.

Los principales componentes químicos presentes en los aceites esenciales del *C. sinensis*, son limoneno, terpineno. Extraídos principalmente mediante métodos solvente orgánico, hidrodestilación, extracción en corriente de vapor con rendimientos de 0,26% y 0,32%.

La presente investigación se estructura en cinco capítulos:

Capítulo I, que describe el problema abordado en la investigación, en ella explicamos cuán importancia tienen los aceites esenciales de cítricos en las industrias químicas, especialmente su actividad antioxidante en el área de alimentos, cómo están compuestos y los métodos empleados para su obtención.

Capítulo II, que detalla los diferentes estudios de nivel internacional, nacional y local que se tomaron en cuenta como antecedentes de la investigación. Asimismo, se detalla las bases teóricas de la investigación y se define los términos considerados más importantes para su mejor comprensión.

Capítulo III, que detalla la metodología de investigación empleada; donde se describe a qué tipo de estudio pertenece la investigación llevada a cabo, el

diseño de estudio empleado, como está constituido la población y muestra de estudio, los métodos y técnicas empleadas para el recojo de datos.

Capítulo IV, se expone los resultados de la investigación llevada a cabo, ello por medio de tablas y gráficos que ayudan a que los resultados logrados se interpreten de mejor forma.

Capítulo V, se da a conocer las conclusiones obtenidas producto del desarrollo de la investigación llevada a cabo y las recomendaciones para mejorar las falencias encontradas.

INDICE

CAPITULO I. PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	1
1.1. Descripción del problema.....	1
1.2. Formulación del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.4. Variables e indicadores.....	3
1.4.1. Variables independientes.....	3
1.4.2. Variables dependientes.....	3
1.5. Operacionalización de variables.....	4
1.6. Hipótesis.....	4
1.7. Justificación.....	5
1.8. Consideraciones éticas.....	5
CAPITULO II. MARCO TEORICO.....	6
2.1. Antecedentes de estudios realizados.....	6
2.2. Marco teórico.....	8
2.2.1. Naranja dulce (<i>Citrus Sinensis</i>).....	8
2.2.1.2. Las variedades de naranja dulce.....	10
2.2.1.6. Propiedades físico-químicas del aceite esencial.....	12
2.2.1.7. Composición química del aceite esencial.....	12
2.2.1.8. Usos y aplicaciones industriales.....	14
2.2.1.9. Factores que afectan el rendimiento de los aceites.....	14
2.2.2. Métodos de extracción.....	16
2.2.3. Metodología de análisis.....	17
2.2.3.1. Rendimiento del aceite esencial.....	17
2.2.3.2. Propiedades de Actividad antioxidante.....	17
2.2.3.3. Cromatografía de gases unido a un espectrómetro de masas.....	20
2.3. Definición de términos.....	22
CAPITULO III. METODOLOGIA DE INVESTIGACION.....	23
3.1. Tipo de estudio.....	23
3.2. Diseño de estudio.....	23
3.3. Población y muestra.....	23

3.3.1. Población	23
3.3.2. Muestra	23
3.4. Métodos y técnicas	23
3.4.1. Materiales, equipos y reactivos	23
3.5. Metodología	27
3.5.1. Materia prima y su pre-tratamiento	27
3.5.2. Extracción de aceite esencial por método Clevenger	31
3.5.3. Extracción del aceite esencial por pulsos de vapor	32
3.5.4. Análisis de los aceites esenciales por CG-MS	35
3.5.5. Evaluación de Análisis de actividad antioxidantes	36
3.5.6. Análisis físico- químico.	37
3.5.7. Metodología para determinar el rendimiento	38
3.5.8. Modelamiento por superficie respuesta.	38
CAPITULO IV. RESULTADO DE IVESTIGACION	40
4.1. Extracción de los Aceites Esenciales - Método Clevenger	40
4.2. Extracción de aceite esencial por el método Pulsos de Vapor	42
4.2.1. Efecto del análisis de varianza para rendimiento.	45
4.2.2. Modelo matemático de superficie respuesta	46
4.2.3. Efectos de estimación de resultados en el rendimiento.	47
4.2.4. Optimización	47
4.3. Perfiles cromatográficos de los Aceites Esenciales	52
4.4. Análisis de actividad antioxidante	54
4.4.1. Efecto de análisis de varianza de antioxidantes	55
4.4.2. Efecto de Coeficientes de regresión para antioxidantes	56
4.4.3. Coeficientes en términos codificados	57
4.4.4. Efectos de estimación de resultados de antioxidante	57
4.4.5. Efecto de optimización de respuesta	58
4.5. Características fisicoquímicas	63
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalizacion de variables.	4
Tabla 2. Componentes quimicos de cascara de naranja	11
Tabla 3. Variables independientes codificadas y no codificadas.	39
Tabla 4. Extraccion de aceites esenciales por metodo CLEVINGER.	41
Tabla 5. Identificacion de CG-MS de los principales componentes. Metodo Clevenger	42
Tabla 6. Porcentaje de rendimiento de aceite esencial.....	44
Tabla 7. Analisis de varianza para rendimiento de extraccion de A.E	45
Tabla 8. Coeficiente de regresion para rendimiento	46
Tabla 9. Datos de estimacion de resultados en el rendimiento.....	47
Tabla 10. Optimizacion de respuesta.....	47
Tabla 11. Principales componentes quimicos del A.E.	52
Tabla 12. Resultado de absorcion del aceite extraido por metodo pulsos de vapor	54
Tabla 13. Analisis de varianza para actividad antioxidante.....	55
Tabla 14. Coeficiente de regresion para antioxidantes.	56
Tabla 15. Coeficientes en terminos codificados.....	57
Tabla 16. Estimacion de resultados de antioxidantes	57
Tabla 17. Optimizacion de actividad antioxidante.	58
Tabla 18. Densidades de aceite esencial extraido de cascara de naranja.	63
Tabla 19. Determinacion de indice de refraccion de A.E.	64

INDICE DE FIGURA

figura 1.	Anatomia de naranja.	10
figura 2.	Frutos y cascara de naranja	28
figura 3.	Cascara de naranja fresco	28
figura 4.	Deshidratado de cascara de naranja.....	29
figura 5.	Cortado de cascara deshidratada.....	29
figura 6.	Pesado de cascara deshidratada	30
figura 7.	Flujograma de acondicionamiento de la cascara de C. sinensis.....	30
figura 8.	Esquema del metodo de extraccion CLEVANGER	32
figura 9.	Esquema de extraccion , equipo PULSOS DE VAPOR	32
figura 10.	Equipo de extraccion de aceite esencial	33
figura 11.	Separacion Aceite - Agua.....	34
figura 12.	Almacenamiento de aceite - frascos acaramelados	34
figura 13.	Flujograma para la obtension de A.E	35
figura 14.	Curva de calibracion estandar trolox	37
figura 15.	Cromatografia de Gases de aceite esencial - metodo CLEVANGER.....	41
figura 16.	Grafica de % rendimiento de aceites esenciales	44
figura 17.	Diagrama de pareto para rendimiento	48
figura 18.	Grafica de efectos principales: temperatura, tiempo y pulsos Vs Rendimiento	48
figura 19.	Grafica de interaccion para rendimiento(A: temperatura; B: tiempo; C: pulsos.	49
figura 20.	Grafica de normalidad en el rendimiento.....	50
figura 21.	Grafica de parcela residual Vs predicho.....	50
figura 22.	Grafica de superficie respuesta.....	51
figura 23.	Grafica de pareto para actividad antioxidante.	58
figura 24.	Grafica de efectos principales	59
figura 25.	Grafica de interaccion para actividad antioxidante	59
figura 26.	Grafica de probabilidades de normalidad de antioxidantes	60
figura 27.	Grafica de contornos de superficie respuesta	61
figura 28.	Grafica de parcela residual de antioxidantes.....	61
figura 29.	Grafica de estimacion de superficie respuesta.....	62

CAPITULO I. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Descripción del problema.

El desconocimiento del comportamiento del proceso de extracción de aceites esenciales por pulsos de vapor (PSE) limita establecer las condiciones óptimas para su funcionamiento, así como realizar el escalamiento de una a escala banco a otro industrial, así como pasar de un proceso discontinuo a otro continuo. Así mismo, las condiciones de funcionamiento con distintas matrices vegetales que difieren en sus propiedades morfológicas, mecánicas, partes de las plantas como hojas, tallos, cortezas, semillas, influyen en la calidad y rendimiento en aceite extraído.

A nivel del hemisferio sur, el Perú viene ocupando el cuarto lugar como productor de cítricos, ello después de países como Brasil, Sudáfrica y Argentina. De toda la producción de cítricos en nuestro país, el 90% es consumido en el mercado nacional y solo el 10% es exportado (DRA, 2020). En el año 2014, la producción nacional de refrescos, néctares y jugos de cítricos logró un crecimiento de 375,800 toneladas métricas (Pérez Cacho, 2008). Desde años atrás, en nuestro país se ha percibido un crecimiento de los negocios dedicadas a la producción y venta de jugos, quienes suelen generar residuos orgánicos como flavedos (cáscaras) que por lo general son desechados y no aprovechados para extraer aceites esenciales, retos que se deben abordar.

El proceso PSE se asemeja al proceso convencional de extracción en corriente de vapor (SD) o arrastre de vapor en el hecho que ambos utilizan corrientes de vapor para facilitar el cambio de fase de los componentes volátiles contenidos en la matriz vegetal, pero se aleja de ella, por las frecuencias de pulsos termo-mecánicos que el flujo de vapor ejerce sobre la matriz vegetal, y los efectos termodinámicos de Joule-Thomson; por tanto, el diseño de estos equipos tendrán un fundamento dinámico y termodinámico distinta al SD. (Guzmán Campos, 2015) Se tiene muy

limitada información de estos mecanismos de calentamiento y enfriamiento súbitos ocurridos a nivel microscópico en la matriz vegetal, y el abordaje teórico - experimental abrirá puertas para optimizar el funcionamiento y diversificación de esta aplicación a distintos tipos de plantas aromáticas, siendo considerados procesos intensificados y ecológicos por el uso de agua como fuente de extracción y no solventes orgánicos nocivos a nuestro medio natural y la salud de las personas. Por las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales y su susceptibilidad molecular por efectos hidrolíticos, oxidativos, térmicos y foto catalíticos, la academia y la industria farmacológica, de los perfumes y la cosmética, desarrollan distintas modificaciones a los procesos convencionales de SD e hidrodestilación (HD) con el objetivo de reducir estos efectos. En el proceso PSE, por ser isoentálpico es una alternativa prometedora, pero el conocimiento del efecto de las condiciones de operación respecto a rendimientos, calidad de los aceites extraídos es muy escasa, por tanto, el trabajo de investigación tratará de responder a la siguiente interrogante.

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la relación que se presenta entre las condiciones operativas de extracción de aceites esenciales contenidas en la cáscara de naranja dulce (*C. Sinensis* L. Osbeck) por pulsos de vapor con la variación de la actividad antioxidante, rendimiento y propiedades físicas del aceite aislado?

1.3. Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar el efecto de las condiciones de extracción de aceites esenciales contenidas en la cáscara de naranja dulce (*C. Sinensis* L. Osbeck) por pulsos de vapor en la variación de la actividad antioxidante, rendimiento y propiedades físicas del aceite aislado

Objetivo específico:

- Establecer la relación cuantitativa entre las condiciones de operación del proceso de extracción de aceite esencial por pulsos de vapor con la actividad antioxidante, rendimiento y propiedades físicas del aceite esencial aislado de la cáscara de naranja dulce (*C. sinensis* L. Osbeck), utilizando la metodología de superficie respuesta.
- Evaluar la capacidad antioxidante y determinar el perfil de terpenos y terpenoides contenidos en los aceites esenciales obtenidos, comparándolos con extracción en el equipo Clevenger.

1.4. Variables e indicadores.

1.4.1. Variables independientes

- ✓ Número de pulsos de vapor (puls);
- ✓ Tiempo total de calentamiento(min);
- ✓ Temperatura en la cámara de extracción(°C);

1.4.2. Variables dependientes.

- ✓ Actividad antioxidante del aceite aislado (Trolox CI 50 mg/100 mL)
- ✓ Rendimiento en aceite aislado (g aceite esencial/100g)
- ✓ Propiedades físicas del aceite aislado:
 - Índice de refracción (n_d^{20})
 - Densidad (Kg/m³)

1.5. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables.

<i>Variables</i>	<i>Indicadores</i> Variables Independientes
<i>Condiciones de operación</i>	<p>Z_1: Temperatura en la cámara de extracción (°C)</p> <p>Z_2: Tiempo total de calentamiento(min)</p> <p>Z_3: Numero de pulsos de vapor(puls)</p>
<i>Componentes</i>	<p style="text-align: center;">Variables dependientes</p> <p>Y_1: Actividad antioxidante (Trolox CI 50 mg/100 mL)</p> <p>Y_2: Rendimiento (g aceite esencial/100g)</p> <p>Y_3: Propiedades físicas.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Índice de refracción ● Densidad

1.6. Hipótesis.

H_0 . A condiciones operativas optimas del proceso de extracción de aceite esencial de cascara de naranja dulce por pulsos de vapor, se obtiene un máximo rendimiento, una mínima reducción de la capacidad antioxidante del aceite esencial obtenido y propiedades físicas similares a los obtenidos por el método estándar CLEVINGER.

H_1 . A condiciones operativas distintas a las óptimas en el proceso de extracción de aceite esencial de cascara de naranja dulce por pulsos de vapor, se reduce el rendimiento y la capacidad antioxidante del aceite esencial extraído, pero las propiedades físicas del aceite permanecen similares respecto a los obtenidos por el método estándar CLEVINGER.

1.7. Justificación.

Los cítricos de la familia Rutaceae se encuentran entre las especies de cultivos frutales más cultivadas y disponibles a nivel mundial en todo el mundo por su sabor, color y beneficios para la salud distintivos. (Pérez Cacho, 2008). Botánicamente, estas frutas pertenecen a la categoría hesperidium, una baya con una cáscara aromática y correosa (exocarpio o cáscara) endocarpio interior carnoso. (Bashira F, 2018). La naranja dulce (*C. Sinensis* L.) constituye el cultivo frutal más dominante de la familia Rutaceae con una producción aproximada de 72000 millones de kilogramos (Sprenab H, Zhifeng, Fernandes, & Zanslerb L., 2020) cuya mayor parte va a las unidades de procesamiento de jugos, que a su vez genera 25 -30 millones de toneladas de residuos de piel. (Sprenab H et al., 2020) Los residuos de piel de naranja se han valorizado con frecuencia en etanol, ácido cítrico, ácido succínico, biocarbón, bioadsorbente y biogás. El último uso, pero más frecuente, es decir, la producción de biogás a menudo requiere un tratamiento previo para eliminar el D-limoneno.5,6 Además, una amplia gama de sustancias volátiles (linalol, geraniol, carvol, nerol y mentol) y no volátiles (beta caroteno, vitamina C, quercetina, hesperidina, ácido cafeico, ferúlico y clorogénico) compuestos bioactivos de alto potencial farmacéutico se han aislado de los desechos de cáscara de naranja.(Kusuma & Mahfud, 2018), y la extracción de aceites esenciales a partir de la cascara de naranja suelen emplearse como saborizantes. Otros de los productos que se obtiene a partir de la cascara de la naranja, son las cortezas caramelizadas, las pectinas y productos para alimentar ganados.

Los aceites esenciales son productos naturales y suelen caracterizarse por poseer un fuerte olor. (Franco Torres, 2015).

Con la investigación se busca darle un uso útil a la cascara de la naranja que hoy en día por desconocimiento se desecha y no se aprovecha. Se busca obtener aceite esencial para emplearlo en la agroindustria.

1.8. Consideraciones éticas

Durante todo el proceso de la investigación se tomó en consideración los aspectos éticos involucrados en la investigación científica, de tal forma que el proceso de obtención de rendimiento fue realizado en óptimas condiciones respetando en todo momento las normas de higiene (BPM)

CAPITULO II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de estudios realizados

Es muy limitada la información respecto al método de extracción de aceites esenciales por pulsos de vapor, por consiguiente, los antecedentes y el marco teórico estará basada en los procesos de extracción de aceite esencial en corriente de vapor, siendo esta similar al método utilizado en la tesis.

(Borja Espín & Delgado Güiz, 2018) realizaron la investigación titulada “**Evaluación del rendimiento, calidad y actividad antioxidante del aceite esencial de cáscara de naranja fresca de la especie (*Citrus Maxima (Burm.) Merr. Familia Rutaceae, obtenido por dos métodos de extracción*”**, donde su objetivo fue optimizar de forma eficiente el uso de la cascara de naranja. Asimismo, los métodos de extracción empleados fueron destilación por arrastre de vapor con y sin solvente orgánico y expresión en frio, realizado en 2 fases. En la primera fase, se llevó a cabo la caracterización del aceite por medio de cualidades organolépticas (olor, textura, color) y análisis fisicoquímicos (rotación óptica, índice de peróxidos, índice de refracción, densidad) y caracterización en CG - EM. En la segunda fase, se procedió a realizar un análisis de la actividad antioxidante a través del método radical DPPH.

Asimismo, se observó un mayor rendimiento a través del método de expresión en frio empleado. Por otra parte, los componentes más predominantes fueron: el linalol, α - Pineno, β - Mirceno, limoneno, siendo éstos los monoterpenos más representativos en el aceite que se obtuvo.

(Meza Ipanaqué, 2017) realizó la investigación titulada “**Extracción y evaluación del aceite esencial de las cáscaras de la naranja dulce (*C. Sinensis*)**”, evaluó las propiedades físicas y químicas que posee el aceite esencial obtenido a partir de la cascara de naranja dulce; asimismo, se caracterizó sus fracciones empleando

cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Producto de la caracterización de los componentes de la cascara de naranja, se evidenció que la fracción que más predomina en el aceite esencial extraído es el D-limoneno, concluyéndose con ello que, el aceite esencial que se extrae a partir de la cáscara de naranja es una fuente principal de D-limoneno.

(Valdez Jimenes, 2017) realizó la investigación titulada “**Optimización del rendimiento y determinación del contenido de limoneno del aceite esencial de flavedo de mandarina**”, basó su objetivo en optimizar el rendimiento del aceite esencial obtenido a partir de la cascara (flavedo) de mandarina a través de la aplicación de ciertos parámetros en su proceso de extracción para la obtención de un mayor contenido de limoneno. Las conclusiones de la investigación muestran que, a través del empleo del método de superficie respuesta se optimizó el rendimiento de extracción del aceite esencial que se obtiene de la cascara de mandarina, y que el principal componente del aceite esencial obtenido de la cáscara de mandarina es el limoneno. Asimismo, se pudo obtener una mayor cantidad de aceite esencial de cáscara de mandarina durante el periodo de extracción no estacionario.

(Martínez Useche, 2015) realizó la investigación titulada “**Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis L***”, centro su objetivo en evaluar la composición química, las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial extraído de la especie vegetal *Citrus sinensis L*, obtenido por medio del proceso de hidrodestilación convencional e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas. Asimismo, comparó los dos métodos de extracción que empleó. Los resultados de la investigación llevada a cabo muestran que, se logró obtener un mayor volumen de aceite esencial a través del empleo del método de hidrodestilación asistida por microondas. Finalmente, el autor concluye que, la rendición del aceite esencial de *Citrus sinensis L*. depende del método de extracción empleado para obtenerlo.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Naranja dulce (*Citrus Sinensis*)

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae, se encuentran entre las especies de cultivos de frutas más cultivadas y disponibles a nivel mundial en todo el mundo por su sabor, color y beneficios para la salud distintivos. (Perez C., 2008) Botánicamente, estas frutas pertenecen a la categoría hesperidium, una baya con un cuero y corteza aromática (exocarpio o cáscara) y endocarpio interior carnoso (Bashira F, 2018).

La naranja dulce (*C. Sinensis* L. Osbeck) constituye el cultivo de frutas más dominante de la familia Rutaceae con una producción aproximada de 72 millones de toneladas (Spreenab H et al., 2020), cuya mayor parte se destina a las unidades de procesamiento de jugos, que a su vez generan entre 25 y 30 millones de toneladas de residuos de piel.

(Spreenab H et al., 2020). Además, se ha desarrollado una amplia gama de compuestos bioactivos volátiles (linalol, geraniol, carvol, nerol y mentol) y no volátiles (beta caroteno, vitamina C, quercetina, hesperidina, ácido cafeico, ferúlico y clorogénico) de alto potencial farmacéutico. Aislado de residuos de piel de naranja. (Kusuma & Mahfud, 2018)

La naranja dulce es un hesperidio, representa un tipo de baya modificada. Está compuesto de diversos carpelos o gajos que son fáciles de poder separar. Cada carpelo suele contener una pulpa cuyo color varía entre anaranjado y rojo, dicha pulpa contiene bastante jugo; posee semillas y varias células que están cubiertas por cáscara de color anaranjado cuyo interior es blanco. Dicha cáscara suele contener un gran número de glándulas que están llenas de aceites esenciales (Quiroz Valle, 2009).

Descripción botánica

Los frutos de la naranja en un inicio suelen poseer una forma esférica, pero cuando son recolectados por lo general adquieren una forma ovalada, ello como resultado de la elongación de su epidermis en las proximidades del pedúnculo.

Cada fruto tiene un peso aproximado de 170 gramos; su corteza es de color naranja, es firme y muy resistente, tiene un espesor aproximado de 4 milímetros, lo

cual suele protegerle de posibles golpes a los que está expuesto cuando es manipulado. Su pulpa posee bastante zumo y algunas semillas (Guzmán Campos, 2015).

Clasificación Taxonómica de la naranja

Según (Rocha Peña & Padrón Chávez, 2009).

“Nombre científico: *Citrus Sinensis*. L Osbeck;

Reino: Plantae,;

División: Magnoliophyta;

Clase: Magnoliopsida;

Subclase: Rosidae;

Orden: Sapindales;

Familia: Rutaceae;

Subfamilia: Citroideae;

Tribu: Citreae;

Género: Citrus”

Nombre común:

Dulce, Naranja, Naranja dulce.

2.2.1.1. Anatomía de la naranja. Suele presentar características únicas, que la hacen ideal para ser empleado en la dieta de las personas. A continuación, se expone los componentes de la naranja:

- ✓ **Cáscara o piel.** De acuerdo a lo señalado por (Hernández Donis, 2010), su corteza de la naranja se encuentra compuesto por alpha pineno, citronelal, citral y limoneno. En su cascara se diferencia dos zonas: una interna, de color blanco y esponjoso (el albedo) y otra externa medio coloreada y compacta (el Flavedo) (Hernández Donis, 2010).
- ✓ **Flavedo.** Es el tejido exterior de la naranja, conocido comúnmente como cáscara, en él hay una gran cantidad de vesículas que contienen cromoplastos, aceites esenciales y lípidos. Se encuentra formado por el

epicarpio y la hipodermis. Lo más visible en el flavedo son las glándulas de aceite que posee en su superficie, las cuales tienen forma de puntos redondos, de color oscuro y se encuentran medio hundidos (Meza Ipanaqué, 2017)

- ✓ **Albedo.** Es el tejido interno de la naranja, es de color blanco y medio esponjoso. Se encuentra compuesto por células de pared delgada. Sus tejidos se extienden hacia la parte interna de la naranja y llegan a formar los tabiques que suelen separar los gajos de la fruta, uniéndose en la parte central de la naranja con el eje vascular (Ruiz Garay & Saavedra Rotta, 2007)

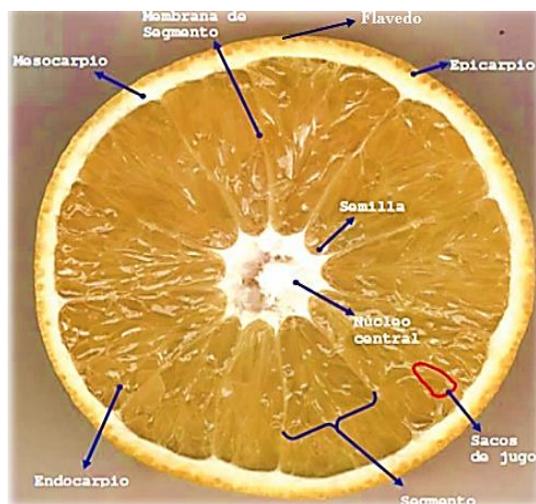


figura 1. Anatomía de naranja. (Pérez C., 2008)

2.2.1.2. Las variedades de naranja dulce

De acuerdo a (Guzmán Campos, 2015) las denominadas naranjas dulces se suelen dividir en tres variedades:

- **Naranjas comunes:** Conforman el grupo de naranjas que son más comercializados, su producción llega a representar el 60% de la producción mundial y sus características suelen variar de acuerdo al lugar en donde se cultivan.
- **Naranjas de “ombigo” o de “nebo”:** Denominada así por la forma redonda que sobresale en su parte inferior. Este tipo de naranja resulta fácil de pelar, no posee semillas y tiene un aroma y sabor agradable.

- **Naranjas sanguíneas:** Poseen pigmentos de color rojo que suelen aportar colores rojizos a la corteza y pulpa de la naranja. Por lo general, dicho color no suele desarrollarse en climas que son cálidos.

2.2.1.3. Importancia de la naranja dulce. De los cítricos como es el caso de las naranjas dulces, no solo se suele aprovechar los jugos alimenticios, sino también, los aceites que pueden ser obtenidos a partir de su cáscara para ser usados como aromatizantes en un gran número de industrias. El aceite esencial que es extraído de la cáscara de la naranja representa un ingrediente básico empleado en las industrias farmacéuticas, agronómicas, de alimentos y perfumerías (Díaz Merchán & María Ávila, 2002).

Tabla 2. Componentes químicos de cascara de naranja

Componentes	Porcentaje(%)
<i>Humedad</i>	<i>78</i>
<i>Acido libre</i>	<i>0,12</i>
<i>Glucosa</i>	<i>7,35</i>
<i>Sacarosa</i>	<i>2,25</i>
<i>Lípidos</i>	<i>0,42</i>
<i>Proteínas</i>	<i>1,24</i>
<i>Ceulosa</i>	<i>1,84</i>
<i>Cenizas</i>	<i>0,5</i>

Fuente:(Díaz Merchán & María Ávila, 2002)

2.2.1.4. Aceites esenciales.

Son componentes volátiles que se concentran en la cáscara de naranja. Los aceites esenciales que son extraídos de la cascara de la naranja no son oleosos, y su extracción puede llevarse a cabo de forma fácil a través del proceso de destilación y por maceración, empleando para ello el solvente adecuado: agua, aceite, alcohol (Cedeño Sares & Pizarro Carrión, 2015).

2.2.1.5. Propiedades del aceite esencial

Toda materia posee la capacidad de reaccionar frente a cambios que pueden realizarse sobre ella. A los cambios que puede experimentar una materia se le conoce como una propiedad (Mérida Cano, 2011).

a) Propiedades físicas: El aceite esencial extraído de la cáscara de las naranjas es volátil y líquido a temperatura ambiente. Cuando recién es destilado no suele presentar mucho color. No puede ser disuelto en agua, en éteres, en alcoholes, y en disolventes orgánicos tradicionales puesto que es liposoluble. (Mérida Cano, 2011)

b) Propiedades químicas: Hoy en día, se conoce aproximadamente más de doscientos tipos de aceite esencial de gran valor comercial, identificándose en ellos cerca de cuatrocientos componentes químicos. Casi la totalidad de dichos componentes se pueden clasificar en dos grupos, los cuales se caracterizan por poseer orígenes biogenéticos diferentes: el grupo de los compuestos aromáticos que se derivan del fenilpropano y el grupo de los terpenoides. (Mérida Cano, 2011)

2.2.1.6. Propiedades físico-químicas del aceite esencial

Por lo general, todo aceite esencial es líquido a temperatura ambiente. Su característica volátil o capacidad que tiene el aceite esencial para evaporarse cuando entra en contacto con el aire, es lo que le diferencia del aceite fijo. (Pauli, 2001)

La densidad del aceite esencial suele variar de 0,8-1,2 g/ml, la gran mayoría de los aceites esenciales suelen ser menos densa que el agua (López de la cruz & Caso Orihuela, 2015).

El índice de refracción representa una medida propia de todo aceite esencial. Si se mezcla un aceite con algún diluyente u otra sustancia, su índice de refracción por lo general cambia. Entonces, el índice de refracción suele servir para conocer la pureza de los aceites esenciales. Para calcular el índice de refracción de un aceite esencial se puede emplear un refractómetro (Franco Torres, 2015). Generalmente, todo aceite esencial posee un elevado índice de refracción, cuyo promedio oscila entre 1,47-20°C.

2.2.1.7. Composición química del aceite esencial

El aceite esencial es por lo general una mezcla compleja de componentes variables que casi exclusivamente suelen pertenecer al grupo de los terpenos y, en menor porcentaje, al grupo de los compuestos aromáticos que se derivan del fenilpropano (safrol, aldehído anísico, anetol, eugenol, aldehído cinámico, etc.).

También, es un compuesto químico que como componente básico posee oxígeno, carbono e hidrogeno (L. M. Yáñez Rueda & Parada Parada, 2005).

- **Fracción volátil:** aceite esencial que está compuesto por el 90-95% del aceite en peso, que contiene los hidrocarburos monoterpenos y sesquiterpénicos, así como sus derivados oxigenados junto con aldehídos, alcoholes y ésteres alifáticos.
- **Residuo no volátil:** que suele comprender del 1 - 10% del aceite, contiene flavonoides, ceras, carotenoides, esteroides, ácidos grasos e hidrocarburos.

Algunos de los aceites esenciales son casi monomoleculares, puesto que suelen poseer un solo componente molecular, mientras que otros poseen de 2 a 3 componentes moleculares. Sin embargo, gran parte de los aceites esenciales son polimoleculares, ya que suelen contener de 3 a 4 moléculas mayoritarias, un determinado número de moléculas minoritarias y, en algunos casos, centenares de moléculas distintas que por lo general solo se encuentran presentes en trazas. (López Luengo, 2004).

Por lo general, los aceites esenciales que se extrae de la cáscara de naranja se encuentran conformados por fracciones de compuestos oxigenados (CO), sesquiterpenos (S) y monoterpenos (M) (Lopez Luengo, 2004).

Los compuestos oxigenados contribuyen en mayor porcentaje en el sabor y olor particular que posee un aceite esencial. No obstante, los sesquiterpenos y monoterpenos también suelen contribuir, pero en un menor porcentaje. (Aguilera Ochoa, 2015).

El aceite esencial es fotosensible y además es muy susceptible a la biodegradación (Cedeño Sares & Pizarro Carrión, 2015).

Hidrocarburos Monoterpénico.

Vienen a ser los principales compuestos que conforman a todo aceite esencial, inclusive pueden ser terpenos oxidados. Dichos hidrocarburos monoterpénicos suelen nominarse acabando en – eno (Osorio Fortich, 2015).

2.2.1.8. Usos y aplicaciones industriales

✓ Farmacológicas

El aceite esencial suele emplearse en la industria farmacéutica para obtener diferentes principios activos (eugenol, anetol) o como excipiente o aromatizante en la elaboración de jarabes, elixires, suspensiones, etc. (López Luengo, 2004).

✓ Cosméticas

El aceite esencial suele emplearse con gran amplitud en la industria cosmética y de la perfumería, ello generalmente por sus cualidades olfativas que posee. En la industria del perfume suele ser empleado como fragancia para detergentes de ropa, como perfume para aguas de colonia, etc. De igual forma, en la industria cosmética, suele ser empleado como aromatizante en una variedad de preparaciones cosméticas que se realiza (López Luengo, 2004).

✓ Aroma terapéuticas.

El aceite esencial es empleado en la medicina natural, se suele aprovechar sus propiedades que posee para mejorar el bienestar psicológico o físico de las personas. (López Luengo, 2004)

✓ Industria alimentaria.

El aceite esencial suele ser empleado en la preparación de un gran número de bebidas y alimentos, ello como aditivos naturales (conservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes) (López Luengo, 2004).

2.2.1.9. Factores que afectan el rendimiento de los aceites

De acuerdo a Lossi Nisthal, (2012), dentro de los factores que suelen intervenir de forma directa en el rendimiento de obtención de todo aceite esencial, se tiene:

- **El tipo de materia prima que se usa:** hace referencia a las características genéticas de la planta, puesto que suele existir diferencias. La época y el lugar en donde se produce la naranja, la

edad o el grado de maduración de la planta, de sus hojas y la limpieza del fruto al momento del corte, etc. suelen influir en la materia prima y su rendición en la obtención del aceite esencial.

- **El tiempo de secado:** En función del tiempo de secado la planta posee mayor o menor porcentaje de agua, lo cual suele influir en su rendimiento de producción.
- **El tamaño de partícula:** El área de transferencia y el número de compartimientos abiertos suelen depender del tamaño de partícula, así como el flujo de vapor en los métodos que utilizan arrastre con vapor. Con frecuencia, todo aceite esencial crudo es rectificado para quitar los constituyentes no deseados. El aceite esencial se suele destilar al vacío a fin de evitar su degradación.

El aceite esencial crudo se encuentra sometido a tres peligros: el calor, la luz y el aire.

- **El tiempo de extracción:** Hace referencia al tiempo que dura en ser el aceite extraído.
- **El método de extracción:** Hace referencia al tipo de método que se emplea para poder extraer el aceite. Dentro de los métodos que por lo general se emplea, tenemos: el enflorado, la destilación por arrastre de vapor, la hidrodestilación, etc.
- **Las características del equipo de extracción:** De acuerdo a su dimensión, el tamaño de los equipos que generalmente se emplea para extraer el aceite esencial, puede ser: industrial, piloto o a escala laboratorio. El material que se emplee para su construcción suele depender de la dimensión del trabajo, pudiendo ser: acero o cobre para los casos de nivel industrial o piloto, y de vidrio para el caso de escala de laboratorio.
- **Las características de los flujos:** Hace referencia al volumen de materia prima que se emplea, a la pureza y volumen de los disolventes utilizados, al volumen de vapor o agua que se emplea, su presión y temperatura.
- **El tratamiento del aceite esencial crudo:** Todo aceite esencial cuando está en su estado crudo por lo general contiene impurezas suspendidas que suelen degradar su calidad. Esta impureza suele

afectar el almacenamiento, la calidad del aceite y suele acelerar su polimerización.

2.2.2. Métodos de extracción

✓ Destilación por arrastre de vapor

Representa el método más empleado para extraer los aceites esenciales, ello en virtud de que es menos costoso y puede emplearse una gran variedad de solventes. Se puede destilar empleando hexano, éter, etanol, metanol, agua, etc. (Franco Torres, 2015)

✓ Enfleurage

Representa el método de extracción empleado para obtener aceite esencial de determinadas flores. (Sepúlveda Castaño, 2012)

✓ Extracción con solvente

Método a través del cual se emplea disolventes para extraer el aceite esencial. Por lo general, antes de su extracción la materia prima debe ser molida para que de esa forma pueda tener mayor contacto con el solvente. Los solventes que más se emplean, suelen ser: el cloroformo, la acetona, el acetato de etilo, el éter isopropílico, el éter etílico, la ligroina, el xileno, el tolueno, el ciclohexano, el hexano, el isopropanol, el metanol y el etanol (Osorio Fortich, 2015).

✓ Extracción por prensa

A través de este método, la muestra se expone a presión usando prensas en forma continua o tipo batch. Suele existir diversos tipos de prensas, dentro de las cuales se tiene: los rodillos de prensa, el extractor decanter, el extractor centrífugo, el extractor expeller y el tornillo sin fin de baja o alta presión (Sepúlveda Castaño, 2012).

✓ Extracción con fluidos supercríticos

Representa el método de extracción por medio del cual se suele aprovechar la capacidad de disolución que tienen los fluidos, en condiciones por encima de su temperatura y presión crítica. Se puede

obtener extractos sin empleo de disolvente alguno y su extracción se suele llevar a cabo de forma más rápida que cuando se emplea algún tipo de disolvente orgánico convencional. Generalmente, el CO₂ representa la sustancia que más se emplea para extraer el aceite a través de este método (Rubio Rodríguez et al., 2012).

2.2.3. Metodología de análisis

2.2.3.1. Rendimiento del aceite esencial

Cuando se extrae el aceite esencial, su rendimiento será más alto a una presión constante, suministrando mayor presión por mayor tiempo de extracción. De acuerdo a una investigación realizada por Leon et al. (2015), cuando se trabaja con una presión constante se logra obtener un mayor rendimiento de extracción que cuando se trabaja con una presión variable.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{volumen de aceite esencial} * \text{densidad del aceite esencial}}{\text{peso de la muestra}}$$

2.2.3.2. Propiedades de Actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes también desempeñan un papel elemental en algunos de los aceites esenciales, actividades biológicas, que es justificado por la implicación del estrés oxidativo en patología. (Hernández Saavedra, 2007) Estos atributos se deben a la capacidad inherente de algunos de sus componentes, particularmente los fenoles, para detener o retrasar la oxidación aeróbica de la materia orgánica, aunque el procedimiento por el cual se obtiene el aceite de la materia prima (destilación) limita el contenido de fenólicos en la final de la matriz porque muchos de estos compuestos no son volátiles. (Hernández Saavedra, 2007).

(EFSA, 2012) Los informes sobre los aceites esenciales, propiedades antioxidantes de diferente científico de campo o diferentes laboratorios son a veces contradictorios a diversos escenarios experimentales, que hacen dificultar cualquier comparación entre los resultados. Algunos de los métodos utilizados para evaluar los aceites esenciales son su rendimiento

antioxidante y sus limitaciones que, si no se abordan adecuadamente, pueden comprometer el significado y cancelación de resultados.

Antioxidantes: definición y mecanismos

La identificación de antioxidantes representa una práctica básica en el proceso de estudio de compuestos naturales. Se suelen identificar antioxidantes como moléculas que son capaz de reaccionar con radicales o dotado de poder reductor para contrarrestar el estrés oxidativo que provocan los radicales.

Dicho enfoque es probado por la química de diversas pruebas que se llevaron a cabo para realizar el análisis de la actividad antioxidante de extractos naturales o fitoquímicos aislados, que suelen basarse en la reacción del antioxidante potencial con cierto radical persistente coloreado (p. Ej., DPPH • o ABTS • +) o con algunas especies oxidantes no radicales como Fe³⁺ iones (p. Ej. ensayo FRAP). Este enfoque no resulta del todo correcto.

De acuerdo a su definición, los antioxidantes vienen a ser compuestos que suelen ser capaz de retardar el grado de oxidación de un material que es oxidable, inclusive cuando son usados en cantidades muy modestas (carbohidratos, proteínas, lípidos) y, en menor grado, otras moléculas orgánicas que componen los tejidos vegetales o animales. Su oxidación suele ocurrir a causa de una reacción en cadena de radical medida por radicales peroxilo (ROO •) que suele ser paralelo a la auto oxidación de hidrocarburos. (EFSA, 2012)

Actividad antioxidante del aceite esencial

Todo aceite esencial presenta actividad antioxidante, ello posiblemente a causa de la presencia de compuestos fenólicos como el timol y el carvocrol (Torrenegra Alarcón, Granados Conde, & Yañez Rueda, 2017).

Para el caso de ciertos frutos cítricos, dicha actividad antioxidante se da debido a la presencia de α -terpinoleno, α -terpineno, limoneno, α -pineno, y β -pineno (Baik Seok, Sang Suk, A Lee, & Km Young, 2008)

Esta actividad antioxidante está relacionada con la composición química de los aceites esenciales cuyos principios fundamentales son limoneno, α -pineno y α -terpineno, Estudios sobre la relación entre la composición química de los aceites esenciales y su actividad biológica son abundantes. Se ha establecido en numerosas bibliografías que la actividad de un aceite esencial está relacionada con los principales compuestos y la posible sinergia de efectos establecidos entre ellos (Kalemba & Kunicka, 2003)

(Shibamoto & wei, 2007) observaron una importante actividad antioxidante de los aceites esenciales ricos en monoterpenos (limoneno y α pineno). En general, los aceites esenciales ricos en compuestos oxigenados exhiben una actividad antirradical muy importante. reveló una correlación de tipo positivo existente entre la actividad antioxidante y el nivel de α -pineno. Del mismo modo, (Dukic-Mimica., Bozin, Sokovic, Mihajlovic, & Matavulj, 2003) informó que los monoterpenos (limoneno) y sesquiterpenos (cariophyllene) son responsables de la neutralización del radical DPPH. Informaron sobre la actividad antioxidante de todo aceite esencial con sesquiterpenos oxigenados. Además, Kelen y Tepe (Kelen, 2007) han detectado que los monoterpenos (limoneno, α -pineno y β -pineno) individualmente probados no tenían una actividad antioxidante significativa en comparación con los mismos componentes cuando se probaron juntos.

Esta sugerencia existe un efecto sinérgico entre dichos compuestos. (Baratta & Giuseppe, 2000) informó que el α -terpineno era responsable de la actividad antioxidante detectada para un aceite esencial en el que ese componente tenía un contenido superior al 8%.

Métodos para determinar antioxidantes (capacidad para capturar radicales)

Hoy en día existen ciertos métodos que se emplean para medir la capacidad para capturar los radicales que se forman en el proceso peroxidación lipídica. Uno de estos métodos suele consistir en medir el grado de concentración de antioxidantes que se requiere para capturar en un determinado tiempo el 50% de los radicales. (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2004)

- **Método DPPH (Ensayo actividad antiradicalaria):** Este método fue desarrollado en 1995 por Brand-Willams et al. EL DPPH es un radical de nitrógeno orgánico que se encuentra disponible en el ámbito comercial. Generalmente, el efecto antioxidante se da en proporción a la desaparición del radical DPPH en la muestra que es objeto de análisis. Se monitorea el radical DPPH por medio de un espectrofotómetro UV, y ello se convirtió en un método que con frecuencia suele ser empleado.

Por otra parte, también se puede evaluar el efecto antioxidante por medio del uso de la resonancia paramagnética electrónica (RPE), a través de esta técnica se suele realizar un “conteo” del número de radicales existentes en la mezcla del DPPH con una determinada muestra objeto de estudio (Huang B & Prior, 2005).

- **Método catión-radical ABTS+:** Este método suele emplearse con gran amplitud para muestras de extractos de plantas de carácter lipofílica o hidrófila, muestras de compuestos puros, muestras de alimentos, muestras biológicas, etc. (Kuskoski et al., 2004).

El ABTS+ viene a ser un cromógeno artificial que suele presentar un espectro ultravioleta (UV) con tres máximos de absorbancia a 414, 752 y 842 nm en medio acuoso, y a 414, 713, 873 nm en medio etanólico” (Branchi & Gentili, 2005).

La disminución del catión-radical suele depender del grado de concentración del antioxidante y de su tiempo de reacción (Branchi & Gentili, 2005). Los radicales DPPH y ABTS+, por lo general suelen presentar una buena estabilidad bajo las condiciones de las evaluaciones y muestran diferencias significativas en sus respuestas respecto a las concentraciones de un gran número de antioxidantes (Branchi & Gentili, 2005).

2.2.3.3. Cromatografía de gases unido a un espectrómetro de masas

Fundamentos y principios básicos

De acuerdo a (Valdez Jimenes, 2017), la cromatografía de gases representa una de las técnicas a través del cual se puede ver como se separa, identifica

y cuantifica las sustancias consideradas muy complejas que pueden ser semivolátiles o volátiles. Generalmente, la separación de esas sustancias suele depender de la distinta distribución de las sustancias que son objeto de estudio entre la fase estacionaria y fase móvil. Cuando se logra la separación de dichas sustancias, estas se fragmentan y analizan según su patrón de fragmentación, lo cual se puede contrastar con información que se contiene en una base de datos de espectros de masas para su preliminar identificación.

Aplicaciones de la cromatografía de gases

La cromatografía de gases suele aplicarse ampliamente para identificar y cuantificar moléculas orgánicas volátiles (Briseño Pérez, 2020).

Según (Valdez Jiménez, 2017), en el ámbito industrial suele enfocarse especialmente a la evaluación de la pureza de reactantes y productos de reacción y/o a la monitorización de la secuencia de reacción.

Asimismo, suele emplearse para realizar la identificación y cuantificación del compuesto de los aceites esenciales.

Relación de la cromatografía de gases con los aceites esenciales

(Pino Alea, 2014) señala que, uno de los avances más significativos en el análisis de todo aceite esencial ha sido la introducción de la cromatografía de gases (GC).

La GC ha sido una de las primeras técnicas que ha permitido realizar un análisis cuantitativo a la mezcla compleja que suele constituir a todo aceite esencial. Actualmente, la GC representa uno de los métodos instrumentales que se emplea para poder analizar los aceites esenciales.

En el caso de los aceites esenciales, se cuenta con dos normas ISO (la ISO 11024-1: 1998 y la ISO 11024-2:1998) que forman los procedimientos que se llevan a cabo en el análisis de cromatografía de gases del aceite esencial.

2.3. Definición de términos.

Antioxidantes: son sustancias de origen natural o fabricado por el ser humano que ayudan a retrasar o prevenir ciertos daños a las células. Suelen encontrarse en un gran número de alimentos, incluyendo las verduras y frutas (Segovia Barrientos & Suárez De la Cruz, 2010).

Aceite esencial: es un líquido aromático que tiene aspecto oleoso y cuyo color suele variar en función a la planta del cual es extraído.

Cromatografía de gases: es una técnica empleada para separar todo compuesto orgánico e inorgánico térmicamente estable y volátil. Tiene como objetivo cuantificar cada uno de los compuestos presentes en la mezcla.

Extracción por arrastre de vapor: es un método que se emplea para realizar la separación de sustancias orgánicas que no pueden ser disueltas en agua y volátiles, de otras no volátiles que suelen estar presente en la mezcla, tales como sales inorgánicas, resinas u otro compuesto orgánico no arrastrable.

CAPITULO III. METODOLOGIA DE INVESTIGACION

3.1. Tipo de estudio.

Cuantitativa y experimental.

3.2. Diseño de estudio.

Cuantitativo, correlacional, predictivo y experimental, utilizando Diseño Experimentales de Superficie Respuesta, Diseño Compuesto Central reducido, desarrollando en la plataforma de Statgraphics centurión XVIII

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

Como fuente de aceites esenciales, se eligió al fruto de naranja dulce (*C. sinensis* L. Osbeck), proveniente de productores de cítricos de Madre de Dios, con una producción anual de 1278 toneladas.

La identificación botánica de la naranja dulce, se ha realizado utilizando claves dicotómicas de *Genus Citrus* y la referencia especializada brindada por Tanaka, T., (1961).

3.3.2. Muestra

Para un total de 16 experimentos según las matrices de diseño, se utilizó un total de 95 Kg de cascara seca.

3.4. Métodos y técnicas.

3.4.1. Materiales, equipos y reactivos.

a) Materia prima e insumos

La naranja dulce fue colectada de la parcela del Sr. Douglas Capuana Areque, que se sitúa en el km 25 carretera Otilia de la provincia y distrito de Tambopata, ciudad Puerto Maldonado, perteneciente al Departamento de Madre de Dios. Dicha parcela está ubicado a una latitud

11°37'46,60" Sur y longitud 70°32'25,84" Oeste, con 139 m.s.n.m. cuya temperatura es de 36 °C, posee una humedad relativa a 83%.

b) Lugar de ejecución.

El desarrollo de la presente investigación fue llevado a cabo en el Laboratorio de Procesos Agroindustriales, Laboratorio de química, Laboratorio de biología, Laboratorio de investigación Ingeniería Agroindustrial, todos pertenecientes a la facultad de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMAD. Asimismo, se llevó a cabo en el Laboratorio de cromatografía de la UNSAAC.

c) Materiales de laboratorio

- Agua destilada
- Bagueta
- Cuchillo de acero inoxidable
- Embudo de cristal estriado con tallo corto
- Fiola 200 mL \pm 0,2%, de vidrio borosilicatado
- Frascos de vidrio acaramelados de 5 y 10mL
- Gradillas de plástico
- Indumentaria (Mandil, Mascarilla y guantes)
- Matraz Erlenmeyer 150, 250 y 500 mL \pm 0,5%, de vidrio borosilicatado, Marca Schott Duran
- Pera de decantación 200, 500 y 750 mL, de vidrio borosilicatado, Marca Schott Duran
- Picetas de plásticos, 500 y 750 mL
- Placas Petri, marca Schott Duran
- Pipetas graduadas 10 y 20 mL \pm 0,1% Marca Schott Duran, de vidrio borosilicatado
- Probetas graduadas 10 mL, 50 \pm 0,5%, 100 mL \pm 1%, Marca Schott Duran, de vidrio borosilicatado
- Tina capacidad 5 L
- Tubos de ensayo 10,20ml \pm 0,1% Marca Schott Duran, de vidrio borosilicatado.

- Vasos de precipitación de $50 \pm 0,1$ ml, $100 \pm 0,5$ ml y 200 ± 1 ml Marca Schott Duran, de vidrio borosilicatado.
- Viales HPLC 1,2 mL, de vidrio borosilicatado
- Pinzas de acero inoxidable C-304
- Termómetro Laser de Infrarrojos de Precisión, CHI-040 $\pm 0,01$ °C
- Soporte universal
- Tijera Podadora Tramontina
- Mesa de trabajo de acero inoxidable
- Balón fondo redondo esmerilado de 250 ml, 500 ml y 750 ml cuello angosto, tamaño del empalme esmerilado 29/32, material en vidrio de borosilicato 3,3 de alta calidad y resistente

d) Equipos

- Picnómetro Vol. 5 mL con indicador de temperatura.
- Estufa, marca Schott Duran, modelo MS-H3, T° regulable desde 0-200 °C, voltaje 220, programador 24 horas, ejecutado el interior en acero inoxidable C-304.
- Refrigeradora, marca BEKO, modelo CHA 28020, serie: HSA32520, capacidad 215/218 L, voltaje 220, T° -18 a 30 °C, color blanco con puertas reversibles
- Equipo de destilación por corriente de vapor a escala bench, construido en acero inoxidable con un cuerpo cilíndrico de I.D. 0,21 m y altura 0,5 m; ubicado en el Laboratorio de Investigación de la UNAMAD – IAG.
- Plancha de calentamiento; Fisher scientific; serie: 208N0035, Temperatura máxima: 540 °C, Voltaje: 230V 50/60Hz, Medidas: 5 / 10 / 3,6 (12,7 x 25,4 x 9,1 cm), Tipo de enchufe: varios, Tamaño del plato: 4,25" x 4,25" (10,8 x 10,8 cm).
- Laptop TOSHIBA Intel®core (TM)i3-2348M CPU @2,30GHz(4CPUs), Disco duro de 4096MB RAM, teclado numérico Windows 8,1 Pro 64bits, modelo de sistema: satélite C45-A.

e) Instrumentos.

- Balanza analítica, marca SARTORIUS, Nro. de referencia 6971966, capacidad max. 220g, tamaño de platillo Ø 80mm, voltaje 230 V/50 Hz, rango de estabilidad 1/4-Dig., Legibilidad 0,0001 g, reproducibilidad 0,1 mg, tiempo de estabilización menor a 8 segundos, pantalla LCD, color blanco, con cubierta en vidrio de 3 ventanas, desviación linealidad, ejecutado en acero inox.
- Balanza granataria digital, PCE-BTS 15, cap. Max. 25 kg ± 0,2, Modelo: JCS-B, pantalla LCD, sensibilidad 1kg, tamaño del plato 235 x 342 mm, reproducibilidad 5 g, lineabilidad ±5, display digital de buen tamaño retroiluminado
- Refractómetro ABBE 0-95%, 1,300-1,700 nD
- Espectrometro visible GENESYS™ 20, Thermo Scientific, fuente de luz: lampara de wolframio, sistema óptico: Haz simple, Rango de medición: 325 – 1100 nm, Ancho de banda: 8nm, Exactitud: +/- 2,0 nm, Rango fotométrico: - 0,1-2,5^a,0-125% T, 0-1999C, absorción, transmisión, concentración, factores, pantalla: LCD con 2 líneas y 20 caracteres, soporte de cubetas estándar: soporte para cubetas de 10mm y tubos, Memoria de métodos: Parámetros en memoria fija, memoria de datos: No, impresora, interna(opcional): 20 columnas, Dimensiones: 300 x 330x190mm, Peso: 4,5 kg, Accesorios incluidos: Funda, manual de instrucciones, 5 cubetas un solo uso.
- Rango de medición de escala Vernier 12 mm.
- Cromatógrafo de gas GC Agilent / HP 6890 PLUS para análisis de gases. Este GC está equipado con 3 válvulas accionadas (2 para muestreo y una para retrolavado de columna empaquetada); FID, TCD, 2 EPC para los gases portadores, columna capilar Restek RTX-1 y columna empaquetada Restek Hayasep Q 60/80. Si bien se puede reconfigurar fácilmente; actualmente, la columna capilar va a FID y la columna empaquetada va a TCD con retrolavado. Línea de transferencia: 80°C, Volumen de inyección: 0,1 µL, división de la muestra: 1/100, Gas portador: Helio, Flujo del gas portador: 1ml/minuto

f) Reactivos

- Tolueno QP. Laboratorio PA. MERCK (108325) LT.
- Hexano Laboratorio P/HPLC MERCK 4391 2,5L.
- Diclorometano QP, Laboratorio QUIMIPUR 99,7% 1 LT.
- Agua Destilada 1000mL Alkofarma
- Sodio sulfato ANH. Laboratorio MERCK (6649) 500
- DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132)

3.5. Metodología**3.5.1. Materia prima y su pre-tratamiento**

El fruto de la naranja que se eligió como materia prima para que sea objeto de estudio en la investigación desarrollada pertenece a la especie *C. Sinensis* L. Osbeck, cuya variedad es dulce y pertenece a la familia de las Rutaceae.

Es una de las variedades de naranja que más se suele cultivar y que tiene mayor demanda en la región. Sus frutos son de tamaño mediano, cuya corteza es medio gruesa y dura, tienen bastante jugo y no poseen muchas semillas.

La materia prima utilizado en los experimentos fue identificado por Douglas Capuana Areque, Madre de Dios el 15 de marzo de 2017. Las muestras recolectadas fueron de 500 Kg de naranja de la especie *C. Sinensis* L. Osbeck. Los frutos fueron clasificados de acuerdo al estado de madurez color, tamaño y textura al azar de distintos árboles. Se procedió a hacer la limpieza y seguidamente retirar la cascara con una maquina peladora manual marca whirlpool. El material se almaceno en escalones de mallas de plástico de cuatro pisos a una temperatura de (26 - 28 °C), bajo sombra por un periodo de 3 días de manera que pasa un proceso de deshidratación, al finalizar el proceso se realizó la reducción de tamaño (cortado) del material deshidratado listo para el proceso de extracción y determinar los análisis físicos - químicos.

- a) Recepción de la materia prima.** – Como materia prima se recepciono las cascaras frescas de *C. Sinensis* L. Osbeck. Las cuales se encontraban en buen estado para la investigación, tenían un estado de maduración adecuada y poseían buen aspecto externo, ya que de la calidad que tengan las cascaras

de naranja usadas como materia prima dependía la calidad que tendrá el aceite esencial que se extraiga de ellas.



figura 2. Frutos y cascara de naranja

- b) Pesado de la cascara fresca.** – para dicho procedimiento se hizo uso de una balanza granataria de 25 kg para que respectivamente se calcule el rendimiento de la cascara fresca en la etapa de secado.



figura 3. Cascara de naranja fresco

- c) Deshidratado.** – En el proceso de deshidratación se redujo el contenido de humedad que tenían las cascara de naranjas usadas como materia prima, ello con la finalidad de incrementar la eficiencia de su extracción. Este procedimiento evita el ingreso de hongos y bacterias en la materia prima y permite que sea almacenada hasta que se obtenga el aceite esencial. La cáscara fue colocada sobre una malla plástica de cuatro pisos por un periodo de tres días bajo temperaturas de 26 - 28°C y bajo la sombra, la malla permitió una ventilación adecuada.



figura 4. Deshidratado de cascara de naranja

- d) Selección y cortado.-** En este proceso se realizó la selección con el fin de no tener la presencia de partículas extrañas como, cascara malogradas, presencia de hongos u otras partículas presentes en el lote de muestras obtenidas, respectivamente se procedió al cortado con la finalidad de que el vapor de agua pueda penetrar en los tejidos de la materia prima y vaporizar gran parte de las sustancias volátiles, ello con el fin de garantizar que haya un mayor contacto y exposición de las glándulas del aceite, por tal motivo se requirió la reducción de tamaño de la muestra seca en tamaño de 2 a 3 cm, para luego ingresar a la torre de empaque y de esa manera proceder a la extracción.



figura 5. Cortado de cascara deshidratada de naranja.

- e) Pesado de cascara deshidratada.** - En esta etapa se realizó el pesado en seco (deshidratado) utilizando una balanza granataria de capacidad 25 kg, con la finalidad de calcular el rendimiento de la materia prima para la producción de aceite esencial.



figura 6. Pesado de cascara deshidratada

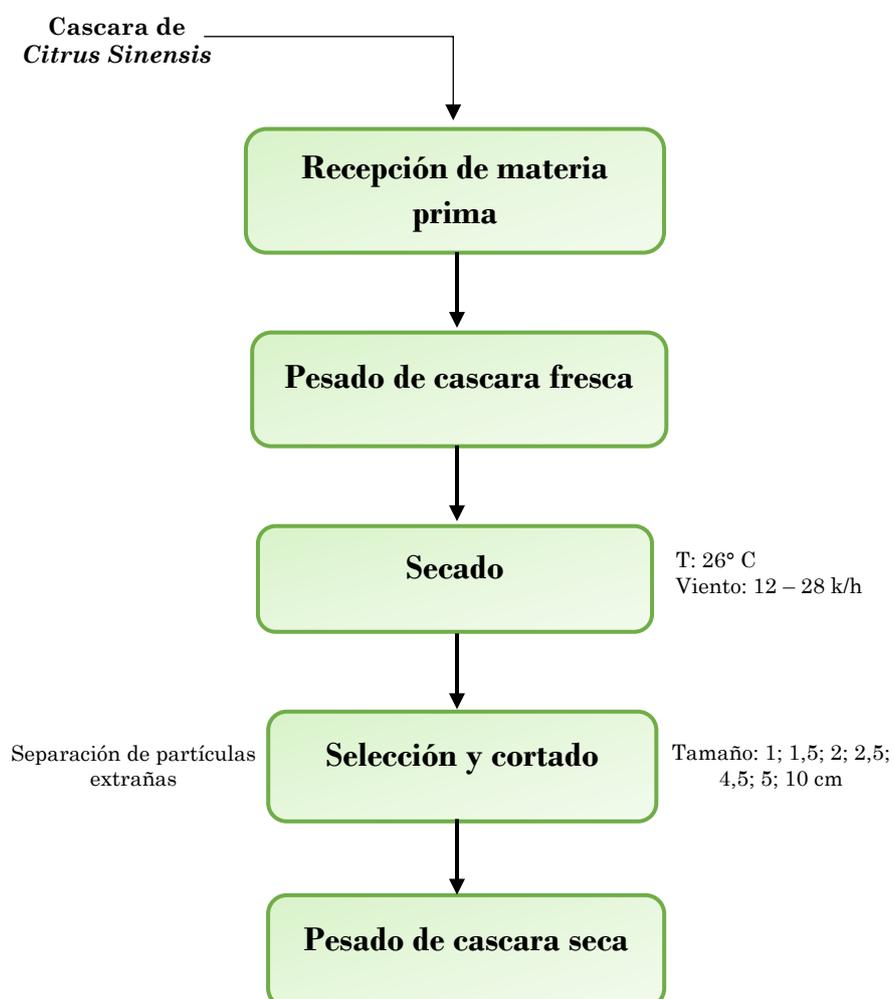


figura 7. Flujo de acondicionamiento de la cascara de *C. sinensis*.

3.5.2. Extracción de aceite esencial por método Clevenger.

Fue realizado empleando un equipo de hidrodestilación del tipo Clevenger, se pesó 100 gramos de la materia prima secado en placas petri en una balanza analítica y posteriormente se introdujo en un balón de destilación de fondo redondo esmerilado, al cual se le agregó 500 mililitros de agua destilada para llevar a cabo la hidrodestilación con un sistema de calentamiento (plancha de calentamiento) Marca (VGEBY, Perú), con una potencia de 400W. Se esperó un tiempo de 2 horas aproximado para el calentamiento del balón con muestra para la caída de 1ra gota de aceite esencial y respectivamente siguiendo la extracción por un periodo de 4 horas.

Al comienzo del proceso de extracción se suministró calor al balón de destilación por medio de una plancha de calentamiento para que se distribuya de mejor forma la energía. El vapor que por lo general sale del balón fue conducido por medio del tubo de vidrio hasta el condensador, donde se da el cambio de fase, se pudo observar la condensación a través de la manipulación del flujo de agua de refrigeración, ello para impedir que escapen algunos compuestos volátiles.

Según se llevaba a cabo la extracción, se pudo observar la separación del aceite de la fase acuosa. Asimismo, para determinar la finalización del proceso de extracción, se procedió a observar el condensado en un vidrio de reloj, ello a fin de ver si aún se estaba extrayendo aceite. Al no ver la existencia de aceite en el condensado, se procedió a separar el tubo en U del sistema y apagar la plancha de calentamiento. Seguidamente, se dejó enfriar el sistema por un aproximado de diez minutos; pasando los diez minutos, se aflojó las uniones del sistema y se dejó enfriar en su totalidad. Finalmente, el aceite esencial que se obtuvo fue separado por decantación utilizando una pipeta de 1 mL con una pera de succión y de forma inmediata fue almacenado en frascos acaramelados a 5 -10 °C hasta que se lleve a cabo los análisis respectivos.

El rendimiento en la extracción fue evaluado por triplicado, en todo momento se operó bajo las mismas condiciones, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{w_{AE}}{w_{MV}} \times 100$$

Dónde:

w_{AE} = peso (g) obtenidodel AE

w_{MV} = pero en gramos(g)del material vegetal.

Se determinó las constantes físicas como el índice de refracción en un Refractómetro ABBE.



figura 8. Esquema del método de extracción CLEVANGER

3.5.3. Extracción del aceite esencial por pulsos de vapor.

El equipo que se empleó para extraer el aceite esencial es de pulsos de vapor. Dicho equipo consta de las partes siguientes: caldera de vapor 40 libras, una presión distribuida de 10-15 psi, superficie de calefacción: 120 pie, y una capacidad: 700W de potencia. Posee también: vaso florentino, intercambiador de calor y tanque destilador (ver figura 9).

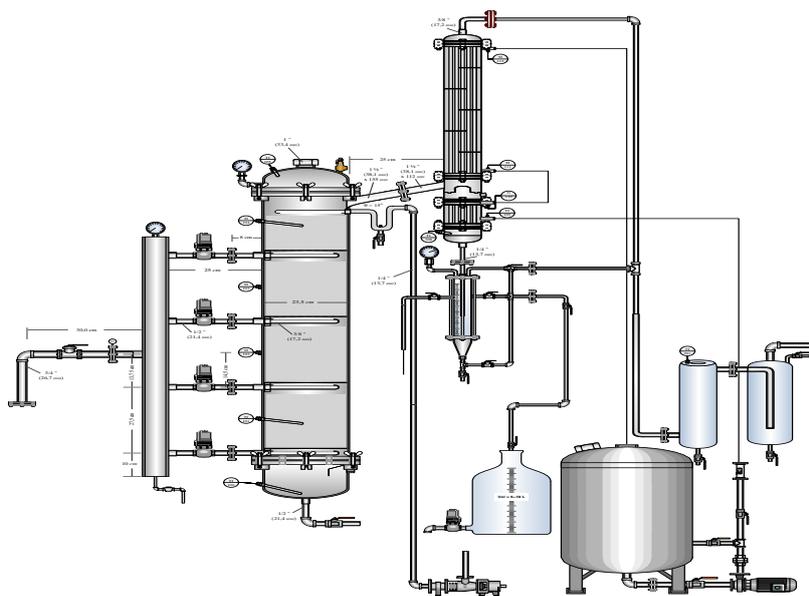


figura 9. Esquema de extracción, equipo PULSOS DE VAPOR

Los pericarpios de naranja pesados previamente fueron depositados en el tanque extractor. En esta fase se produjo ciertas variaciones respecto al espesor de las cascaras (0,28; 0,33; 0,4; a 0,6 cm). Ya cerrado el tanque, se dio inicio al proceso de extracción del aceite esencial, permitiendo que el vapor de agua pase a diferentes presiones (1, 4, 5, 6,10 psi, medida y controlada con el manómetro de presión de tamaño: 7,1*5,1*2,7cm. modelo S508-1-0 Bar) dentro del tanque de extracción. De forma seguida, se dio inicio a la separación por decantación empleando una probeta de 50 mL. El aceite esencial obtenido fue empacado en frascos acaramelados, ello para impedir su degradación química por acción del aire, del calor y de la luz. Finalmente, los frascos que contenían el aceite esencial que se extrajo fueron almacenados en un lugar fresco, bajo una temperatura de 5 -10°C.

f) Extracción de aceite. – Esta operación se llevó a cabo de la siguiente forma: se vertió agua en el generador de vapor hasta conseguir el volumen de 20 L, que es el volumen máximo de operación del equipo. Una vez realizado esto se procederá a depositar toda la cascará ya cortada en la torre de empacado, y por lo tanto a partir de ese instante se permitirá el ingreso de vapor la cual pasará por el condensador para el respectivo arrastre de aceite. Y continuamente se empezará a controlar el tiempo de extracción, y la cantidad del volumen de agua retirada.



figura 10. Equipo de extracción de aceite esencial

g) Condensación: El vapor que se generó en la cámara de extracción, que contenía tanto vapor de agua y aceite esencial, fue acondicionado por medio del cambio de fase para de esa forma dar inicio a su proceso de separación.

h) Decantación (aceite) - Gran parte de los elementos que componen el aceite esencial son volátiles y relativamente no miscibles en agua.

En esta etapa es que se obtiene el aceite esencial, y para tal efecto, se realizó la separación del aceite en una pera de decantación de 50 ml.



figura 11. Separación Aceite - Agua

i) Envasado y almacenado. - El envasado se realizó en frascos acaramelados (frascos 5 y 10 mL), ello con la finalidad de conservar de forma adecuada el aceite esencial que se obtuvo para que sus calidades no se vean deterioradas. Y respectivamente se procedió a la etapa de almacenamiento, ya que estando en buenas condiciones de almacenado el aceite esencial mantiene su calidad óptima por más de doce meses. En contraste, si se almacena en lugares poco favorables, en menos de tres meses su estabilidad a la oxidación suele caer a un nivel inferior a lo requerido por la norma DIN 51605. Entonces, lo ideal es que se debe almacenar el aceite esencial sin exponer a la luz y bajo temperaturas constantes de 5 -10°C.



figura 12. Almacenamiento de aceite - frascos acaramelados

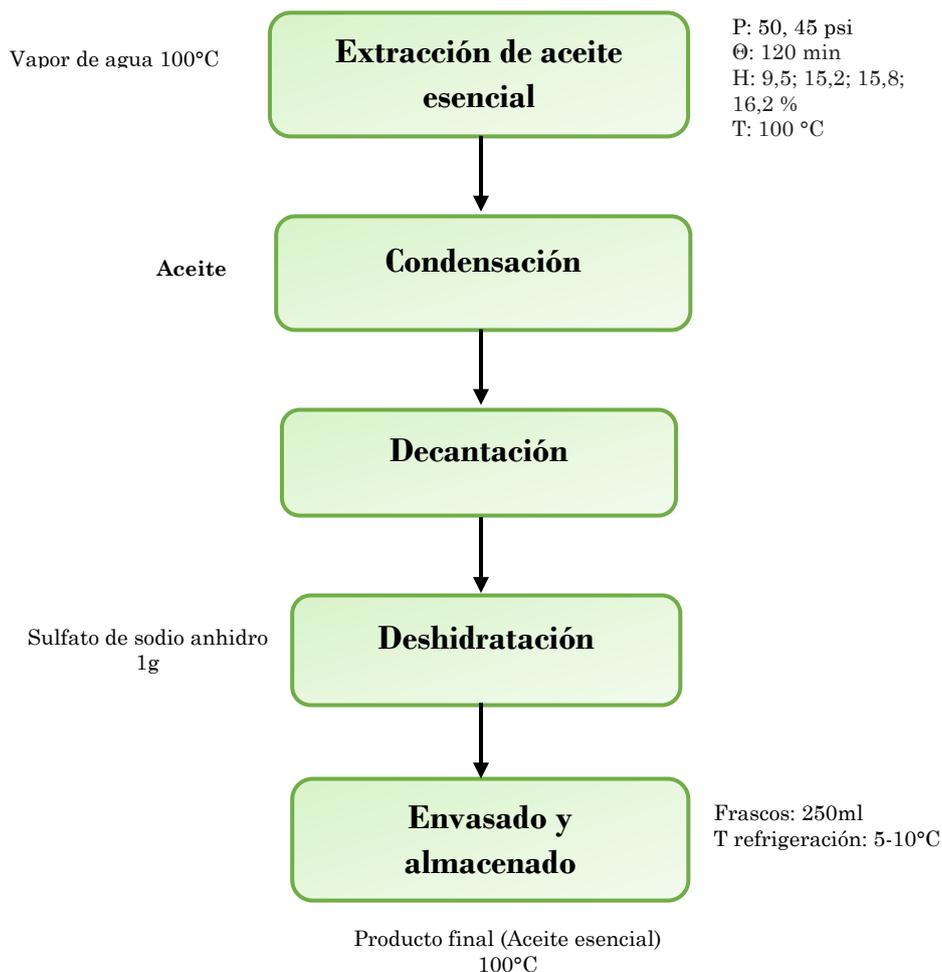


figura 13. Flujograma para la obtención de A.E

3.5.4. Análisis de los aceites esenciales por CG-MS.

Caracterización cromatográfica de aceite esencial

El aceite esencial obtenido en condiciones óptimas de extracción y los de las muestras se caracterizaron siguiendo el método previamente documentado por (Farhat & Maataoui, 2013). En resumen, el aceite esencial recolectado durante cada experimento fue realizado a través de la técnica de CG - EM.

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo Agilent modelo 6890 que se acopló a un espectrómetro de masas modelo 5975B, empleando una columna HP-5MS 5%fenil metil siloxano, bajo una temperatura máxima de 350(280) °C. Se inyectó 0,1 µL de muestra disuelta en metanol en el modo Split. La temperatura del inyector ha sido de 200 °C. Se empleó helio como gas de arrastre a un flujo de 1,00 milímetros por minuto y una presión de 7,52 psi.

3.5.5. Evaluación de Análisis de actividad antioxidantes

El poder antioxidante se estimó por medio de la prueba de DPPH.

Actividad del barrido en DPPH

La solución de DPPH se preparó con el protocolo descrito (Mansouri, Embarek, Kokkalou, & Kefalas, 2019) mediante la disolución 7,2 miligramos de DPPH en 200 mililitros de etanol. Fue llevado a un baño de ultrasonido durante 15 minutos para asegurar que el reactivo se diluya totalmente. Se añadió 30 μl de cada una de las soluciones etanolicas del aceite esencial ensayado o el antioxidante de referencia a 1,5 μl de la etanolic de DPPH. Se dejó la muestra a temperatura ambiente en la oscuridad por aproximadamente 30 minutos y se procedió a medir la decoloración con respecto al control negativo que contenía solo la solución de DPPH a 517 nm. La actividad anti-radical fue estimada en función a la siguiente ecuación (Sánchez-Moreno, 2002)

$$\text{Actividad anti-radical (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \right] \times 100$$

Dónde:

A_t y A_0 son los valores de absorbancia de la muestra probada y en blanco, respectivamente.

Se representó gráficamente el porcentaje de inhibición después de 30 min frente a la concentración y se utilizó la ecuación de la línea para obtener el valor de CE50 (concentración eficaz para reducir el 50% del radical).

- **Condiciones espectrofotométricas**

Para la calibración del método se empleó el estándar TROLOX (6-hydroxy2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) y se utilizó el etanol como solvente. Después de obtener la longitud de onda máxima se realizó la curva de calibración.

Curva de calibración:

Trolox μg	Absorbancia Remanente DPPH
0	0,000
2,5	0,149
5	0,337
10	0,586

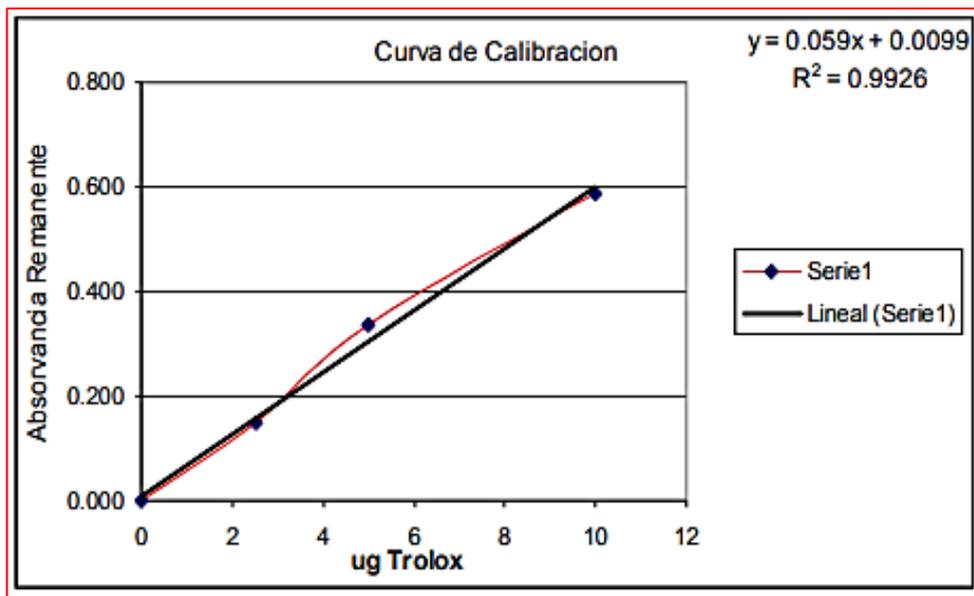


figura 14. Curva de calibración estandar trolox

3.5.6. Análisis físico- químico.

- a. **Densidad relativa del Aceite Esencial a 20 °C:** Para su determinación se empleó un picnómetro seco y limpio de una capacidad de 1 mililitro, se procedió a pesar vacío en una balanza analítica, marca SARTORIUS. Posteriormente, se llenó con 1 mililitro del AE, tapando y limpiando los excesos de muestra. Después, se procedió a pesar el conjunto y por diferencia de peso fue determinado la densidad relativa del aceite esencial extraído, utilizando la ecuación (Sonia Rubí Martínez Useche, 2015).

$$\text{Densidad } \rho \left(\frac{g}{ml} \right) = \frac{(\text{peso del picnómetro} + \text{muestra}) - (\text{peso del picnómetro})(g)}{\text{volumen del aceite esencial}(ml)}$$

- b. **Índice de refracción:** Se determinó empleando un refractómetro marca ABBE 0-95%; 1,300-1,700 nD. Para ajustar la escala, con una pizeta se agregó 1-2 gotas de agua destilada en la superficie del prisma principal. Después, se midió el índice de refracción poniendo la muestra en el medio de la superficie del prisma secundario, se procedió a cerrar de forma cuidadosa para luego observar por el ocular. También, de forma cuidadosa se procedió a girar la perilla de compensación de valor hasta que se observó una línea definida y clara en el campo de visión. Finalmente se lee la escala. El refractómetro acoplado a baño de 20°C. (Sonia Rubí Martínez Useche, 2015)

3.5.7. Metodología para determinar el rendimiento

Como referencia se tomó el peso del aceite esencial que se logró extraer entre el peso de la materia prima que se usó, empleándose para ello una balanza analítica.

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{W_2}{W_1} * 100$$

Dónde:

W_1 : Peso en gramos de la materia prima que se empleó para extraer el aceite esencial.

W_2 : Peso en gramos del aceite esencial que se logró extraer.

3.5.8. Modelamiento por superficie respuesta.

Representa una metodología por medio del cual se emplea técnicas estadísticas y matemáticas, las que permiten llevar a cabo la modelación, el análisis y la optimización del proceso.

De acuerdo a Cornell, esta metodología permite a los investigadores el poder inspeccionar visualmente la respuesta promedio para determinada zona de los niveles de los factores de interés y realizar la evaluación de su sensibilidad a dichos factores.

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar la variable del proceso que influyen en el rendimiento de la extracción, se ha elegido: Número de ciclos de pulsos de vapor (ciclo/min); Tiempo total de calentamiento (min); Presión de trabajo (bar); y Estado de la matriz vegetal, para lograr el mayor rendimiento de extracción de aceite esencial. Se optimizaron las condiciones de extracción de las *C. Sinensis* L. Osbeck utilizando un diseño Box-Behnken (BBD) (Ferreira & Bruns, 2007) A partir de experimentos preliminares, se seleccionó el rango para cada variable independiente. Cada parámetro se probó en tres niveles codificados como (-1) para menor nivel, (+1) para el nivel superior, y un valor codificado central considerado como cero (0), según se expone en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables independientes codificadas y no codificadas.

Variables independientes	Niveles	
	Inferior (-1)	Superior (+)
Temperatura °C	95	100
Tiempo (min)	72	158
Pulsos	105	292

Un diseño compuesto central (CCD). Con puntos axiales se utilizó para diseñar los datos experimentales. Esta generó 16 tratamientos con 3 repeticiones en los puntos centrales (0, 0, 0) para estimar el error puro. La variable dependiente elegida como respuesta fue el rendimiento de extracción (Y %). Los niveles codificados y no codificados de diferentes variables de proceso utilizadas para la optimización se indican en la Tabla 3. Se utilizó una ecuación polinomial de segundo orden para ajustar los datos experimentales de las variables estudiadas. El segundo orden generalizado. El modelo polinomial utilizado en el análisis de superficie de respuesta se muestra en la Ecuación:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22} + b_{33}x_{32} + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

donde, y es la respuesta (rendimiento de extracción) y

$b_0, b_{12}, \dots, b_{23}$, son coeficientes constantes de términos intercepto, lineales, cuadráticos y de interacción.

x_1, x_2, x_3 , son variables independientes codificadas.

Se utilizó el software Design Expert (versión 9,0,6,2) para el análisis del diseño experimental y el procesamiento de datos.

CAPITULO IV. RESULTADO DE INVESTIGACION

4.1. Extracción de los Aceites Esenciales - Método Clevenger

Siguiendo el procedimiento descrito en ítem 3,5,2, se logró obtener un aceite esencial ligeramente amarillento, cuyo promedio de rendimiento fue del 2,015% p/v, producto de la extracción sucesiva (Tabla 4). El aceite esencial obtenido tuvo un índice de refracción de 1,4678 y el promedio de su densidad fue de 0,8270 g/ml.

Producto del análisis realizado por CG-MS se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 15, donde se encuentran registrados los componentes volátiles mayoritarios.

Los veinte (20) componentes volátiles mayoritarios que se logró identificar por CG-MS y de las cuales su concentración relativa ha sido mayor a 0,15-0,18%, en la Tabla 14 se muestran ordenados en función al tiempo de retención. Por otra parte, aquellos componentes restantes, que se encontró en menor cuantía fueron considerados trazas.

De acuerdo a lo que se observa, el aceite esencial obtenido de la materia prima que fue objeto de estudio en la investigación realizada, tiene un contenido elevado de D-limoneno, el cual es un hidrocarburo monoterpénico, cuya fórmula molecular es C₁₀H₁₆. Generalmente, este componente suele ser considerado mayoritario en las composiciones de los aceites esenciales que se extraen de la cascara de frutos cítricos como es el caso de la naranja y el limón, y con frecuencia suele reportarse en valores mayores al 90%. (Yáñez Rueda, Lugo Mancilla, & Parada Parada, 2007). Y respectivamente, los siguientes componentes son: Perillaldehyde (98,0%; 17,4631tr), Citronellol (98,0 %; 15,8013tr), Citral(97,0%; 17,146tr), (1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3,1,1]hept-2-ene(96,0% ; 7,3483tr), Linalol (96,0%; 11,9955tr), Citronellal (96,0%; 13,5982tr), Terpinen-4-ol(96,0%; 14,5243tr), 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-(96,0%; 16,3045tr), .beta-Phellandrene (91,0%; 8,397tr), beta-Myrcene (91,0%; 8,7564tr), Octanal (91,0%; 9,0735tr), junto a otros componentes

presentes pero en concentraciones mínimas que no se logró identificar con certeza y que se consideraron como compuestos trazas.

Tabla 4. Extracción de aceites esenciales por método CLEVINGER.

Numero de muestras	Tiempo de extracción(min)	Densidad (g/mL)	Índice de refracción D_{20}^{20}	Volumen de aceite obtenido(ml)	Rendimiento(%p/p)
1	240	0,840	1,4676	0,89	0,8040
2	240	0,723	1,4680	2,90	2,4119

File :D:\DATA MSD\ACEITES ESENCIALES\2019\AE-NARANJA-PM\13.D
 Operator : JCHP
 Acquired : 10 Jan 2019 9:35 using AcqMethod ACEITE ESENCIAL19.M
 Instrument : UNSSAC
 Sample Name: 13
 Misc Info :
 Vial Number: 5

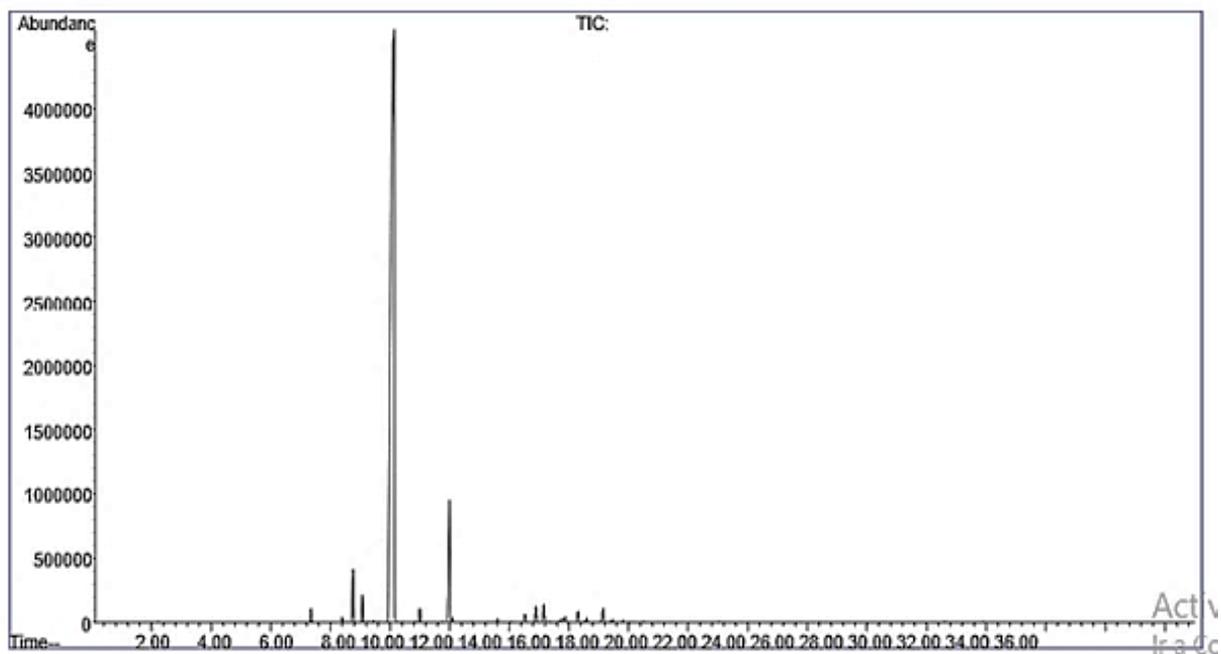
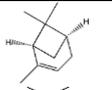
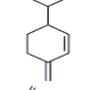
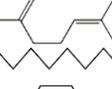
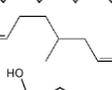
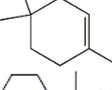
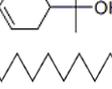
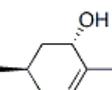
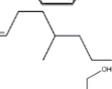
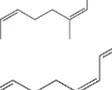
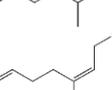
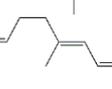
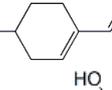
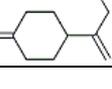
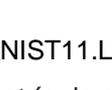
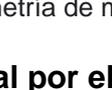
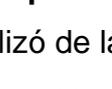
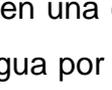


figura 15. Cromatografía de Gases de aceite esencial - método CLEVINGER

Tabla 5. Identificación de CG-MS de los principales componentes. Método Clevenger

Tiempo de retención	Estructura molecular	Peso molecular	Estructura química	Compuesto Librería Nist 11	% masa	%
7,3483	C10H16	136,234		(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3,1,1]hept-2-ene	96	0,544
8,397	C10H16	136,2340		beta -Phellandrene	91	0,2153
8,7564	C10H16	136,234		beta -Myrcene	91	2,2542
9,0735	C8H16O	128,212		Octanal	91	1,1849
10,1349	C10H16	136,234		D-Limonene	99	84,0972
11,006	C8H18O	C8H18O		1-Octanol	91	0,5969
11,9955	C10H18O	154,2493		Linalol	96	6,2839
12,0928	C9H18O	142,2386		Nonanal	90	0,2013
13,5982	C10H18O	154,2493		Citronellal	96	0,1884
14,5243	C10H18O	154,2493		Terpinen-4-ol	96	0,4443
14,8922	C10H18O	154,2493		alpha-Terpineol	86	0,8248
15,1628	C10H20O	156,2652		Decanal	91	0,904
15,6956	C10H16O	152,2334		trans-Carveol	55	0,1514
15,8013	C10H20O	156,2652		Citronellol	98	0,2183
15,8859	C10H18O	154,2493		cis-Geraniol	90	0,2307
16,3045	C10H16O	152,2334		2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-	96	0,5411
16,6047	C10H18O	154,2493		2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	86	0,2061
17,146	C10H16O	152,2334		Citral	97	0,6385
17,4631	C10H14O	150,2176		Perillaldehyde	98	0,1518
17,8099	C10H16O	152,2334		p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	46	0,1229

MS: Identificación por C:\Database\NIST11.L biblioteca; PC: JCHP Identificación por estándares auténticos analizados por espectrometría de masas UNSAAC – CUSCO.

4.2. Extracción de aceite esencial por el método Pulsos de Vapor

El proceso de extracción se realizó de la siguiente manera:

Por separada se generó vapor en una caldera, en un extractor se cargó la materia prima, se inyectó el vapor de agua por la parte inferior, cercano a su base y con la

suficiente presión para hacer frente a la resistencia hidráulica del lecho. Según que entraba el vapor en contacto con el lecho, la materia prima se calentaba y liberaba el aceite esencial que contenía y este, a consecuencia de su elevada volatilidad se evaporaba. Debido a que es soluble en el vapor circundante, el aceite esencial fue arrastrado corriente arriba hasta que llegó al tope del extractor. La mezcla (aceite esencial y vapor saturado) fluyó hacia un condensador, a través de un cuello de cisne o prolongación curvada del conducto de salida del extractor. Ya en el condensador, la mezcla se condensó y enfrió hasta que llegó a una temperatura ambiente. A su salida del condensador, se obtuvo una mezcla que se separó en uno de los separadores de aceite esencial que se tenía para tal acción.

Para realizar la extracción de aceite esencial se trabajó a presiones (1psi, 4psi, 5psi, 6psi y 10 psi) para ver si la subida del calor afectaba a la materia prima.

En las pruebas que se realizó (ver tabla 6), se observó que el rendimiento es menor cuando el aceite esencial se extrae bajo presiones bajas, ello debido a que dichas presiones no poseen la suficiente fuerza para que el aceite esencial en su totalidad pueda llegar al condensador, quedando de esa manera condensado en el extractor; además, cuando las presiones son bajas no se logra dilatar de forma suficiente los pericarpios de los flavedos de naranja para que se pueda extraer el aceite esencial. Las pruebas realizadas a presiones mayores evidenciaron que se produce un incremento considerable en el rendimiento, lo que muestra que en la extracción del aceite esencial la presión representa un factor significativo.

En la investigación llevada a cabo, se obtuvo un rendimiento óptimo de 3,04% del aceite esencial extraído de la cáscara de naranja, trabajando con una presión de 10 psi por una hora y 48 minutos, y a 2017 pulsos de vapor, concluyéndose que se obtuvo un buen rendimiento óptimo.

Navarrete & García (2010) reportaron que, los aceites esenciales presentan rendimientos de extracción de 0,28% trabajando bajo una presión de 1,2 psi, la diferencia que hay entre los dos rendimientos es debido a que, en el proceso que se realizó para obtener el aceite esencial se empleó un equipo de extracción que fue de nivel industrial y de amplia capacidad, con un caldero de 2BHP que generó mayor presión e hizo que se abran los poros de epicarpio del flavedo, llegando a producir con ello un efecto positivo en la transferencia de masa de aceite esencial.

Los resultados que se presentan en la Tabla 6, muestran el rendimiento del aceite esencial que se logró obtener en los tratamientos llevados a cabo.

Tabla 6. Porcentaje de rendimiento de aceite esencial

N°	Temp Prom (°C)	Tiempo de extracción (min)	Pulsos de extracción	Rendimiento (% P/V)
AE1	98	149	172	1,00
AE2	97	158	292	1,57
AE3	97	91	105	1,58
AE4	98	104	197	1,34
AE5	99	109	210	0,5
AE6	98	108	210	0,67
AE7	97	102	170	2,13
AE8	97	108	207	3,04
AE9	99	109	195	2,31
AE10	99	111	246	1,39
AE11	99	107	273	2,92
AE12	97	76	204	1,46
AE14	96	72	186	1,01
AE16	99	87	198	1,96

Los rendimientos obtenidos concuerdan un 90% con la literatura, puesto que, de acuerdo a (López de la cruz & Caso Orihuela, 2015) el rendimiento de extracción para todo aceite esencial suele variar de 0,5-2%. Entonces, el rendimiento obtenido está muy cercano al límite superior esperado. Otro estudio realizado a nivel piloto por (Sevillano, Siche, & Castillo Martínez, Williams. Silva, 2019) donde emplearon la técnica de destilación por arrastre de vapor y probaron en ella distintas condiciones de vapor y de empaque. El estudio reveló que, se logró obtener un rendimiento promedio de $0,66 \pm 0,12$, comprobándose de esa forma que, el proceso y las condiciones de operación que se implementó en esta metodología arrojó resultados por encima de los reportados en estudios donde se empleó la destilación con arrastre de vapor.



figura 16.Grafica % rendimiento de aceites esenciales

En la figura 16, es posible observar la variación que se produce en el rendimiento de cada tratamiento para las distintas muestras que se utilizó en la extracción, en el tratamiento AE5, se obtuvo un rendimiento muy bajo con 0,5% habiéndose trabajado con los valores de un tiempo determinado de 109 min, a una temperatura de 91 °C con 210 pulsos de vapor, seguidamente el valor máximo de 3,04 % de rendimiento fue el tratamiento AE8 con un tiempo determinado de 108 min, con 207 pulsos de vapor a una temperatura de 97,3°C.

4.2.1. Efecto del análisis de varianza para rendimiento.

Diseño Experimental Factorial 2ⁿ:

Representa una óptima estrategia experimental. Este diseño suele permitir la exploración de una zona elegida del dominio experimental y hallar una dirección prometedora para su posterior optimización. Por lo general, se emplea un diseño factorial para estudiar los efectos que puede tener los cambios de temperatura, de tiempo o de pulsos en el rendimiento de una extracción que se lleva a cabo

Tabla 7. Análisis de varianza para rendimiento de extracción de A.E

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-valor	p-Valor
Model	7,14	9	0,7931	6,45	0,0441
A-Temperatura	0,4889	1	0,4889	3,98	0,1169
B-Tiempo	0,6434	1	0,6434	5,23	0,0841
C-Pulsos	2,45	1	2,45	19,96	0,0111
AB	0,4222	1	0,4222	3,43	0,1375
AC	1,97	1	1,97	16,05	0,0161
BC	0,128	1	0,128	1,04	0,3653
A ²	2,42	1	2,42	19,65	0,0114
B ²	1,43	1	1,43	11,6	0,0271
A ² C	2,21	1	2,21	17,95	0,0133
Residual	0,4918	4	0,123		
Error Total	7,63	13			

Fuente: Statigrafics centurión XVIII

$$R^2 = 0,9355$$

$$R^2_{\text{Ajustado}} = 0,7905$$

$$\text{Media} = 1,63$$

$$\text{Desviacion estandar} = 0,3506$$

La tabla ANOVA suele dividir la variabilidad en rendimiento en piezas separadas para cada efecto. Prueba la significancia estadística de cada uno de los efectos al comparar el cuadrado medio con un error experimental estimado. Para el caso del estudio realizado, tres efectos presentan valores P inferiores a 0,05, lo cual indica

que son significativamente diferentes de 0 a un nivel de confianza de 95,0%. La estadística R-Cuadrado señala que, el modelo ajustado llega explicar el 0,9355% de las variaciones en el rendimiento.

La desviación estándar de la estimación realizada evidencia que fue 0,3506. El estadístico de Durbin-Watson prueba los residuos a fin de determinar si existe alguna significativa correlación que se base en el orden en que son presentados los datos en el archivo. Entonces, debido a que el valor P es superior que 5,0%, no hay indicaciones de auto correlación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

4.2.2. Modelo matemático de superficie respuesta

Este panel expone la ecuación de regresión que fue ajustado a los datos. Dicha ecuación es la siguiente:

$$\eta = -85694,509 + 1730,453 * T + 2,737 * T + 497,508 * P - 0,026 * T * t - 10,070 * T * t + 0,000 - 8,735 * T * T - 0,001 * t * t + 0,051 * t * T * P$$

donde, η , rendimiento en aceite esencial extraído, (%)

T , temperatura de operación, (°C)

t , tiempo de operación, (min)

P , pulsos de vapor

Donde el valor de cada variable es especificado en sus unidades originales.

Tabla 8. Coeficiente de regresión para rendimiento

Coeficiente	Estimación
Constante	
	-85694,509
A: Temperatura	1730,453
B: Tiempo	2,737
C: Pulsos	497,508
AB	-0,026
AC	-10,070
BC	0,000
AA	-8,735
BB	-0,001
AAC	0,051

Fuente: Statgrafics centurión XVIII

4.2.3. Efectos de estimación de resultados en el rendimiento.

Estos valores de rendimiento fueron generados utilizando el modelo ajustado. La Mesa por lo general suele incluir:

- 1) El valor observado de Rendimiento (en caso hubiese)
- 2) El valor predicho de Rendimiento empleando el modelo ajustado

Por lo general, cada uno de los elementos suele corresponder a los valores de los factores experimentales en una fila determinada del archivo de datos.

Tabla 9. Datos de estimación de resultados en el rendimiento.

Número de orden	Valor observado	Valor estimado	Residual
1	1,00	1,02	-0,0237
2	1,57	1,55	0,0235
3	1,58	1,72	-0,1359
4	1,34	1,29	0,0546
5	0,50	0,90	-0,4016
6	0,67	0,57	0,0992
7	2,13	1,81	0,3188
8	3,04	3,29	-0,2476
9	2,31	1,98	0,3289
10	1,39	1,48	-0,0871
11	2,92	2,84	0,0805
12	1,46	1,55	-0,0864
13	1,01	0,94	0,0736
14	1,96	1,96	0,0032

Fuente: Statgrafics centurión XVIII

4.2.4. Optimización

En la tabla 10, se expone la combinación de niveles de factor que maximiza el rendimiento en la región indicada. Valor óptimo = 2,889

Tabla 10. Optimización de respuesta

Nombre	Bajo	Alto	Valores Óptimos
A:Temperatura	96,70	99,9	97,225
B:Tiempo	72,00	158,0	96,714
C:Pulsos vapor	105,00	292,5	200,923
Rendimiento	0,50	3,0	2.889

DIAGRAMA DE PARETO

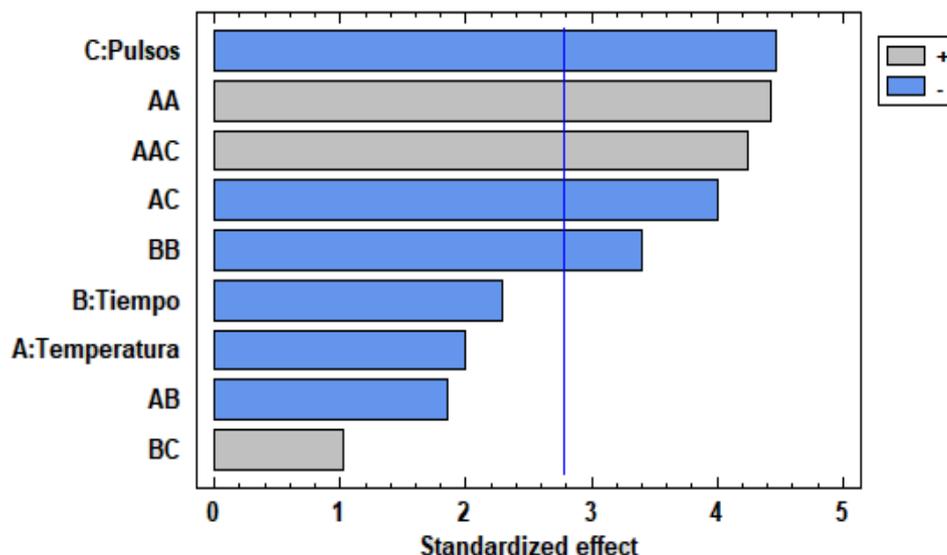


figura 17. Diagrama de Pareto para rendimiento

En el diagrama de Pareto se encuentra expuesto en orden de relevancia el efecto que tiene cada factor analizado referente al grado de concentración del aceite esencial. En ese sentido, se puede observar que el factor C: Pulsos generó un efecto superior al de la concentración de aceites; AA: temperatura al cuadrado también generó un efecto significativo en la concentración del aceite; AAC: también tuvo efecto significativo; AC: Temperatura – pulsos tuvo efecto significativo; BB: tiempo al cuadrado también tuvo efecto significativo.

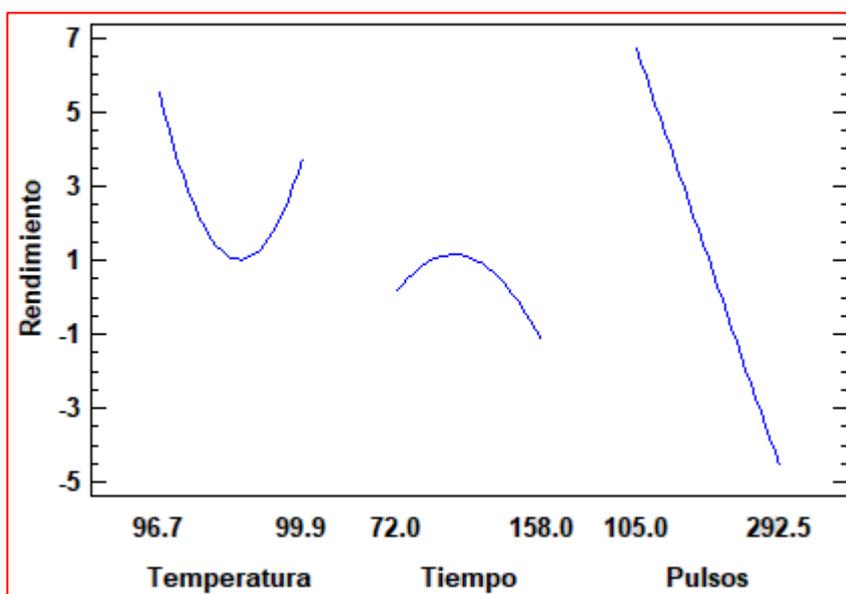


figura 18. Grafica de efectos principales: temperatura, tiempo y pulsos Vs Rendimiento

La grafica de efectos principales expone de forma separado el nivel de influencia que tiene cada uno de los factores con relación a la variable respuesta que se expresa como área total del cronograma.

Se puede observar que el efecto temperatura varia de 96°C a 99°C, por lo tanto, cuando la temperatura aumenta desde el 96°C el rendimiento vario, pero también volvió a subir hasta una temperatura de 99°C por lo tanto hay variación constante, en efecto principal de tiempo varia de manera concava, en cuanto al mayor pulso el rendimiento baja de manera lineal.

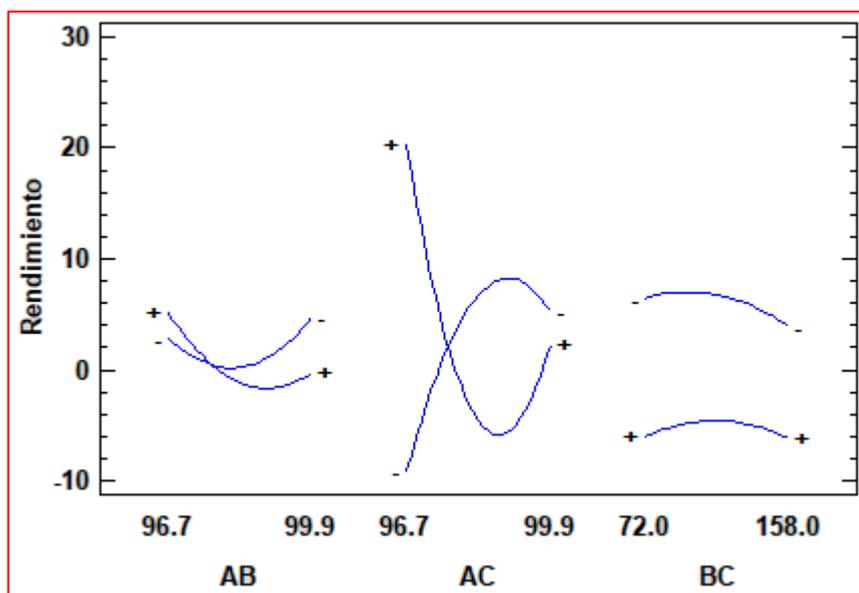


figura 19. Grafica de interacción para rendimiento (A: temperatura; B: tiempo; C: pulsos).

De acuerdo a la fig. 19, se observa que cada uno de los puntos de la gráfica de interacción expone el tiempo de procesamiento medio con distintas combinaciones de nivel de cada factor. Según la gráfica, se da la existencia de una interacción entre cada factor cuando las líneas no son paralelas. Por lo tanto, el análisis del aceite esencial extraído significa que la gráfica de interacción entre AB no varía significativamente sin embargo la interacción AC varía significativamente el rendimiento; C: no tienen efecto significativo.

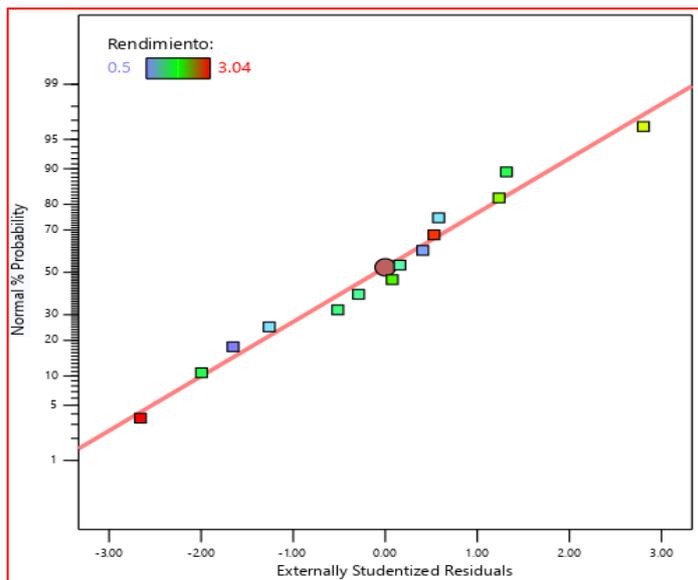


figura 20. Grafica de normalidad en el rendimiento

Esta gráfica permite determinar si los residuos siguen o no la distribución normal supuesta.

De acuerdo a la gráfica, cuando los puntos se encuentran a lo largo de una línea recta, se dice que los residuos siguen una distribución normal. Toda desviación uniforme de una línea recta es señal de una conducta normal.

De lo expuesto se puede concluir que, no infringe la suposición de normalidad y que el análisis de extracción de aceite esencial es significativo.

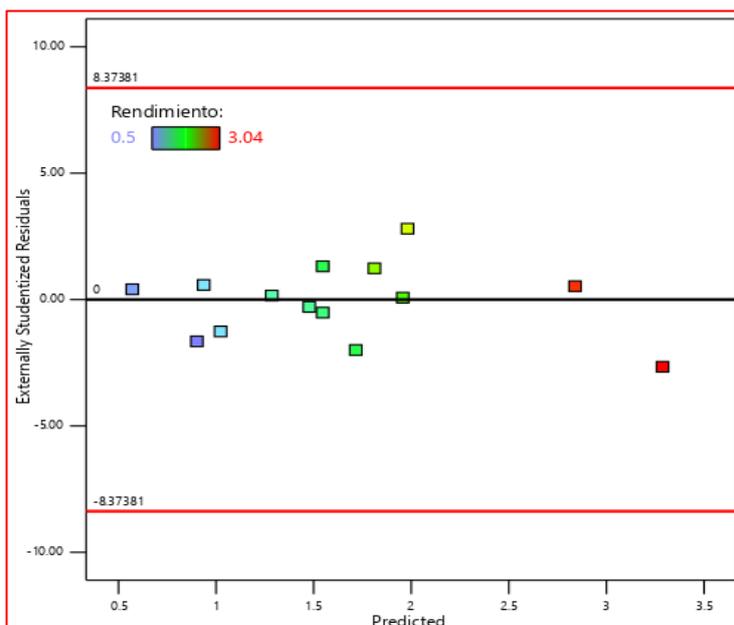


figura 21. Grafica de parcela residual Vs predicho

Esta grafica de parcela residual de rendimiento ajustada suele utilizarse para realizar la verificación del supuesto de que los residuos se encuentran distribuidos de forma aleatoria y poseen una varianza constante. Lo esperado es que, los puntos se encuentren ubicados de forma aleatoria a los dos lados del cero (0), con patrones detectables en cada punto. Por lo que significa que, los patrones que se observan en la **gráfica 21**. De extracción de aceites esenciales, si cumplen con lo que supone el modelo.

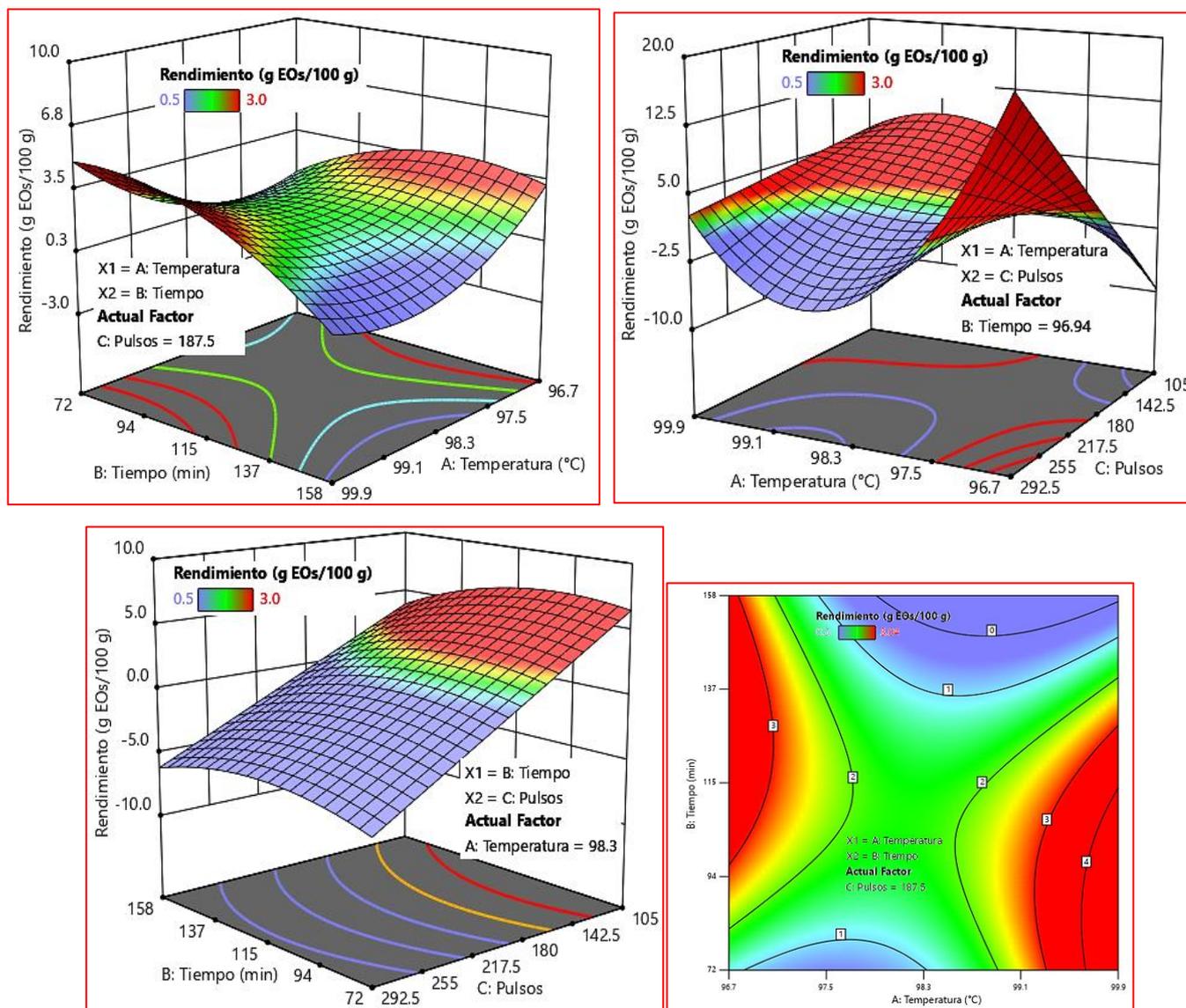


figura 22. Grafica de superficie respuesta

Analizando la gráfica de superficie respuesta, Nos indica que con la relación a: temperatura y tiempo no varía significativamente porque la temperatura tiende a bajar hasta cierto tiempo, luego se estabiliza el rendimiento mientras vuelve a incrementar la temperatura.

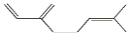
4.3. Perfil cromatográfico de los Aceites Esenciales

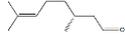
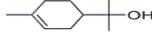
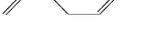
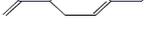
El análisis cualitativo y cuantitativo de los perfiles volátiles de los AE se enumera en la Tabla 11. La tabla incluye los índices de retención y el porcentaje de área de 20 componentes identificados, lo que representa 90 % de todos los constituyentes. Los componentes están agrupados en cinco clases: sesquiterpenos oxigenados, sesquiterpenos de hidrocarburos, monoterpenos oxigenados, monoterpenos de hidrocarburos, y otros especiales (éster, cetonas, aldehídos, alcoholes, etc.)

Los resultados muestran que existe mucha similitud cualitativa en los perfiles volátiles de los AE, a pesar que la cantidad de compuesto son distintos.

En el AE de naranja se identificaron 20 componentes, que representan aproximadamente 90 % del total de componentes detectados, respectivamente. El D-Limoneno ha sido el componente que estuvo presente en mayor porcentaje en las muestras que fueron objeto de análisis con un 93,09% de concentración relativa : seguidamente fue el beta myrcene (2,23%), linalol (1,74%), octanal(1,54%), 1-octanal(0,85%), decanal(0,56%), citral (0,52%), alpha terpineol(0,51%), citronellol (0,17%), componentes que se encontraron en todas las muestras analizadas y aquí algunos otros componentes como .alpha-Phellandrene(0,06%), 3-Carene(0,12%), Terpinen-4-ol(0,064%), Dodecanal(0,062%), 1R- α -Pinene(0,45%), Butane, 1-isocyanato-(0,14%), 6-Octenal, 3,7-dimethyl-, (R)-(0,16%), Pyridine, 3-methyl-, 1-oxide80,10%), cis-Geraniol(0,16%), 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-80,39%), 1-Decanol(0,18%), Perillaldehyde80,11%), 1-Cyclohexene-1-methanol, 4-(1-methylethenyl)-80,12%), Cyclohexane, methyl-(0,14%), Carveol(0,1%), Bicyclo[5,2,0]non-1-ene(0,11%), Ethanol(0,066%), trans-Carveol(0,15%).

Tabla 11. Principales componentes químicos del A.E.

	Componentes	Concentración relativa (%)	Tiempo de Retención	Estructura molecular	Peso molecular	estructura química
1	1R- α -Pinene	0,4482	7,3437	C ₁₀ H ₁₆	136,234	
2	beta-Phellandrene	0,3646	8,3924	C ₁₀ H ₁₆	136,2340	
3	beta-Myrcene	2,2274	8,7561	C ₁₀ H ₁₆	136,234	
4	Octanal	1,5435	9,0732	C ₈ H ₁₆ O	128,212	
5	D-Limonene	92,013	10,1431	C ₁₀ H ₁₆	136,234	

	Componentes	Concentración relativa (%)	Tiempo de Retención	Estructura molecular	Peso molecular	estructura química
6	1-Octanol	0,8465	11,0057	C ₈ H ₁₈ O	136,233	
7	Linalol	5,1716	11,991	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2493	
8	Btane, 1-isocyanato-	0,1396	12,0925	C ₅ H ₉ NO	99,1311	
9	6-Octenal, 3,7-dimethyl-, (R)-	0,1635	13,6021	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2493	
10	Terpinen-4-ol	0,1357	14,5239	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2493	
11	. alpha.-Terpineol	0,5017	14,8918	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2493	
12	Decanal	0,5648	15,1582	C ₁₀ H ₂₀ O	156,2652	
13	Pyridine, 3-methyl-, 1-oxide	0,1022	15,6995	C ₆ H ₇ NO	109,1259	
14	Citronellol	0,1618	15,7967	C ₁₀ H ₂₀ O	156,2652	
15	cis-Geraniol	0,1603	15,8856	C ₁₀ H ₁₈ O	154,2493	
16	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-	0,3956	16,3042	C ₁₀ H ₁₆ O	152,2334	
17	1-Decanol	0,1841	17,0696	C ₁₀ H ₂₂ O	158,2811	
18	Citral	0,5231	17,1457	C ₁₀ H ₁₆ O	152,2334	
19	Perillaldehyde	0,1116	17,4671	C ₁₀ H ₁₄ O	150,2176	
20	1-Cyclohexene-1-methanol, 4-(1-methylethenyl)-	0,1149	17,8096	C ₁₀ H ₁₆ O	152,2334	
	Monoterpenos Hidrocarburos		93,95%			
	Monoterpenos Oxigenados		5,91%			
	Sesquiterpenos hidrocarburos		0,11%			
	Sesquiterpenos oxigenados		0,092%			
	Otros especial		0,096%			
	Total, de componentes identificados		100,1%			

MS: Identificación por C:\Database\NIST11,L biblioteca; PC: JCHP Identificación por estándares auténticos analizados por espectrometría de masas UNSAAC – CUSCO. Fueron identificados una cantidad de 20 compuestos, que llegaron a representar el 90% del aceite esencial. El aceite de *citrus cinensis* es generalmente monoterpénico. En naturaleza. Como se expone en la Tabla 11, el AE contiene principalmente hidrocarburos monoterpénicos (93,95%), monoterpénicos oxigenados (5,91%),

seguidos de sesquiterpenos oxigenados (0,092%) e hidrocarburos sesquiterpenos (0,11%). Los compuestos dominantes del aceite esencial son el limoneno (92%) seguido del linalol (5,18%) y la beta miyrcene (2,23%). (Farhat & Maataoui, 2013) han observado que el AE extraído de cáscaras de naranjas puede contener entre un 90% y un 95% de concentración relativa en D-limoneno.

4.4. Análisis de actividad antioxidante

La muestra de AE extraído por pulsos de vapor reveló los resultados que pueden ser observados en la tabla 12, cada muestra fue leída en 5 repeticiones.

Tabla 12. Resultado de absorbancia del aceite extraído por método pulsos de vapor

Numero de muestras	Absorbancias de muestras de aceite obtenido por Pulsos de vapor					Trolox CI50 mg/100ml AE Media
	REPETICIONES					
	1	2	3	4	5	
1	60,0902	60,6765	61,6938	61,5369	61,3752	61,07
2	63,1575	63,4886	63,2706	63,9896	64,0830	63,60
3	64,0830	64,4361	63,7963	63,6961	62,9225	63,79
4	70,2636	70,2636	70,2094	70,2689	71,4283	70,49
5	70,5889	70,4541	70,5162	70,4960	70,5001	70,51
6	69,5586	69,7496	69,8074	69,7496	69,6979	69,71
7	65,5872	65,7076	65,2659	65,5872	65,0577	65,44
8	66,4413	67,6818	66,5775	66,2984	68,1246	67,02
9	68,0258	67,9257	67,6818	67,8738	67,8738	67,88
10	69,1513	69,1249	68,7694	68,5958	68,6848	68,87
11	67,4405	67,5340	67,3761	66,4874	67,0261	67,17
12	68,2784	68,2567	68,2784	68,3421	69,7157	68,57
13	70,4101	70,3732	70,4010	70,4367	70,4541	70,42
14	69,5972	69,5388	69,6161	69,4984	69,6440	69,58
15	53,3945	56,6661	57,9093	58,9684	57,6176	56,91
16	66,3944	65,6480	65,5254	65,7076	67,6386	66,18

Cada resultado obtenido en la determinación de actividad antioxidante fue realizado por quintuplicado, expresa el coeficiente de inhibición al 50% (CI_{50} o IC_{50}) en gramos equivalentes trolox que están presente en 100mL de muestra. También indica que, la determinación de capacidad depuradora del radical DPPH representa una prueba sumamente sensible y los resultados que arroja suele variar en función del método de extracción empleado y del solvente que se utiliza, el valor más bajo de actividad antioxidante fue de 61,07; el tratamiento 1 a condiciones de una temperatura 98°C, tiempo de 149 min y 172 pulsos, por otro lado la mayor actividad antioxidante fue de 70,51 a condiciones de operación de temperatura 99°C, con un

tiempo de 109 min y 210 pulsos. y de los componentes químicos que fueron identificados como los monoterpenos y sesquiterpenos, ya que son responsables de la neutralización del radical DPPH como el d-limoneno. (Dukic-Mimica. et al., 2003)

4.4.1. Efecto de análisis de varianza de antioxidantes

La tabla ANOVA suele dividir la variabilidad de antioxidantes en piezas separadas para cada efecto. Prueba la significancia estadística de cada uno de los efectos al comparar el cuadrado medio error experimental estimado. Para el caso del estudio realizado, 5 efectos presentan valores P inferiores a 0,05, lo cual señala que son significativamente distintos de 0 a un nivel de confianza de 95,0%.

Tabla 13. Análisis de varianza para actividad antioxidante

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Model	99,42	8	12,43	10,85	0,0089
A-Temperatura	11,64	1	11,64	10,17	0,0243
B-Tiempo	6,17	1	6,17	5,38	0,068
C-Pulsos vapor	23,28	1	23,28	20,33	0,0063
AB	19,44	1	19,44	16,97	0,0092
BC	8,76	1	8,76	7,65	0,0395
A ²	7,69	1	7,69	6,71	0,0488
B ²	14,96	1	14,96	13,06	0,0153
C ²	4,83	1	4,83	4,22	0,0951
Residual	5,73	5	1,15		
Error Total	105,15	13			

Fuente	Valor
Desviacion estandar	1,07
Media	67,13
R²	0,9455
R²- ajustado	0,8584

La medida estadística R-cuadrado señala que, el modelo ajustado llega explicar el 0,9455% de las variaciones de los antioxidantes. El ajuste estadístico R cuadrado, considerado como el más conveniente para realizar comparaciones de modelos con distintos números de variables independientes, fue 0,8584%.

La desviación estándar de la estimación realizada evidencia que fue 1,07. El estadístico de Durbin-Watson prueba los residuos a fin de determinar si existe alguna significativa correlación que se base en el orden en que son presentados los datos en el archivo. Entonces, debido a que el valor P es superior a 5,0%, no hay indicaciones de auto correlación en serie en los residuos al 5,0% de nivel de significancia.

4.4.2. Efecto de Coeficientes de regresión para antioxidantes

Este panel expone la ecuación de regresión que fue ajustada a los datos. Dicha ecuación es la siguiente:

$$AA = -17629,58044 + 374,93891 * Temperatura - 14,78138 * Tiempo + 0,04146 * Pulsos + 0,151844 * temperatura * tiempo + 0,001565 * tiempo * pulsos - 1,98418 * temperatura * temperatura - 0,002206 * tiempo * tiempo - 0,002206 * pulsos * pulsos$$

donde, AA , actividad antioxidante, (Trolox CI 50 mg/100 mL aceite esencial)

T , temperatura de operación, (°C)

t , tiempo de operación, (min)

P , pulsos de vapor

Dónde el valor de cada variable es especificado en sus unidades originales, ello para que STATGRAPHICS centurión XVIII pueda evaluar la función.

Tabla 14. Coeficiente de regresión para antioxidantes.

Coeficiente	Estimación
Constante	-17629,58044
A: Temperatura	374,93891
B: Tiempo	-14,78138
C: Pulsos	0,04146
AB	0,151844
BC	0,001565
AA	-1,98418
BB	-0,002206
CC	-0,002206

4.4.3. Coeficientes en términos codificados.

Tabla 15. Coeficientes en términos codificados.

Factor	Coeficientes de estimacion	Df	Error estandar
Promedio	69,15	1	0,6142
A-Temperatura	3,7	1	1,16
B-Tiempo	-2,2	1	0,9462
C-Pulsos vapor	53	1	1,17
AB	10,45	1	2,54
BC	6,33	1	2,29
A ²	-5,08	1	1,96
B ²	-4,08	1	1,13
C ²	-3,66	1	1,78

Fuente: Statgrafics centurión XVIII

4.4.4. Efectos de estimación de resultados de antioxidante

Estos valores de rendimiento fueron generados utilizando el modelo ajustado. La Mesa por lo general suele incluir:

- (1) el valor observado de antioxidantes (en caso hubiese)
- (2) El valor predicho de Rendimiento empleando el modelo ajustado

Por lo general, cada uno de los elementos suele corresponder a los valores de los factores experimentales en una fila determinada del archivo de datos.

Tabla 16. Estimacion de resultados de antioxidantes

Fila	Valor observado	Valor predicho	Residual
1	61,07	60,97	0,1019
2	63,6	63,67	-0,0724
3	63,79	63,61	0,1751
4	70,49	69,42	1,07
5	70,51	69,69	0,8157
6	69,71	69,7	0,0058
7	65,44	66,51	-1,07
8	67,02	66,54	0,4782
9	67,88	69,03	-1,15
10	68,87	69,25	-0,3843
11	67,17	67,07	0,1047
12	68,57	69,38	-0,8091
13	69,58	69,01	0,5716
14	66,18	66,02	0,164

4.4.5. Efecto de optimización de respuesta

Esta tabla se expone la combinación de niveles de factor que maximiza los antioxidantes en la región indicada.

Objetivo: maximizar los antioxidantes

Valor optimo = 70,027

Tabla 17. Optimización de actividad antioxidante.

Nombre	Criterio	bajo	Alto	Valores Óptimos
A:Temperatura		96,7	99,9	99,163
B:Tiempo		72	158	108,773
C:Pulsos vapor		105	293	225,427
Actividad Antioxidante	Maximo	61,07	70,51	70,027
Error estandar de AA	Minimo	0,5412	1,06851	0,541
Deseabilidad				0,974

(AA: actividad antioxidante)

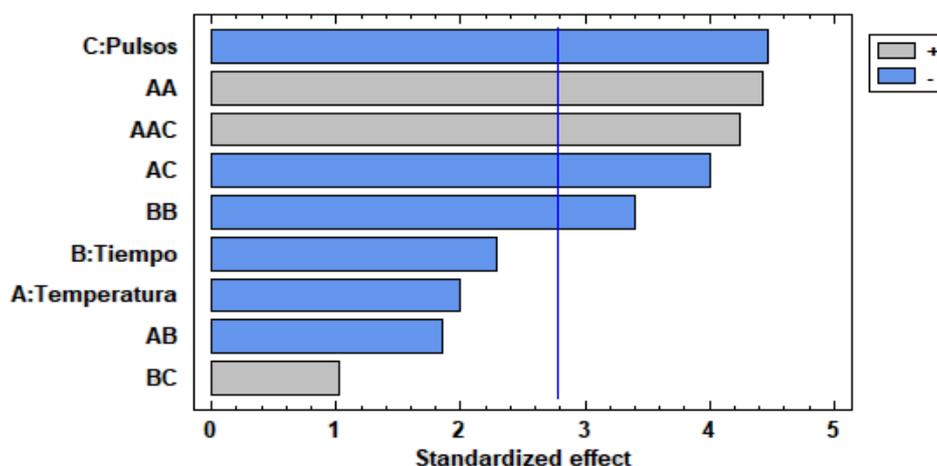


figura 23. Grafica de Pareto para actividad antioxidante.

En el diagrama de Pareto se encuentra expuesto en orden de relevancia el efecto que tiene cada factor analizado referente al grado de concentración del aceite esencial. En ese sentido, se puede observar que el factor C: Pulsos, generó un efecto superior en la concentración del aceite y fue de forma directamente

proporcional. Por otra parte, también se puede visualizar que el efecto de la interacción BB influye en baja proporción el efecto variable respuesta; sin embargo, otros factores como tiempo, temperatura no tuvieron efecto significativo.

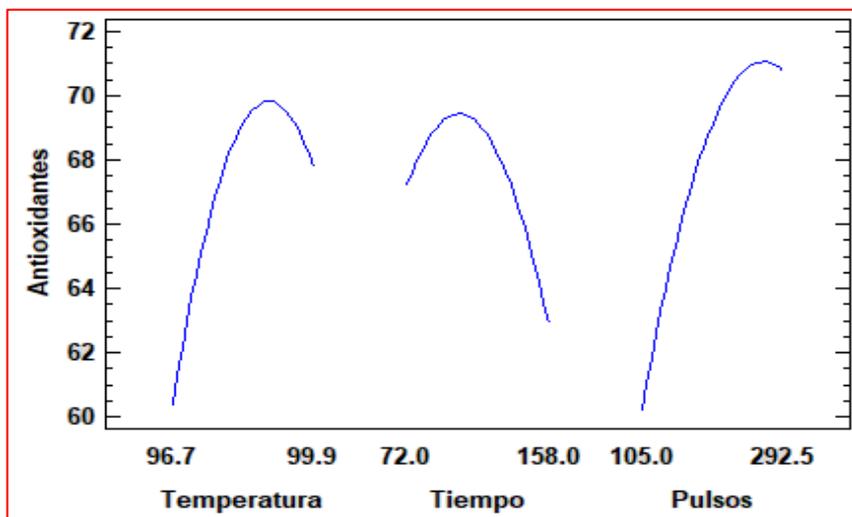


figura 24. Grafica de efectos principales

La grafica de efectos principales expone de forma separado el nivel de influencia que tiene cada uno de los factores con relación a la variable respuesta AA (Actividad antioxidante) que se expresa como área total del cronograma.

Se puede observar que el efecto temperatura varia de 96°C a 99°C, por lo tanto cuando la temperatura aumenta desde el 96°C la actividad antioxidante varia, pero también vuelve a subir hasta una temperatura de 99°C por lo tanto hay variación constante, en efecto principal de tiempo también varía, en cuanto a mayor pulsos la actividad antioxidante baja.

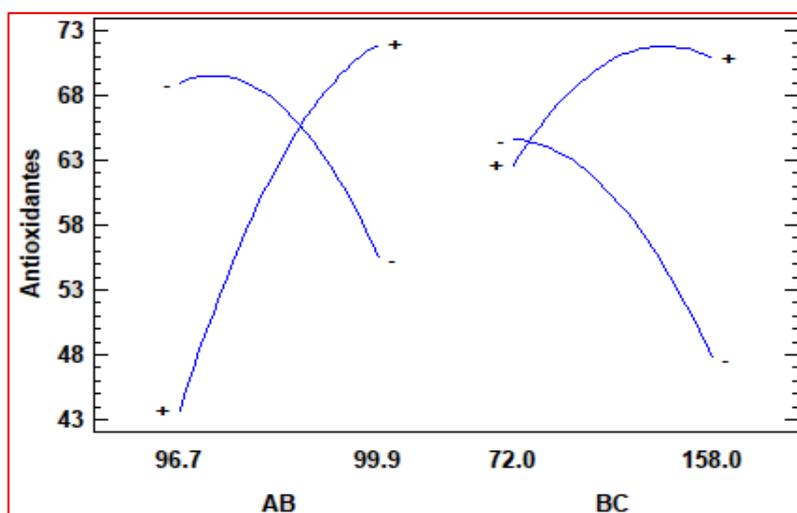


figura 25. grafica de interacción para actividad antioxidante

De acuerdo a la fig.25, se observa que cada uno de los puntos de la gráfica de interacción expone el tiempo de procesamiento medio con distintas combinaciones de nivel de cada factor. Según la gráfica, se da la existencia de una interacción entre cada factor cuando las líneas no son paralelas.

Por lo tanto, el análisis del aceite esencial extraído significa que la gráfica de interacción expone el impacto que tienen los dos factores que son (temperatura-tiempo y tiempo-pulsos) sobre la actividad antioxidante. La interacción temperatura-tiempo no tuvo efecto significativo sin embargo el efecto tiempo – pulsos si tuvo efecto significativo.

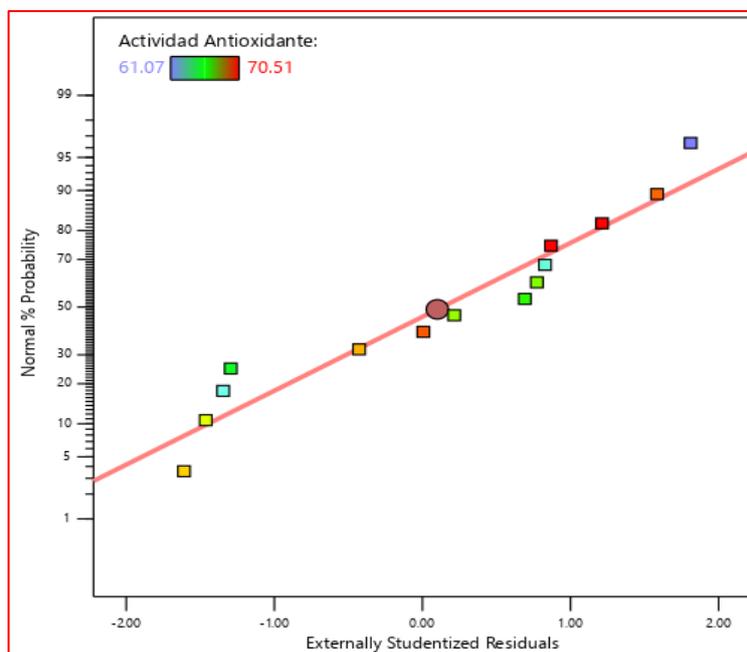


figura 26. Grafica de probabilidades de normalidad de antioxidantes

Esta gráfica permite determinar si los residuos siguen o no la distribución normal supuesta.

De acuerdo a la gráfica, cuando los puntos se encuentran a lo largo de una línea recta, se dice que los residuos siguen una distribución normal. Toda desviación uniforme de una línea recta es señal de una conducta no normal.

En el análisis realizado, no muestra ningún dato de anomalía motivo por el cual se llega a la conclusión de que no infringe la suposición de normalidad y que el análisis de extracción de aceite esencial es significativo.

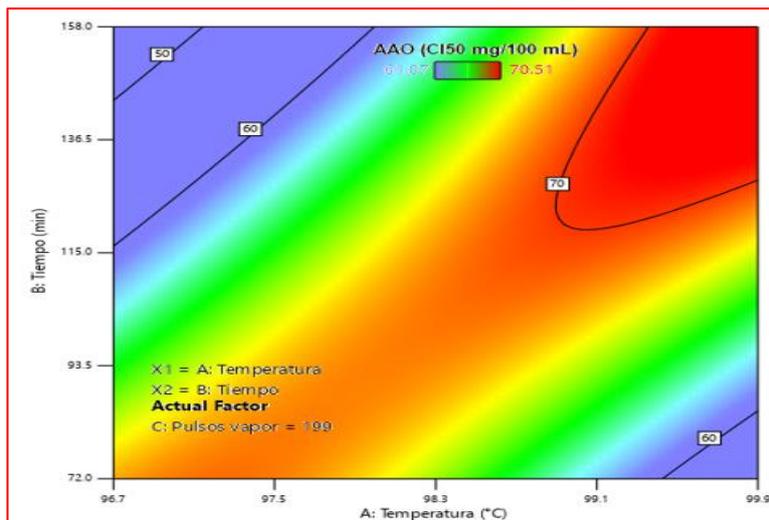


figura 27. Grafica de contornos de superficie respuesta

La gráfica de Contorno para la variable temperatura tiempo. La superficie de respuesta y la gráfica de contorno permiten hallar condiciones óptimas para la temperatura y tiempo de extracción.

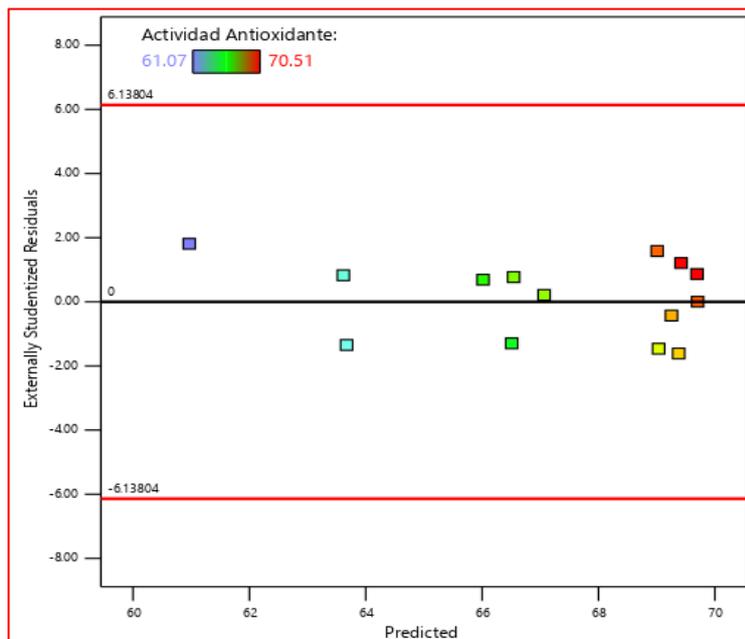


figura 28. Grafica de parcela residual de antioxidantes

Esta gráfica de parcela residual de antioxidante suele utilizarse para realizar la verificación del supuesto 28 de que los residuos se encuentran distribuidos de forma aleatoria y poseen una varianza constante. Lo esperado es que, los puntos se encuentren ubicados de forma aleatoria a los dos lados del cero (0), con patrones no detectables en cada punto. Por lo que significa que, los patrones que se

observan en la gráfica 29. De extracción de aceites esenciales, si cumplen con lo que supone el modelo.

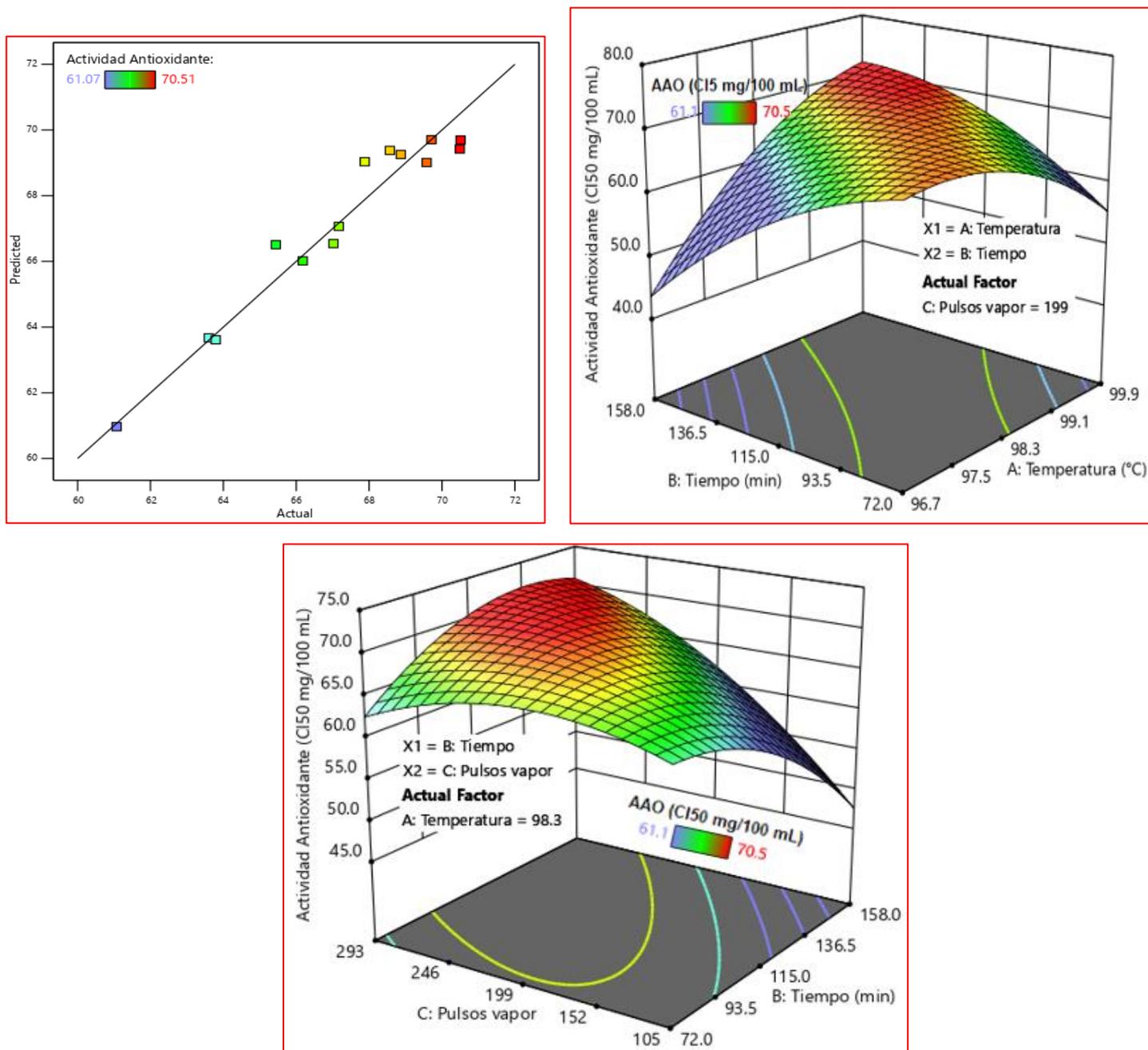


figura 29. Grafica de estimacion de superficie respuesta

La grafica representa una superficie de respuesta de un modelo polinómico de segundo grado, donde se representa la actividad antioxidante esperado (variable respuesta) en función de a: factor temperatura – tiempo; b: tiempo – pulsos.

Analizando la gráfica de superficie respuesta, nos indica que con la relación a: temperatura y tiempo nos da una actividad antioxidante de 70 y una temperatura de 98°C y de igual forma la relación tiempo y pulsos.

4.5. Características fisicoquímicas.

Para cada uno de los análisis realizados se agarró una muestra representativa del AE que se logró extraer a través del método de pulsos de vapor.

Para determinar la densidad se empleó un picnómetro cuya capacidad fue de 1 mililitro, la misma que de forma previa fue calibrado con agua destilada antes de dar inicio a la determinación.

En la tabla 18 se expone los resultados de densidad de cada muestra y la media.

Tabla 18. Densidades de aceite esencial extraído de cascara de naranja.

Numero de Muestras	% Densidad
AE1	0,845
AE2	0,841
AE3	0,725
AE4	0,644
AE5	0,810
AE6	0,820
AE7	0,829
AE8	0,825
AE9	0,841
AE10	0,829
AE11	0,833
AE12	0,835
AE13	0,824
AE14	0,832
AE15	0,83
AE16	0,827
Media	0,812

AE (Aceites Esenciales)

La densidad del AE que se obtuvo por pulsos de vapor se encuentra próxima al valor teórico reportado por la farmacopea de los EE. UU. de México, cuyo valor está comprendido entre 0,842-0,850.

Índice de refracción: con las diferentes muestras que se logró obtener se determinó el índice de refracción en un refractómetro de ABBE, llegándose a lograr los resultados siguientes:

Tabla 19. Determinación de índice de refracción de A.E.

Numero de Muestras	% índice de refracción
AE1	1,4676
AE2	1,4680
AE3	1,4675
AE4	1,4668
AE5	1,4668
AE6	1,4675
AE7	1,4680
AE8	1,4675
AE9	1,4675
AE10	1,4675
AE11	1,4676
AE12	1,4675
AE13	1,4676
AE14	1,4680
AE15	1,4680
AE16	1,4680
Media	1,4676

Los índices de refracción que se logró obtener muestran una similitud en el método pulsos de vapor de extracción, encontrándose comprendidos estos valores en el rango de 1,470 -1,476 que reportó la farmacopea herbolaria de los EE. UU de México.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el fin de lograr una mayor optimización del proceso de extracción de rendimiento de aceites esenciales que contiene la cascara de naranja dulce (*Citrus Sinensis* L. Osbeck.), se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR). Los resultados obtenidos de la investigación realizada llevan a las conclusiones siguientes:

- ❑ Las condiciones operativas óptimas de extracción para el rendimiento de aceite fueron las siguientes: tratamiento 8; temperatura de extracción 97 (°C), Tiempo de extracción 108 (min), Pulsos de vapor 207 (puls), para un rendimiento de 3,04%. Empleando la extracción por pulsos de vapor. Y a condiciones no optimas del proceso de extracción para el rendimiento de aceite esencial fueron lo siguiente: tratamiento 5; temperatura de extracción 99(°C), Tiempo de extracción 109(min), Pulsos de vapor 210 (puls), para un rendimiento de 0,5 %. Rendimiento el cual se identificó como muy bajo porcentaje.
- ❑ En comparación con el método convencional Clevenger se obtuvo un rendimiento máximo de 2,4119% con un tiempo de 240 (min), el cual se concluye que a comparación del método pulsos de vapor optimiza el porcentaje de rendimiento y por ser un equipo a escala industrial.
- ❑ En la evaluación de caracterización de las propiedades de densidad e índice de refracción en la extracción de aceite esencial de *Citrus Sinensis* L. Osbeck. que fueron analizados en los laboratorios de la UNAMAD, cuyo resultado coincide con lo reportado en la bibliografía por (López de la cruz & Caso Orihuela, 2015.) (rango de densidad 0,8 y 1,2 g/mL). Dicho resultado de aceite extraído a través del método pulsos de vapor y el método de referencia Clevenger posee una densidad de 0,812g/mL. En cuanto al análisis de índice de refracción reportado por (Franco Torres, 2015) (rango promedio de índice de refracción 1,47 a 20°C), dicho resultado del aceite esencial extraído por los métodos mencionados

anteriormente, posee una un índice de refracción de 1,4676 menor al rango promedio de dicha referencia bibliográfica. A causa de muchos factores como la materia prima, o el método empleado.

- ❑ En lo que respecta a la capacidad antioxidante, el método Clevenger tuvo mejor actividad antioxidante debido a las bajas temperaturas y presiones, sin embargo, el método pulsos de vapor no tuvo mejor actividad antioxidante debido a que se trabajó a altas temperaturas y presiones.

RECOMENDACIONES

- ❑ Para una mayor eficiencia en la extracción de aceites esenciales de cítricos es recomendable realizar por el nuevo método innovador extracción por método pulsos de vapor y manejar estrictamente las condiciones operativas de extracción ya que ayuda al incremento del porcentaje de rendimiento en el aceite esencial.
- ❑ En el análisis de la composición del aceite esencial de la naranja dulce es de suma importancia para la determinación de la calidad del aceite y sus componentes, entre ellos el componente mayoritario es el D-Limoneno con 99%, se recomienda utilizar los métodos de determinación densidad e índice de refracción para la pureza del aceite y el análisis de terpenos y terpenoides.

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

- Aguilera Ochoa, A. B. (2015). Destilación por arrastre de vapor como estrategia metodológica para fortalecer el aprendizaje sobre la obtención de aceites esenciales a partir de plantas medicinales y aromáticas, 1, 1–284. Retrieved from <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/15242>
- Baratta, M. T., & Giuseppe, R. (2000). Actividad antioxidante de componentes de aceites esenciales seleccionados en dos sistemas de modelos de lípidos. *Química de Los Alimentos*, 69(2), 167–174.
- Borja Espín, D. P., & Delgado Güiz, D. E. (2018). Evaluación del rendimiento, calidad y actividad antioxidante del aceite esencial de cáscara de naranja fresca de la especie *Citrus maxima* (Burm.) Merr. Familia Rutaceae, obtenido por dos métodos de extracción, 82.
- Briseño Perez, C. (2020). Espectrometría de masas, instrumentación y aplicaciones, 3(2), 1–4.
- Cedeño Sares, L. A., & Pizarro Carrión, R. A. (2015). Aplicación de aceite esencial de naranja para la reducción de microorganismos en canales de res faenada en el Camal de Paccha. *Article*, 2, 1–5.
- DRA, (Dirección Regional de Agricultura de MDD). (2020). PRODUCCION DE LOS PRINCIPALES CULTIVOS (t.) AÑO 2020*, 2.
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive, 10(3), 2588.
- Ferreira, S., & Bruns, R. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, 597(2), 179–186.
- Franco Torres, Y. L. (2015). Evaluación del proceso de extracción de aceites esenciales de hojas de *Citrus aurantifolia* (Limón sutil) *Citrus sinensis* (Naranja) y *Citrus nobilis* (Mandarina) mediante hidrodestilación. *Article*, 2, 1–44.
- Hernández Saavedra, D. (2007). Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana, 45(5), 477–484.
- León, G., Osorio, M., & Martínez, S. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*.
- Lopez de la cruz, R., & Caso Orihuela, N. (2015). Rendimiento y Composición Química de Aceites Esenciales de *Citrus Sinensis*, *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro, 2(1), 28–30.

- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*), 89(3), 411–420.
- Martínez Useche, Sonia Ruby. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L"., / (evaluar la composición química, propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la especie vegetal *Citrus sinensis* L, obtenidos mediante hidrodestilación e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas, así mismo realizar una comparación ent), 750.
- Meza Ipanaqué, E. I. (2017). Extracción y evaluación del aceite esencial de las cáscaras de la naranja dulce (*Citrus sinensis*), 63.
- Sepulveda Castaño, M. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum verum*), sobre la levadura (*rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada, 22(1), 1–23.
- Valdez Jiménez, Y. (2017). Optimización del rendimiento y determinación del contenido de limoneno del aceite esencial de flavedo de mandarina.
- Yáñez Rueda, L. M., & Parada Parada, L. (2005). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia), 5(1), 3–8.

ANEXOS

