

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA**

**FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA Y TEXTIL**



**TESIS**

**“EFECTO DE LA CURVA DE TEMPERATURA EN EL  
PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE  
NARANJA “*Citrus Sinensis*” ASISTIDO POR MICROONDAS  
LIBRE DE SOLVENTES EN SU RENDIMIENTO,  
COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN  
INGENIERÍA DE PROCESOS**

**ELABORADA POR:**

**CATHERINA RAQUEL CORDOVA FELANDRO**

**ASESOR:**

**Maestra TARSILA TUESTA CHAVEZ**

**LIMA, PERÚ**

**2020**

**DEDICATORIA:**

A mi mamá, Raquel F., por su cariño y amor incondicional, a mi hermana Lourdes por sus palabras de aliento, y a mi prometido Juan G., por el soporte, apoyo y ánimo brindado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a la M Sc. Tarsila Tuesta, por su valiosa asesoría y constante acompañamiento en esta tesis de maestría.

A los profesores de la maestría en Ingeniería en Proceso, por los conocimientos impartidos.

A la Dra. Karin Paucar, por las facilidades y buenos consejos brindados durante este proceso.

A la Ing. Nataly Sanchez, a los Sres. Cecilia y Nicolás, y a todos aquellos que aportaron a esta investigación.

## INDICE DE CONTENIDO

ABREVIACIONES .....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 Objetivos .....	12
1.1.1 Objetivo General.....	12
1.1.2 Objetivos Específicos.....	12
1.2 Hipótesis .....	12
1.2.1 Hipótesis nulas .....	12
1.2.2 Hipótesis alternativas .....	13
1.3 Justificación .....	13
1.4 Antecedentes .....	14
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	17
2.1 Definición y usos del aceite esencial .....	17
2.2 Aceite esencial de cítricos y naranja .....	19
2.3 Exportaciones e importaciones de aceites esenciales.....	21
2.4 Métodos de extracción .....	24
2.5 Aplicación de la extracción asistida por microondas en la industria química .....	26
2.6 Comparación entre los métodos de extracción asistida por microondas y la hidroddestilación.....	27
2.6.1 Comparación entre la HD y los MAE respecto al rendimiento en el tiempo .....	28
2.6.2 Transferencia de calor y masa durante la HD y los MAE.....	29
2.6.3 Comparación entre la HD y los MAE respecto a la temperatura en el tiempo .....	32
2.6.3.1 Comparación entre la HD y los MAE respecto al cambio estructural en la cáscara de naranja y las características organolépticas del aceite esencial extraído ..	34
2.7 Efecto de la temperatura, potencia, tiempo, agitación y humedad en la extracción de aceite esencial por microondas. ....	36
2.8 Consumo de energía y emisión de CO <sub>2</sub> .....	38
2.9 Actividad antimicrobiana según tipos de microorganismos .....	39
2.10 Mecanismos sugeridos de actividad antimicrobiana.....	40
2.11 Actividad antimicrobiana y composición de los aceites esenciales .....	44
CAPÍTULO III. MÉTODO EXPERIMENTAL .....	48
3.1 Extracción de aceite de cáscara de naranja por microondas libre de solvente (SFME)48	
3.2 Rendimiento de Extracción.....	51
3.3 Consumo de Energía .....	51

3.4 Emisión de CO <sub>2</sub> .....	51
3.5 Análisis Físicos .....	52
3.6 Análisis químicos.....	52
3.7 Actividad Antimicrobiana.....	53
3.8 Análisis Estadístico.....	53
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
4.1 Rendimiento de las Extracciones realizadas por SFME .....	55
4.2 Consumo de energía y emisión de CO <sub>2</sub> .....	63
4.3 Composición del aceite esencial .....	65
4.4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja .....	67
CAPÍTULO V. DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN PILOTO DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE NARANJA .....	73
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	82
6.1 Conclusiones.....	82
6.2 Recomendaciones .....	83
BIBLIOGRAFÍA .....	84
ANEXOS .....	90

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Valor exportado de aceites esenciales, resinoides, oleorresinas de extracción, disoluciones concentradas de aceite esencial, subproductos terpénicos, destilados acuosos aromáticos y disoluciones acuosas de aceite esencial en principales países (en miles de US\$) .....	21
<b>Tabla 2:</b> Valor importado de aceites esenciales, resinoides, oleorresinas de extracción, disoluciones concentradas de aceite esencial, subproductos terpénicos, destilados acuosos aromáticos y disoluciones acuosas de aceite esencial en principales países (en miles de US\$) .....	22
<b>Tabla 3:</b> Valor exportado de aceite esencial de naranja en principales países (en miles de US\$) .....	23
<b>Tabla 4:</b> Valor importado de aceite esencial de naranja en principales países (en miles de US\$) .....	24
<b>Tabla 5:</b> Comparación entre las propiedades organolépticas del aceite esencial obtenido por MAE y por HD a partir de cáscara de naranja .....	36
<b>Tabla 6:</b> Actividad antibacteriana de Citrus medica y limoneno contra los microorganismos comunes de deterioro y patógenos monitoreados por el ensayo de disco difusión.....	46
<b>Tabla 7:</b> Tratamientos desarrollados.....	49
<b>Tabla 8:</b> Tiempos de extracción, rendimiento e índice de refracción de los aceites esenciales obtenidos.....	59
<b>Tabla 9:</b> Consumo de energía (kW-h) y Emisión de CO <sub>2</sub> .....	63
<b>Tabla 10:</b> Composición química de los aceites esenciales de naranja .....	66
<b>Tabla 11:</b> Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de naranja obtenidos .....	69
<b>Tabla 12:</b> Lista de áreas requeridas.....	75
<b>Tabla 13:</b> Lista de equipos requeridos .....	76

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Rendimientos de aceite esencial extraído de cáscara de pomelo por HD durante 180 minutos y por SFME a diferentes niveles de potencia por 30 minutos (♦ HD, ■ SFME a 150 W, ▲ SFME a 300 W, ✕ SFME a 450 W ) .....	29
<b>Figura 2:</b> Proceso esquemático de la transferencia de calor y masa durante la hidrodestilación (HD), hidrodestilación asistida por microondas (MAHD), y la extracción por microondas libre de disolvente (SFME) de aceite esencial de las hojas de <i>Pogostemon cablin</i> .....	30
<b>Figura 3:</b> Perfil tiempo- temperatura de la extracción de aceite esencial de hojas de <i>Pogostemon cablin</i> por HD, MAHD y SFME .....	33
<b>Figura 4:</b> Vista por microscopio óptico (A-C x 40) y microscopio electrónico de barrido (D-F) de cáscaras de pomelos: Sin tratamiento (A y D), después de HD (B y E), después de SFME (C y F) .....	35
<b>Figura 5:</b> Consumo eléctrico de la hidrodestilación (HD), hidrodestilación asistida por microondas (MAHD y extracción asistida por microondas libre de solvente (SFME) del aceite esencial de hojas de <i>Pogostemon cablin</i> .....	39
<b>Figura 6:</b> Extracción por microondas libre de solvente (SFME) .....	49
<b>Figura 7:</b> Diagrama experimental .....	50
<b>Figura 8:</b> Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 800 W en función del tiempo .....	55
<b>Figura 9:</b> Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 800/ 400 W en función del tiempo .....	57
<b>Figura 10:</b> Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 400/ 800 W en función del tiempo .....	57
<b>Figura 11:</b> Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 400 W en función del tiempo .....	58
<b>Figura 12:</b> Curvas de temperatura en función del tiempo.....	62
<b>Figura 13:</b> Consumo de energía (kW-h) y Emisión de CO <sub>2</sub> .....	64
<b>Figura 14:</b> Diagrama de operaciones para la extracción de aceite esencial .....	74
<b>Figura 15:</b> Cuadro relacional de actividades .....	77
<b>Figura 16:</b> Diagrama relacional de actividades .....	78
<b>Figura 17:</b> Diagrama relacional de espacios .....	79
<b>Figura 18:</b> Diseño de una línea de producción piloto de aceite esencial a partir de cáscara de naranja.....	80
<b>Figura 19:</b> Flujos de personal, producto en proceso, material de envase/ empaque y producto en inspección.....	81

## INDICE DE ANEXOS

<b>Tabla 14:</b> Análisis de varianza (ANOVA) sobre el rendimiento de aceite esencial .....	9090
<b>Figura 20:</b> Gráfico de residuos para el rendimiento de aceite esencial.....	90
<b>Figura 21:</b> Análisis de Tukey para el rendimiento de aceite esencial.....	91
<b>Figura 22:</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 1 (800 W).....	92
<b>Figura 23:</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 2 (800/400 W).	93
<b>Figura 24:</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 3 (400/800 W).	94
<b>Figura 25:</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 4 (400 W).....	95
<b>Tabla 15:</b> Análisis de varianza (ANOVA) sobre la actividad antimicrobiana contra <i>Listeria Monocytogenes</i> .....	96
<b>Figura 26:</b> Gráfica de residuos para la actividad antimicrobiana contra <i>Listeria Monocytogenes</i> .....	96
<b>Figura 27:</b> Análisis de Tukey para la actividad antimicrobiana contra <i>Listeria Monocytogenes</i> .....	97
<b>Tabla 16:</b> Análisis de varianza (ANOVA) sobre la actividad antimicrobiana contra <i>Escherichia Coli</i> .....	97
<b>Figura 28:</b> Gráfica de residuos para la actividad antimicrobiana contra <i>Escherichia Coli</i> ...	98
<b>Figura 29:</b> Análisis de Tukey para la actividad antimicrobiana contra <i>Escherichia Coli</i> .....	98

## **ABREVIACIONES**

AE: Aceite esencial

AEs: Aceites esenciales

ESFME: Extracción por microondas libre de solventes mejorada

HD: Hidrodestilación

ITC: Centro de Comercio Internacional

MAE: Extracción asistida por microondas

MAHD: Hidrodestilación asistida por microondas

MHG: Hidrodifusión y gravedad por microondas

MP: Materia prima

PT: Producto terminado

SFME: Extracción por microondas libre de solventes

SPL: Planeamiento sistemático de la distribución

**EFEECTO DE LA CURVA DE TEMPERATURA EN EL PROCESO DE  
EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE NARANJA “*Citrus Sinensis*”  
ASISTIDO POR MICROONDAS LIBRE DE SOLVENTES EN SU  
RENDIMIENTO, COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

## **RESUMEN**

La extracción asistida por microondas (MAE por sus siglas en inglés) es una técnica relativamente nueva que ha recibido una atención creciente debido a su menor tiempo de extracción y consumo de energía, mayor rendimiento de compuestos de interés y menor consumo de disolvente. En la presente investigación se empleó la extracción por microondas libre de solventes (SFME por sus siglas en inglés) para la obtención de aceite esencial a partir de cáscara de naranja, a diferentes condiciones de potencia (400, 800 W, y sus combinaciones) y tiempo. El objetivo fue evaluar el efecto de la curva de temperatura- como consecuencia de las diferentes condiciones de potencia y tiempo- sobre el rendimiento del aceite esencial obtenido, así como sobre su composición y actividad antimicrobiana. Los más altos rendimientos de extracción correspondieron a los aceites sometidos a 400 W y a 800/400 W, siendo este último el que conllevó un menor gasto de energía y emisión de CO<sub>2</sub>. En general, todos los aceites presentaron los mismos compuestos mayoritarios (limoneno, β- mirceno, linalool y α- pineno), presentando 5 compuestos minoritarios adicionales el aceite sometido a 400 W, en cantidades menores a 0,23% cada uno. Sobre la actividad antimicrobiana, en general se detectó mayor actividad contra *Listeria Monocytogenes* respecto a *Escherichia coli* en todos los tratamientos, siendo los aceites obtenidos a 800/400, 400/800 y 400 W los que presentan similar y mayor actividad contra *L. Monocytogenes*, y los aceites obtenidos a 800, 800/400 y 400/800 los que presentan similar y mayor actividad contra *E. coli*. Finalmente, se tuvo como objetivo diseñar una línea de producción piloto de extracción de aceite esencial de cáscara de naranja por SFME, la cual se detalla en esta investigación.

## ABSTRACT

Microwave assisted extraction (MAE) is a relatively new technique that has received increasing attention due to its reduced extraction time and energy consumption, higher yield and lower solvent consumption. In the present investigation, solvent free microwave extraction (SFME) was used to obtain orange peel essential oil, at different power conditions (400, 800 W, and their combinations) and time. The aim was to evaluate the effect of the temperature curve- as consequence of the different power and time condition- on the yield, composition and antimicrobial activity of the essential oil obtained. The highest extraction yields were obtained using 400 and 800/400 W, corresponding the lower energy and CO<sub>2</sub> emission generated to the latter. In general, all the oils had the same major components (limonene,  $\beta$ - myrcene, linalool and  $\alpha$ - pinene), having additionally, the oil obtained at 400 W, five minor compounds, in amounts less than 0,23% each one. About the antimicrobial activity, in general, greater activity against *L. monocytogenes* was detected in comparison with *E. coli* in all the treatments, being the oils obtained under the power of 800/400, 400/800 and 400 W, the ones with similar and highest activity against *L. monocytogenes*; and the oils obtained under the power of 800/400, 400/800 and 400 W the ones with similar and highest activity against *E. coli*. Finally, the objective of designing a pilot production line for the extraction of essential from orange peel by microwave free of solvent (SFME), is detailed in the present investigation.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales de plantas aromáticas, son productos necesarios para diferentes industrias, como son la industria alimentaria y de bebidas, de cosméticos, perfumes, farmacéutica/ medicinal; teniendo aplicación terapéutica debido principalmente a sus propiedades antisépticas; como preservante de alimentos, por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes; e incluso como insecticidas y acaricidas (Kusuma y Mahfud, 2017).

Esto aunado a la actual tendencia creciente de consumo de productos naturales y con propiedades funcionales, hace de este producto una opción atractiva para el aprovechamiento en particular de plantas nativas con conocidas propiedades terapéuticas, así como de subproductos derivados de algunas industrias como son las cáscaras de cítricos; pudiendo obtener un producto de mayor valor agregado, y reduciendo a la par la generación de residuos sólidos con propiedades funcionales.

Sin embargo, los métodos convencionales para obtener aceite esencial, como la extracción por arrastre de vapor y la hidrodestilación, que involucran altas temperaturas, tiempos prolongados y altos consumos de energía; pueden ir en desmedro de los componentes bioactivos que éstos contienen (Li *et al.*, 2012).

Por otra parte, se cuenta con una técnica emergente que requiere menores tiempos de extracción y gastos de energía, y resulta en mejores rendimientos. Se trata de la extracción asistida por microondas (MAE) (Franco-Vega *et al.*, 2015), que incluso, es reconocida como una técnica que aumenta la calidad de los aceites esenciales y reduce el consumo de solventes, viéndose la contaminación y costos de recuperación de la muestra disminuidos. Estudios anteriores han revelado, sin embargo, que las condiciones de potencia y tiempo, tienen impacto en el rendimiento y características del aceite esencial a obtener (Kusuma y Mahfud, 2016).

En esta investigación, se estudió el proceso de extracción de aceite esencial de cáscara de naranja asistido por microondas libre de solventes a diferentes potencias (en una y dos etapas), evaluando el rendimiento de extracción del aceite esencial, su composición y su actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se diseñó una línea de producción piloto de extracción de aceite esencial a partir de cáscara de naranja por SFME.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

El objetivo de este trabajo es estudiar el proceso de extracción de aceite esencial de cáscara de naranja asistido por microondas libre de solventes a diferentes condiciones de potencia y tiempo (en una y dos etapas), y evaluar los efectos de la curva de temperatura en el tiempo (dada como consecuencia de la potencia y tiempo establecido en cada caso), en el rendimiento de extracción del aceite esencial, su composición y su actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se tiene como objetivo diseñar una línea de producción piloto de extracción de aceite esencial a partir de cáscara de naranja por SFME.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

Objetivo 1: Evaluar el efecto de la curva de temperatura durante el proceso de extracción, en el rendimiento del aceite esencial de naranja.

Objetivo 2: Evaluar el efecto de la curva de temperatura durante el proceso de extracción, en la composición del aceite esencial de naranja.

Objetivo 3: Evaluar el efecto de la curva de temperatura durante el proceso de extracción, en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja.

Objetivo 4: Diseñar una línea de producción piloto de extracción de aceite esencial a partir de cáscara de naranja por SFME.

## **1.2 Hipótesis**

### **1.2.1 Hipótesis nulas**

H<sub>0</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del aceite esencial.

H<sub>0</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, tiene un efecto significativo sobre la composición del aceite esencial.

H<sub>0</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, tiene un efecto significativo sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial.

### 1.2.2 Hipótesis alternativas

H<sub>1</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, no tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del aceite esencial.

H<sub>1</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, no tiene un efecto significativo sobre la composición del aceite esencial

H<sub>1</sub>: La curva de temperatura en el tiempo, no tiene un efecto significativo sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial.

## 1.3 Justificación

Cada año, el consumo de aceites esenciales aumenta aproximadamente 8-10%, no sólo en Indonesia, que es la fuente mundial productora de aceites esenciales, sino también en otros países. Esta tendencia se ve reforzada por la mayor demanda de aceite esencial por parte de la industria de perfumes, cosméticos y cuidado de la salud. También es impulsada por la orientación de los consumidores hacia productos naturales y con propiedades funcionales, como los aceites esenciales por ejemplo, o los productos que pueden contenerlos en su formulación (Kusuma y Mahfud, 2017).

Particularmente, Chen *et al.* (2016) afirma que los aceites esenciales producidos a partir de cáscara de cítricos, son generalmente reconocidos como seguros, y tienen un amplio espectro de bioactividades, tales como efectos antiinflamatorios y ansiolíticos.

Por otra parte, como consecuencia de los altos niveles de consumo de cítricos, se derivan grandes cantidades de subproductos, lo que plantea una serie de problemas (por ejemplo, desechos orgánicos, pérdida de valor económico); por lo que la producción de aceite esencial a partir de estos subproductos, es una opción para agregar valor a los mismos que permite también aprovechar sus propiedades funcionales, reduciendo además, los residuos orgánicos que pudieran generarse. El Instituto Nacional de Estadística e Informática (2019) revela que la producción nacional de naranja se ha incrementado en 13% entre el 2013 y 2017. En el 2017, la producción fue de 498,5 t, considerando que la cáscara representa en peso aproximadamente el 20% del total, el residuo de cáscara de naranja derivado de esta producción es de 99,7 t aproximadamente.

Sin embargo, el alto consumo de energía, tiempos prolongados de operación y su acondicionamiento previo de la materia prima implicados en los procesos de extracción convencionales; contribuyen a los elevados costos del aceite esencial producido y pueden resultar en un menor contenido de compuestos de interés como los sesquiterpenos por ejemplo, que son compuestos con diversas propiedades terapéuticas (Li *et al.*, 2012).

La presente investigación aplicada está orientada a estudiar un proceso de extracción asistido por microondas, que, según Kusuma y Mahfud (2017), es catalogado como un “método verde”, que hace posible obtener aceite esencial a un menor costo, ya que involucra menor cantidad de operaciones unitarias, mano de obra, energía y tiempo; y conservando a su vez la mayor cantidad de compuestos de interés en comparación a otros métodos convencionales; lo cual puede verse reflejado entre otras características, en su composición y actividad antimicrobiana.

Se ha demostrado que la extracción por microondas es una técnica eficiente respecto a los métodos tradicionales. Dentro de este proceso, las condiciones de extracción son cruciales para el performance del mismo, así como para el rendimiento final del producto (Bustamante *et al.*, 2016).

Por lo mencionado, se propone estudiar el comportamiento de la extracción por microondas, en una y dos etapas, con el objetivo de evaluar el efecto de la curva de temperatura en el tiempo respecto al rendimiento, composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la cáscara de naranja.

## **1.4 Antecedentes**

Los métodos de extracción con microondas han tenido un fuerte impacto en la eficiencia de diversos procesos en la industria química, farmacéutica y de alimentos. Las técnicas de extracción verde están diseñadas para obtener productos naturales no desnaturalizados a partir de materiales vegetales, a la vez que ahorran energía, favorecen la seguridad y reducen las operaciones unitarias y los costos de mano de obra. La extracción por microondas es un ejemplo de un método de extracción verde que se ha aplicado para adquirir aceites esenciales (Chen *et al.*, 2016).

Li *et al.* (2012) estudiaron la extracción por microondas del aceite esencial (AE) de *Dryopteris fragrans* y su actividad antioxidante, logrando un rendimiento máximo de extracción del 0,33% en condiciones óptimas de tiempo de extracción 34 min, potencia de irradiación 520W y humedad 51%. Estos autores mencionan que la SFME es un protocolo alternativo prometedor para la obtención de aceites esenciales (AEs) a partir de materiales vegetales.

Qi *et al.* (2014) investigaron la extracción por microondas sin solvente (SFME) del AE a partir de las hojas de arveja y su actividad antibacteriana. Los parámetros óptimos fueron: tiempo de extracción 44 min, potencia de irradiación 660 W y humedad 68%, con rendimiento de extracción de 0,330 (% p / p). Los principales componentes fueron sesquiterpenos (72,89%). El AE mostró una actividad antimicrobiana más fuerte contra *Bacillus subtilis* y *Propionibacterium acnes*. A partir de estos resultados, los autores concluyeron que el método SFME es una excelente alternativa para la producción de AE de arveja, y de igual manera, que este aceite es una fuente potencial de antimicrobianos naturales.

Lucchesi *et al.* (2006) estudiaron la extracción por microondas sin solvente (SFME) del AE de cardamomo (*Elletaria cardamomum L.*). Las semillas de cardamomo tratadas por SFME y HD fueron observadas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micrografías proporcionan más evidencia de la destrucción de las semillas de cardamomo tratadas con SFME, en contraste con la destilación hidráulica convencional.

Kusuma y Mahfud (2017) sometieron las hojas de *Pogostemon cablin* a hidrodestilación asistida por microondas (MAHD) y extracción por microondas sin solventes (SFME), respectivamente. Al realizar una comparación entre MAHD y SFME respecto al método tradicional de hidrodistilación (HD); observaron que los métodos asistidos por microondas poseen grandes ventajas sobre los métodos alternativos tradicionales: tiempos de extracción más cortos (66 min para MAHD y 45 min para SFME versus 417 min para HD); rendimientos casi iguales (2,177% para MAHD y 2,374% para SFME versus 2,622% para HD); menor consumo eléctrico relativo (1,509 kW-h / g EO para MAHD y 0,417 kW-h / g EO para SFME frente a 13,821 kW-h / g EO para HD); y menores cantidades relativas de emisiones de CO<sub>2</sub>

(1,207 kg CO<sub>2</sub> / g EO para MAHD y 0,334 kg CO<sub>2</sub> / g EO para SFME versus 11,056 kg CO<sub>2</sub> / g EO para HD).

Bustamante *et al.* (2016), aplicaron la hidrodestilación asistida por microondas (MAHD) para procesar AE de residuos húmedos de cáscara de cítricos, obteniendo un rendimiento de  $1,8 \pm 0,1\%$  (en base seca) para la elaboración de AE de naranja *Navel Navelate*. Al aplicar un método convencional (hidrodestilación) para la producción del mismo aceite, obtuvieron un rendimiento de  $1,7 \pm 0,1\%$  (en base seca).

Liu *et al.* (2018), concluyeron que la SFME funciona mejor que la hidrodestilación convencional para la obtención de AE de hojas de *Cinnamomum camphora*; respecto a la eficiencia de extracción ( $3,51 \pm 0,12\%$  en 23 min versus  $3,35 \pm 0,10\%$  en 240 min), capacidad de extracción (3,67% versus 3,51%), contenido de compuestos oxigenados (83,93% versus 74,81%), consumo de energía (0,22 kW-h versus 4 kW-h) e impacto ambiental (177,87 g CO<sub>2</sub> versus 3200 g CO<sub>2</sub>). Con estos resultados se mostró que el proceso SFME es un método eficiente, que ahorra tiempo, energía y es ecológico; representando un protocolo alternativo con gran potencial, preferible a la técnica tradicional de extracción de AE de *C. camphora* y otras matrices de plantas.

De igual manera, Chen *et al.* (2016) procesaron cáscaras de pomelo bajo el método de extracción por microondas sin solvente (SFME), encontrando que la SFME fue superior al método de hidrodestilación convencional (HD) en términos de eficiencia de extracción y rendimiento. El análisis de cromatografía para ver la composición química, mostró que la SFME no alteró la calidad de los AEs.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Definición y usos del aceite esencial**

El aceite esencial (AE), comúnmente conocido como aceite volátil, es un compuesto fluido, que puede ser extraído de diversas partes de las plantas, como raíces, cortezas, tallos, hojas, frutos, semillas o flores; por lo general por arrastre con vapor. El aceite esencial producido a partir de plantas aromáticas es un producto de exportación, necesario para diferentes industrias, como la industria de alimentos y bebidas, de perfume, cosméticos y productos farmacéuticos/ medicinales (Kusuma y Mahfud, 2017).

Los aceites esenciales de plantas naturales, han exhibido ampliamente propiedades antioxidantes, antirradicales y antibacterianas. Ahora, han sido ampliamente utilizados como ingredientes funcionales en las industrias alimentaria y farmacéutica. La capacidad antibacteriana de los AEs es la razón de su amplia aplicación en diversos alimentos y bebidas para alargar su tiempo de vida en anaquel (Lou *et al.*, 2017), evitar entre otras cosas, problemas relativos a la salud, olores y/o sabores desagradables, problemas en la textura o cambios en el color que básicamente son causados por los sistemas enzimáticos o metabólicos de los microorganismos principales que resultan en la alteración de alimentos (Viuda- Martos, *et al.*, 2008). La creciente demanda de los consumidores de aditivos naturales en lugar de sintéticos hace que los aceites esenciales sean altamente solicitados debido a sus propiedades naturales (Lou *et al.*, 2017).

Respecto al ámbito farmacéutico, Verica y Petar (2014) señalan que los problemas relacionados a la aplicación de antibióticos convencionales, que incluyen resistencia antimicrobiana, problemas ambientales, cancerogenicidad, efectos colaterales y altos costos; ha reforzado la tendencia de remplazar antimicrobianos sintéticos con agentes alternativos naturales. Productos a base de plantas están entre los agentes alternativos examinados en orden de remplazar antibióticos convencionales.

La mayor ventaja de los AEs es, al ser considerados seguros (GRAS), su uso en cualquier alimento, siempre que sus efectos máximos se consigan con el mínimo cambio en las cualidades organolépticas de los alimentos. Estas propiedades

antimicrobianas están vinculadas a la presencia de sustancias bioactivas como flavonoides, terpenos, cumarina y carotenos (Viuda- Martos, *et al.*, 2008).

Sirocchiet *et al.* (2016) por ejemplo, obtuvieron que una buena forma de extender el tiempo de vida de la carne de vacuno, hasta quince días; fue envasando la misma con aceite esencial de romero y con altas concentraciones de O<sub>2</sub>. Adicionalmente, el uso de AE de romero combinado con diferentes condiciones atmosféricas, influyó positivamente en el parámetro de color. Hautea *et al.* (2017) afirma que el AE de canela mostró un buen performance como tratamiento antibacteriano en carne de cerdo envasada al vacío.

La aplicación de AEs actualmente afronta diversos desafíos; particularmente, cuando los AEs se aplican en un sistema alimentario real con fines de conservación o aromatización, los disolventes orgánicos no pueden, obviamente, utilizarse como diluyentes o vehículos de suministro. En aplicaciones prácticas no se recomienda un solvente orgánico en alimentos. Por ende, se deben considerar otros vehículos compatibles con los alimentos, preferiblemente sistemas a base de agua. Esto último se ve cuestionado debido a la baja solubilidad de los AEs. Por lo tanto, la formulación de sistemas coloidales a base de agua capaces de transportar y suministrar AE a los alimentos se investiga ampliamente en la actualidad (El-Sayed, Chizzola y Rama, 2016).

Lou *et al.* (2017), observó que la nanoemulsificación del aceite esencial de *Citrus medica L. var. sarcodactylis* aumenta significativamente la actividad antioxidante, antibacteriana y antibiótica del aceite esencial. Por otra parte, el AE nanoemulsificado exhibe una eficacia mucho mayor en la inhibición de las bacterias en tofu que el aceite esencial puro, indicando una mejor perspectiva de aplicación de nanoemulsiones de AE. Por lo tanto, la nanoemulsificación proporciona una excelente manera de mejorar significativamente la actividad y de los agentes activos liposolubles, y amplía considerablemente su aplicación en diversos alimentos acuosos.

Por su parte, Artiga-Artiga, Acevedo- Fani y Martín- Belloso (2017) afirman que la combinación de fibra de mandarina con propiedades prebióticas y alginato sódico permitió la formación de nanoemulsiones estables cargadas con aceite esencial de orégano, capaces de actuar como recubrimientos comestibles sobre piezas de queso. De este modo, la incorporación de fibra a los recubrimientos puede convertirse en una

alternativa interesante para aumentar el valor nutricional de las piezas de queso recubiertas. Además, la estabilidad microbiana de las piezas de queso se ve mejorada con los revestimientos comestibles con al menos 2,0% p/ p de AE de orégano; resultando esto eficaz en la descontaminación de patógenos externos tales como *Staphylococcus aureus*, y conservando a su vez la apariencia del queso; consecuentemente, la adición del revestimiento en mención extendió vida útil del queso. En base a estos resultados se puede dilucidar las ventajas potenciales que tiene el uso de AE de orégano como antibacteriano natural dentro de los revestimientos comestible, donde se desempeña como preservante y mejora la seguridad, calidad y las características nutricionales del queso bajo en grasa y altamente perecedero.

En el comercio, se considera que el aceite esencial tiene un papel estratégico para producir productos primarios y secundarios, tanto para las necesidades domésticas como para las de exportación (Kusuma y Mahfud, 2017).

## **2.2 Aceite esencial de cítricos y naranja**

Los cítricos son los frutos más cultivados en el mundo, siendo las naranjas el 60% de la producción mundial de frutas (Razzaghi *et al.*, 2018). Las naranjas son una de las frutas más cultivadas mundialmente, cuya producción estimada en el 2017 fue de 66 millones de toneladas. El 50% de las naranjas aproximadamente, son usadas para la producción de jugos. Se generan grandes cantidades de subproductos, incluyendo cáscaras, semillas y pulpas (Razzaghi *et al.*, 2018).

La cáscara de naranja, dependiendo de la variedad de naranja, puede representar el 45% del volumen total (Franco-Vega *et al.*, 2015). Las melazas de cítricos, los aceites terpénicos, el ácido cítrico, las pectinas y los aceites esenciales son los principales productos recuperados de los residuos de procesamiento de naranja (Razzaghi *et al.*, 2018).

Las cáscaras de frutas son las que poseen la mayor cantidad de los aceites esenciales cítricos. Estas cáscaras son, por lo general, descartadas como residuos. Por esta razón, los AEs de cítricos podrían ser producidos a un precio más asequible respecto a otros AEs de plantas (Lin *et al.*, 2010). El aceite esencial extraído de cáscaras de naranja

contiene una mezcla de compuestos volátiles como terpenos y derivados oxigenados como aldehídos, alcoholes y ésteres (Razzaghi *et al.*, 2018).

Los aceites cítricos esenciales son a menudo extraídos por métodos tradicionales que exigen altos costos de energía, tiempos de extracción largos y reactivos adicionales (Bustamante *et al.*, 2016). Bousbia *et al.* (2008) afirman que los AEs más empleados mundialmente son los cítricos. Son usados como aromatizantes, saborizantes en diversos productos alimenticios, que incluye las bebidas alcohólicas y no alcohólicas, dulces y gelatinas. En las industrias farmacéuticas son empleadas como agentes saborizantes para enmascarar sabores desagradables de medicinas. En perfumería y cosmético, se usan en diversas preparaciones.

Se ha reportado, que los aceites esenciales cítricos, además de ser usados como fragancias, poseen actividades antibacteriales contra *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, y *Vibrio vulnificus* (Lin *et al.*, 2010). También se ha demostrado que aceites esenciales de limón, naranja, y bergamota, poseen efectos bactericidas contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, y *Acrobacter butzlei* en líquidos y alimentos. Adicionalmente, actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, han sido reportados (Lin *et al.*, 2010).

También se ha reportado actividad antifúngica de varios cítricos como limón (*Citrus lemon L.*), mandarina (*Citrus reticulata L.*), pomelo (*Citrus paradisi L.*), y naranja (*Citrus sinensis L.*). Los resultados de Lin *et al.* (2010) mostraron que el extracto de aceite esencial de naranja podría inactivar efectivamente *V. parahemolyticus*, *S. typhimurium*, y *E. coli* en superficies que están en contacto con alimentos (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Guo *et al.* (2018), reporta que, de catorce aceites esenciales obtenidos de diferentes variedades de cítricos, éstos están compuestos de terpenos (siendo los más abundantes), alcoholes, aldehídos, esteroides, cetonas, ácidos y una cantidad pequeña de otras sustancias. Todas las muestras contienen d-limoneno (39,77- 80,13%),  $\alpha$ -pineno (1,83- 13,97%), mircenolol (0,8-7,63%), ocimeno (0,01-4,52%) y linalool (0,13-8,52%) como composición principal.

## 2.3 Exportaciones e importaciones de aceites esenciales

En base a lo publicado por el Centro de comercio internacional (ITC por sus siglas en inglés) (2019), se observa que entre el 2014 y 2018 las exportaciones a nivel mundial se han incrementado en un 33,7% y las importaciones en 45,8%. Entre los principales países exportadores están India, Estados Unidos, Francia, China y Brasil; y entre los principales países importadores están Estados Unidos, Francia, Alemania, India y Reino Unido (ver Tabla 1 y 2).

**Tabla 1**

*Valor exportado de aceites esenciales, resinoides, oleorresinas de extracción, disoluciones concentradas de aceite esencial, subproductos terpénicos, destilados acuosos aromáticos y disoluciones acuosas de aceite esencial en principales países (en miles de US\$)*

Exportadores	Valor exportado en 2014	Valor exportado en 2015	Valor exportado en 2016	Valor exportado en 2017	Valor exportado en 2018
Mundo	4462833	4842300	4686943	5450576	5968524
India	606221	572995	607726	786269	859415
Estados Unidos de América	566551	598495	634744	729606	800233
Francia	366936	355857	397012	471814	522111
China	594871	793598	423524	353410	469176
Brasil	228609	256877	339048	431217	437220
Reino Unido	267655	243714	218628	277144	247155
Argentina	119500	224655	196838	203718	244185
Alemania	173876	177307	191524	219207	227562
Indonesia	156301	179905	166380	160368	199266
España	125795	125807	124928	161836	197237
Italia	145616	132492	137498	161857	189622
México	126565	137558	144926	160897	146258
Bulgaria	51242	62413	66548	103691	118093
Países Bajos	52640	63757	66315	78682	81560

Fuente: ITC (2019)

**Tabla 2**

*Valor importado de aceites esenciales, resinoides, oleorresinas de extracción, disoluciones concentradas de aceite esencial, subproductos terpénicos, destilados acuosos aromáticos y disoluciones acuosas de aceite esencial en principales países (en miles de US\$)*

Importadores	Valor importado en 2014	Valor importado en 2015	Valor importado en 2016	Valor importado en 2017	Valor importado en 2018
Mundo	4159103	4425582	4607288	5395222	6063412
Estados Unidos de América	858081	987623	1064404	1269446	1376067
Francia	376819	380911	387558	444469	515952
Alemania	308413	318964	355509	418333	441070
India	159914	160506	212284	272228	388064
Reino Unido	306498	326138	285067	334917	340639
China	221099	228330	189290	204405	250003
Indonesia	122403	114912	129440	136213	211109
Japón	171466	155689	174622	179666	208898
Singapur	133225	132687	150511	169791	187943
Países Bajos	88373	90695	108753	153188	186927
Suiza	137358	138462	138803	158500	172647
Canadá	109863	117822	130768	170357	163554
Irlanda	73729	146529	131473	140384	159844
España	121430	136733	125419	147426	159276

Fuente: ITC (2019)

Se observa una tendencia similar en cuanto a las exportaciones e importaciones de aceite esencial de naranja, habiendo un incremento de 68,6% y 95,4% respectivamente entre el 2014- 2018. Entre los principales países exportadores están Brasil, Estados Unidos, México, Alemania y Reino Unido, y entre los principales países importadores están Estados Unidos, Alemania, Japón, Reino Unido y China (ver Tablas 3 y 4).

**Tabla 3***Valor exportado de aceite esencial de naranja en principales países (en miles de US\$)*

Exportadores	Valor exportado en 2014	Valor exportado en 2015	Valor exportado en 2016	Valor exportado en 2017	Valor exportado en 2018
Mundo	365298	420396	502898	631869	615789
Brasil	111682	133397	194208	242367	258056
Estados Unidos de América	94385	91040	88007	105321	113916
México	15500	21995	34795	63602	51464
Alemania	25332	29977	36744	46026	43988
Reino Unido	24413	18250	19605	24757	23319
Italia	9358	8817	10874	12851	14746
España	5145	5737	8447	14362	14595
Costa Rica	6445	6706	10871	14941	14223
Canadá	7148	12680	17998	17560	13616
Francia	5760	6715	7000	9442	9806
Irlanda	5676	5960	6255	10399	8284
Paraguay	4736	8471	9523	8604	8046
Suiza	7738	5176	7151	12646	7708
Sudáfrica	4489	10415	6142	5088	6298

Fuente: ITC (2019)

En el Perú, las exportaciones e importaciones de aceites esenciales y similares han alcanzado un valor de 12406 y 4451 miles de US\$ respectivamente. Específicamente, las importaciones de aceite esencial de naranja han incrementado en un 47,8% entre el 2014- 2018; alcanzando un valor importado de 1567 miles de US\$, principalmente de Brasil, Reino Unido y Estados Unidos (ITC, 2019).

**Tabla 4***Valor importado de aceite esencial de naranja en principales países (en miles de US\$)*

Importadores	Valor importado en 2014	Valor importado en 2015	Valor importado en 2016	Valor importado en 2017	Valor importado en 2018
Mundo	342634	396803	489485	639034	669436
Estados Unidos de América	64291	77793	118425	162989	172254
Alemania	72650	88816	101629	131941	127813
Japón	18658	20108	23198	35773	44964
Reino Unido	21104	23408	24614	30510	34378
China	18510	20533	21798	28643	33041
Francia	14023	15616	20708	26492	28013
Irlanda	15695	16210	16566	21329	25861
India	6697	12626	19628	22512	25848
Singapur	9672	11776	15287	23085	25565
Canadá	15266	15953	14476	20205	16858
Suiza	9447	9344	9768	14099	15842
Países Bajos	6532	8994	10944	16176	15117
España	6430	8354	10299	13035	14734
Indonesia	6029	6078	10280	10309	12358

Fuente: ITC (2019)

## 2.4 Métodos de extracción

Franco-Vega *et al.* (2015) afirman que uno de los factores fundamentales que determinan la calidad de los AEs es la técnica de extracción. Según Bousbia *et al.* (2008), una de las formas convencionales de extraer aceites esenciales cítricos es por prensado en frío de sus cáscaras. El aceite está presente en los sacos o glándulas de aceites localizadas a diferentes profundidades en la piel y la cutícula de la fruta. El aceite de la piel y la cutícula es removido mecánicamente por prensado en frío y como el prensado frío produce una emulsión acuosa, esta emulsión es luego centrifugada para separar el aceite esencial. La destilación también es usada en algunos países como una forma económica de recuperar los aceites.

La extracción por arrastre con vapor, hidrodestilación y destilación-extracción simultánea, son los procesos más aplicados para la obtención de AEs. Es sabido que los métodos tradicionales usados para la extracción de AEs de matrices vegetales tienen desventajas vinculadas principalmente con la calidad del aceite a producir. Se pueden encontrar pérdidas de algunos compuestos volátiles, baja eficiencia de extracción, degradación de compuestos insaturados o éster a través de efectos térmicos o hidrolíticos y residuos de disolvente tóxico en el extracto usando estos métodos de extracción (Costa *et al.* 2014, Kusuma y Mahfud, 2017, Lucchesi *et al.*, 2007). Además, estos métodos consumen largos tiempos y elevadas temperaturas de proceso, lo que frecuentemente resulta en pérdidas de calor debido a la descomposición de compuestos termolábiles e hidrolizables y la volatilización del aceite. Más aún, pérdidas parciales de compuestos más polares en el aceite esencial pueden ocurrir debido a la afinidad por el agua durante la HD. Usualmente, HD resulta en bajos rendimientos de aceite esencial (Wei *et al.*, 2018).

Los métodos convencionales tienen pocos parámetros ajustables para controlar la selectividad del proceso. La técnica de extracción con fluidos supercríticos constituye un método selectivo y rápido para la producción de AE de plantas aromáticas. Sin embargo, el alto costo de elaboración de productos específicos ha limitado su explotación (Li *et al.*, 2012).

Kusuma y Mahfud (2016) explican que los procesos térmicos convencionales están limitados a las tres formas estándar de calentamiento, por convección, conducción y radiación. En la práctica, la conducción es un proceso lento, que limita las velocidades prácticas de calentamiento de las extracciones y de los materiales vegetales en los extractores. Se han buscado métodos alternativos en los que el calor se suministra utilizando otras técnicas. En éstos, el calor es generado por el material *in situ* como resultado de la interacción con un campo externo. Este campo puede ser aplicado por algún campo eléctrico externo. El mejor ejemplo de proceso de generación de calor es el calentamiento por microondas, en el cual se utilizan campos eléctricos externos. En el calentamiento por microondas se pasa un campo de alta frecuencia a través del material vegetal, estimulando las frecuencias vibratorias de los enlaces químicos para calentar el material.

Recientemente, se ha tenido una mayor demanda creciente de nuevas tecnologías de proceso (Kusuma y Mahfud, 2016; Bousbia *et al*, 2008) debido al incremento de precio de energía y la iniciativa por reducir la emisión de CO<sub>2</sub> (Bousbia *et al*, 2008) ; Franco-Vega *et al.* (2015) menciona que entre las nuevas técnicas de extracción de sustancias naturales que se está evaluando, que suelen utilizar menos disolvente y energía, están la extracción por fluidos supercríticos, la extracción por ultrasonido, la extracción asistida por microondas y la extracción sub-crítica de agua. Entre estas tecnologías emergentes, la extracción asistida por microondas (MAE) ha mostrado muchas ventajas como conveniencia, menor tiempos de procesamiento y alta eficiencia.

## **2.5 Aplicación de la extracción asistida por microondas en la industria química**

La radiación de microondas es utilizada como fuente de calentamiento de la mezcla muestra- disolvente durante el proceso de extracción (Franco-Vega *et al.*, 2015). El proceso se basa en el calor generado por conducción iónica y/o rotación dipolar, y su eficiencia depende de las propiedades dieléctricas del material. La extracción ocurre cuando el agua dentro de la planta absorbe energía proveniente de las microondas y aumenta la presión dentro del material, lo que hace que la estructura celular se rompa permitiendo que el solvente penetre en la matriz (Costa *et al.*, 2014).

Franco-Vega *et al.* (2018), menciona adicionalmente que, cuando se utiliza la energía microondas, el campo electromagnético interactúa con las moléculas de polisacárido y la humedad presente, causando la rotura de la pared, lo cual es un factor clave para la extracción de metabolitos secundarios. Adicionalmente, más rápidas velocidades de calentamiento mejoran la hidrólisis de enlaces éter de celulosa- que constituye el principal componente de la pared celular de la planta- y la liberación del AE.

Por causa de los efectos particulares de las microondas sobre la materia, esto es, la rotación dipolar y la conductancia iónica; el calentamiento por este método es instantáneo y se da al interior de la muestra, lo que resulta en extracciones rápidas. La principal ventaja del MAE reside en su mecanismo de calentamiento; la aceleración de la extracción puede explicarse en parte por el efecto específico de las microondas sobre el material vegetal (Franco-Vega *et al.*, 2015) debido a su interacción con las

moléculas de agua al interior de las células; sin embargo, la no uniformidad de la distribución de calor constituye un inconveniente importante (Franco-Vega *et al.*, 2018).

Investigaciones anteriores han demostrado que la extracción por microondas es un método alternativo que se puede desarrollarse aún más debido al alto nivel de pureza del producto, al uso mínimo de solventes y al corto tiempo de procesamiento (Kusuma y Mahfud, 2017), además de su alta eficiencia y bajo consumo de energía; lo cual indica que la extracción por microondas podría ampliarse desde el laboratorio a una escala industrial (Chen *et al.*, 2016).

De igual manera Kusuma y Mahfud (2016) afirman que el proceso con microondas es reconocido como técnica eficiente, que puede disminuir enormemente el tiempo de extracción, aumentar el rendimiento y la calidad de los AEs, disminuir los costos de preparación del material, el consumo de disolventes y la contaminación.

## **2.6 Comparación entre los métodos de extracción asistida por microondas y la hidrodestilación**

Bousbia *et al.* (2009), afirma que el método de hidrodifusión y gravedad por microondas (MHG) ofrece ventajas importantes sobre alternativas tradicionales como: menores tiempos, impacto ambiental (el costo de energía es mayor en el caso de HD que el requerido para MHG), características más limpias (como que no hay generación de residuos y no se usa agua o solventes), incrementa la actividad antimicrobiana, incrementa la actividad antioxidante y provee un aceite esencial más valioso (con mayor cantidad de compuestos oxigenados). Esto ofrece también la posibilidad de una mejor reproducción de aroma natural. Más aún, el procedimiento produce aceites esenciales que pueden ser analizados o utilizados directamente sin ninguna etapa de limpieza, intercambio de solvente o centrifugación.

Se ha mostrado que los nuevos métodos asistidos por microondas (MAE), como son la hidrodestilación asistida por microondas (MAHD) y la extracción por microondas libre de solventes (SFME); son métodos rápidos y eficientes para elaborar aceites esenciales de plantas medicinales. MAHD es un método avanzado de HD que hace uso de un horno de microondas. La eficiencia de MAHD depende fuertemente del valor de

la constante dieléctrica del agua y de la matriz. SFME combina la calefacción por microondas y la destilación en seco a presión atmosférica sin adición de disolvente o agua. A diferencia de MAHD, SFME no emplea una gran cantidad de agua. SFME ha sido empleado para obtener AEs de comino, anís, semilla de cardamomo y laurel (Kusuma y Mahfud, 2016).

La extracción por microondas libre de solvente (SFME) se fundamenta en la mezcla de calentamiento por microondas y destilación, y se realiza a presión atmosférica. Este método involucra colocar el material vegetal en el microondas. El calentamiento interno del agua *in situ* dentro del material vegetal suelta al mismo y hace que las glándulas y receptáculos oleíferos estallen. Por ende, este proceso libera aceite esencial que es arrastrado por el agua *in situ* del material vegetal (Lucchesi *et al.*, 2007).

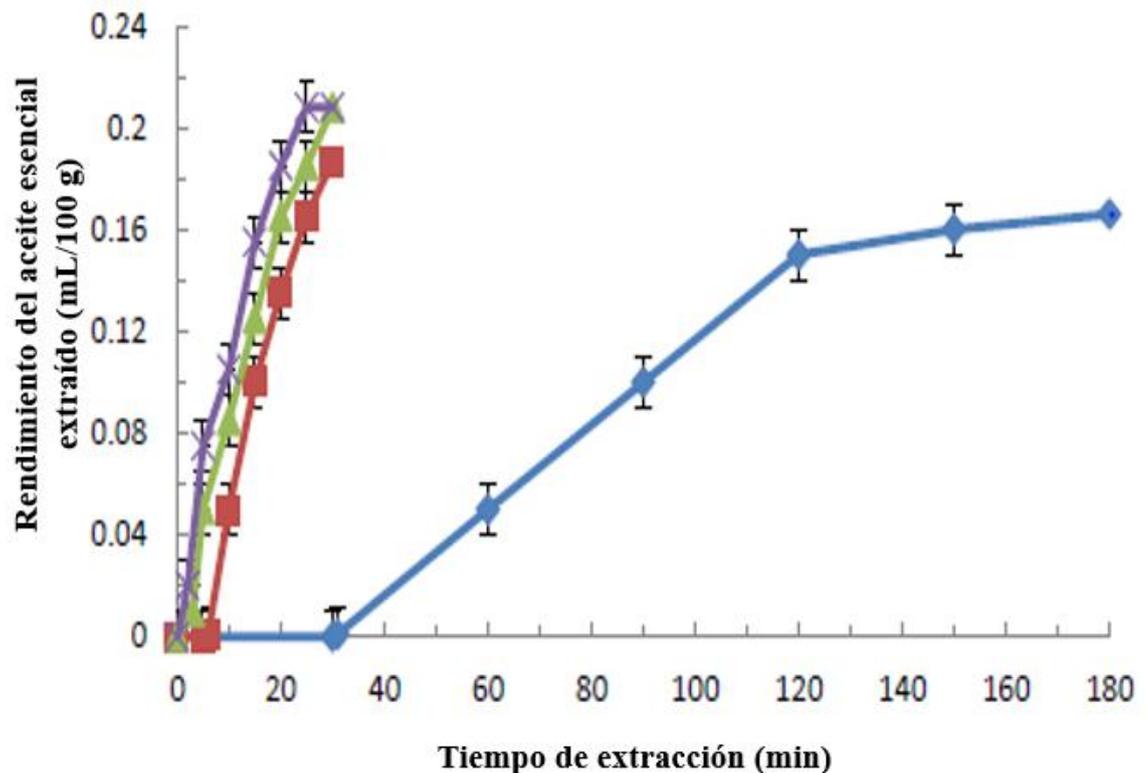
El vapor pasa posteriormente por un condensador externo a la cavidad del microondas donde es condensado. El destilado es recolectado continuamente en un matraz receptor. El aceite esencial es colectado directamente y secado sin adicionar ningún paso de extracción por solvente. SFME ha sido empleada para obtener aceites esenciales de diferentes materiales (Lucchesi *et al.*, 2007).

Al realizar un estudio sobre la SFME en un microondas piloto de 75 litros de capacidad, Filly *et al.* (2013), mencionan que esta técnica es más rápida, más eficaz y tiene un enfoque más respetuoso en lo que al medio ambiente se refiere; por lo que SFME es una herramienta prometedora para la producción de AEs de plantas aromáticas respecto a la hidrodestilación tradicional. Así también, un contenido más alto de compuestos oxigenados, que son más odoríferos que los hidrocarburos monoterpénicos, se muestra en SFME; teniendo esta técnica aplicabilidad potencial en la industria.

### **2.6.1 Comparación entre la HD y los MAE respecto al rendimiento en el tiempo**

Kusuma y Mahfud (2016), tras la elaboración de AE de hojas de *P. cablin* por tres métodos (HD, MAHD y SFME), afirman que una de las diferencias más pronunciadas entre los métodos por microondas (MAHD y SFME) y la hidrodestilación, es la capacidad del proceso MAE para incrementar el rendimiento de extracción

rápidamente en un corto tiempo. Un comportamiento similar fue observado por Chen *et. al* (2016) durante el procesamiento de aceite esencial de pomelo por HD y SFME (ver Fig. 1)

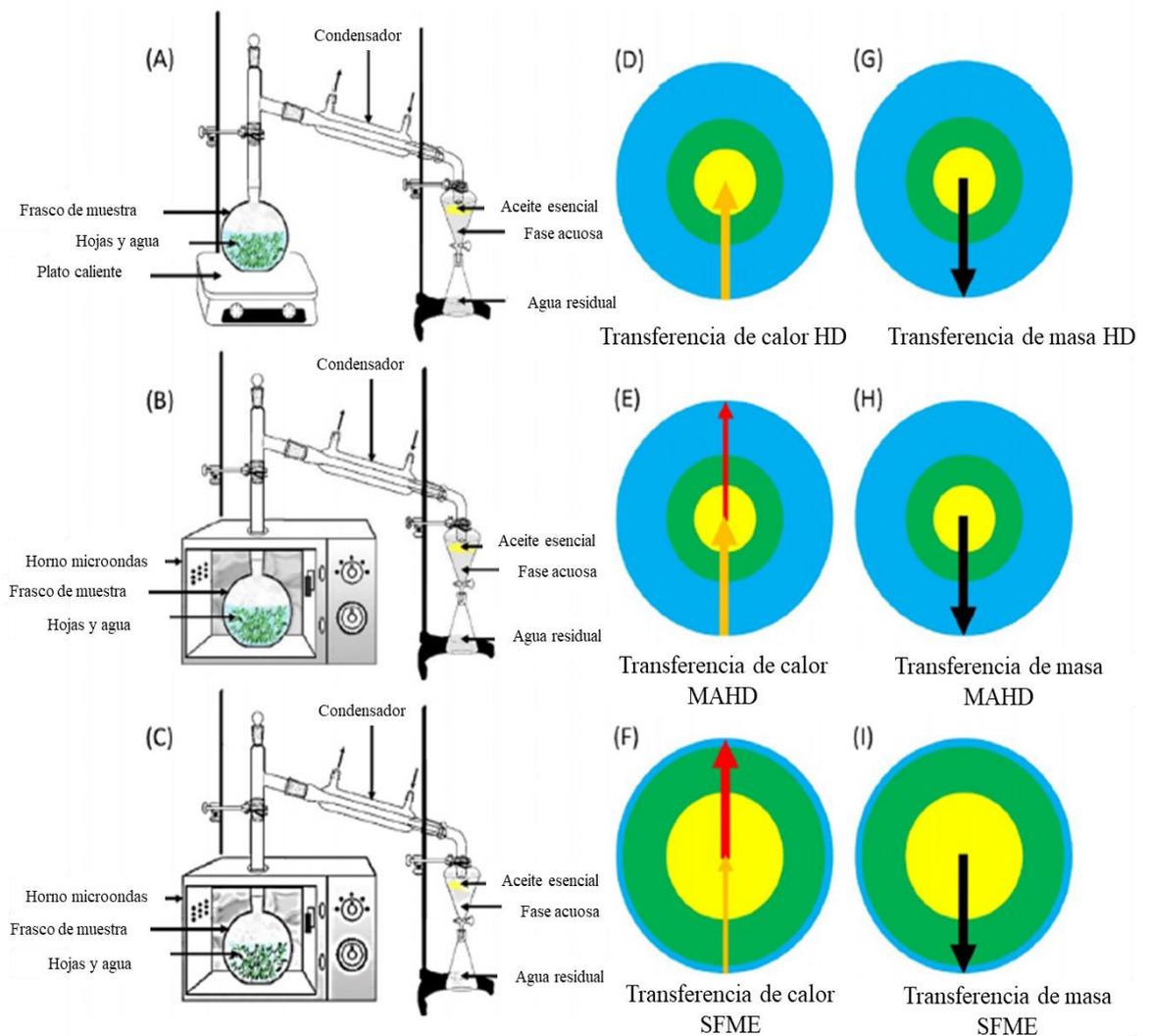


**Figura 1:** Rendimientos de aceite esencial extraído de cáscara de pomelo por HD durante 180 minutos y por SFME a diferentes niveles de potencia por 30 minutos (♦ HD, ■ SFME a 150 W, ▲ SFME a 300 W, × SFME a 450 W )

Fuente: Chen *et. al* (2016)

### 2.6.2 Transferencia de calor y masa durante la HD y los MAE

En la Figura 2 G-I, se muestra que la transferencia de masa ocurre desde el interior hacia el exterior en las extracciones por HD, MAHD y SFME. La tasa de transferencia de calor difiere entre la MAE (MAHD y SFME) y la HD. En el caso de la HD, la transferencia de calor tiene lugar desde el exterior (medio de calentamiento) hacia el interior de la muestra; debido, exclusivamente, a la conducción y la convección que se da a través del agua que rodea las hojas de *P. cablin* (Fig. 2 D).



**Figura 2:** Proceso esquemático de la transferencia de calor y masa durante la hidrodestilación (HD), hidrodestilación asistida por microondas (MAHD), y la extracción por microondas libre de disolvente (SFME) de aceite esencial de las hojas de *Pogostemon cablin*

Fuente: Kusuma y Mahfud (2016)

No obstante, es posible afirmar que el mecanismo de extracción de AE por MAHD, es debido en parte, al calentamiento interno *in situ* del agua bajo la irradiación de microondas desde el interior hacia el exterior de las hojas de *P. cablin*, y también principalmente debido a la transferencia de calor desde el exterior hasta el interior, similar al caso de HD (Fig. 2 E).

En la SFME, la transferencia de calor se da parcialmente desde el exterior hacia el interior de las hojas de *P. cablin*, y principalmente desde el interior hasta el exterior; lo que facilita la difusión de aceite desde el interior de las hojas vía vapor y aumenta

el rendimiento, debido a la combinación sinérgica de dos fenómenos de transferencia - calor y masa - que actúan en la misma dirección (es decir, desde el interior hacia el exterior) (Fig. 2F).

Bousbia *et al.* (2009) tuvieron observaciones similares, mencionando que, las microondas se distribuyen volumétricamente (el calor se disipa volumétricamente dentro del medio irradiado) y las transferencias de calor ocurren desde la muestra al ambiente más frío. En el calentamiento tradicional, la transferencia de calor depende de la diferencia de temperatura a través de la muestra, de la conductividad térmica y, para los fluidos, de las corrientes de convección. Como resultado, el incremento de temperatura suele ser bastante lento. No obstante, en el calentamiento por microondas, por causa del efecto de calentamiento volumétrico, se pueden dar aumentos de temperatura mucho más rápidos, dependiendo de la potencia del microondas y del factor de pérdida dieléctrica de la matriz que se está irradiando.

El proceso de SFME resulta en un calentamiento interno significativo, creando así, presiones internas mucho más altas que impulsan el estallido de las glándulas y la extracción de AE de las hojas de *P. cablin* (Kusuma y Mahfud, 2016). Esto está de acuerdo a lo reportado por Farhat *et al.* (2010), que extrajeron AEs de semillas de alcaravea usando la difusión en seco por microondas y gravedad. Estos autores mencionan que el mecanismo de extracción de AE por difusión en seco y gravedad por microondas, se debe en parte al calentamiento interno de las moléculas de AE bajo la irradiación de microondas desde el interior hacia el exterior de las semillas de alcaravea sin agua *in situ* y también parcialmente a una sinergia de los dos fenómenos de transferencia - calor y masa- que actúan en la misma dirección.

Megawati *et al.* (2019) explican que la transferencia de masa de aceites de sólidos a líquido, durante la obtención de AEs, se experimenta en 2 fases. Las fases son la difusión de aceite desde el interior de las partículas sólidas a la superficie (método controlado por difusión), y la transferencia de masa desde la superficie a las soluciones (modelo de transferencia de masa controlado por película).

Según Kusuma y Mahfud (2016), en la primera etapa de la curva de extracción, el aceite está disponible de forma libre para su obtención; esta primera parte lineal del proceso es también llamada fase de equilibrio. Estos mismos autores explican que la cantidad de AE fácilmente accesible en las hojas de *P. clavin* es igual en cualquier

método de extracción de la muestra, a pesar de que la interacción entre planta y disolvente (agua) con microondas puede elevar la velocidad de inicio del proceso y que el único proceso de transferencia de masa que altera la velocidad de extracción de aceite es la difusión de AE desde el núcleo de la partícula hasta la región de células rotas, que se promueve mediante el calentamiento por microondas.

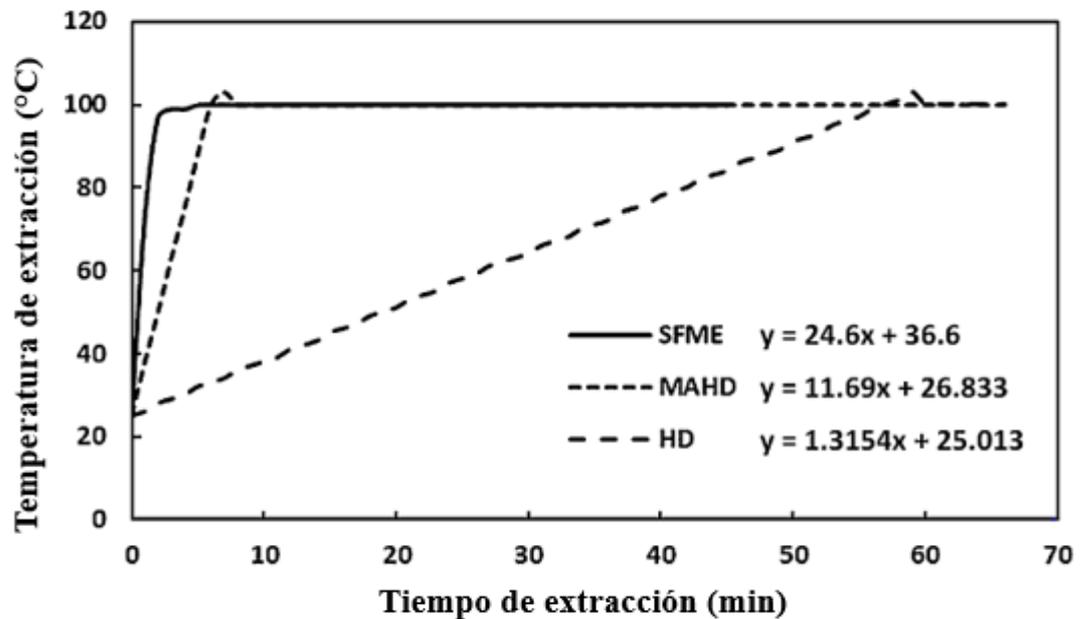
De igual manera, Franco-Vega *et al.* (2015) mencionan que en el proceso de extracción de AE de la cáscara de naranja asistido por microondas, la difusión de soluto desde las células internas es el proceso que define la velocidad de extracción; ya que, según los parámetros del modelo que obtuvieron, la transferencia de masa en fase sólida fue la única fase significativamente ( $p < 0,05$ ) afectada por las características de la muestra.

Kusuma y Mahfud (2016), explican que el modelo de transferencia de calor y masa se ve afectado por los métodos de extracción, lo que indica que en la extracción de AE de *P. clavin* con HD convencional, la velocidad de calentamiento y la fase de transferencia de masa en fase sólida (desde la fase de equilibrio) tardan más en comenzar que los métodos MAE (SFME y MAHD), y entre éstos últimos, MAHD tarda más tiempo. Estos mismos autores mencionan que el calentamiento por microondas facilita la difusión (y extracción) del AE, ya que permite incrementar la velocidad de calentamiento entre el material vegetal y el disolvente (agua), facilitando así la extracción de AE.

### **2.6.3 Comparación entre la HD y los MAE respecto a la temperatura en el tiempo**

En la extracción de AE con microondas (MAHD y SFME) la temperatura se eleva más rápidamente consumiendo menos tiempo que la HD convencional. Por ende, si la extracción se realiza con calentamiento convencional, se prolonga el tiempo para alcanzar la temperatura final, y la energía perdida es mayor. Adicionalmente, en la extracción de AE por SFME, la temperatura se eleva más rápido, requiriendo menos tiempo que la MAHD. Por consiguiente, cuando se aplica la extracción de AE por SFME, la interacción entre la planta y el microondas puede aumentar más la velocidad a la que comienza el proceso, que la interacción entre planta y disolvente (agua) con microondas cuando se usa la extracción de AE con MAHD. Por ende, cuando se utiliza la extracción de AE con microondas (MAHD y SFME), la velocidad de calentamiento de la planta y el disolvente (agua) es mayor y, por consiguiente, las pérdidas son más

bajas (uso más efectivo de energía) que la HD convencional (Ver Fig. 3). A partir de esta observación se puede inferir que, aunque el calentamiento dieléctrico es un fenómeno volumétrico (el calentamiento ocurre de adentro hacia afuera), y por lo tanto más rápido, el uso eficiente de la energía electromagnética está vinculado a la cuidadosa evaluación de las posibles pérdidas de energía en el sistema (Kusuma y Mahfud, 2016).



**Figura 3:** Perfil tiempo- temperatura de la extracción de aceite esencial de hojas de *Pogostemon cablin* por HD, MAHD y SFME

Fuente: Kusuma y Mahfud (2016)

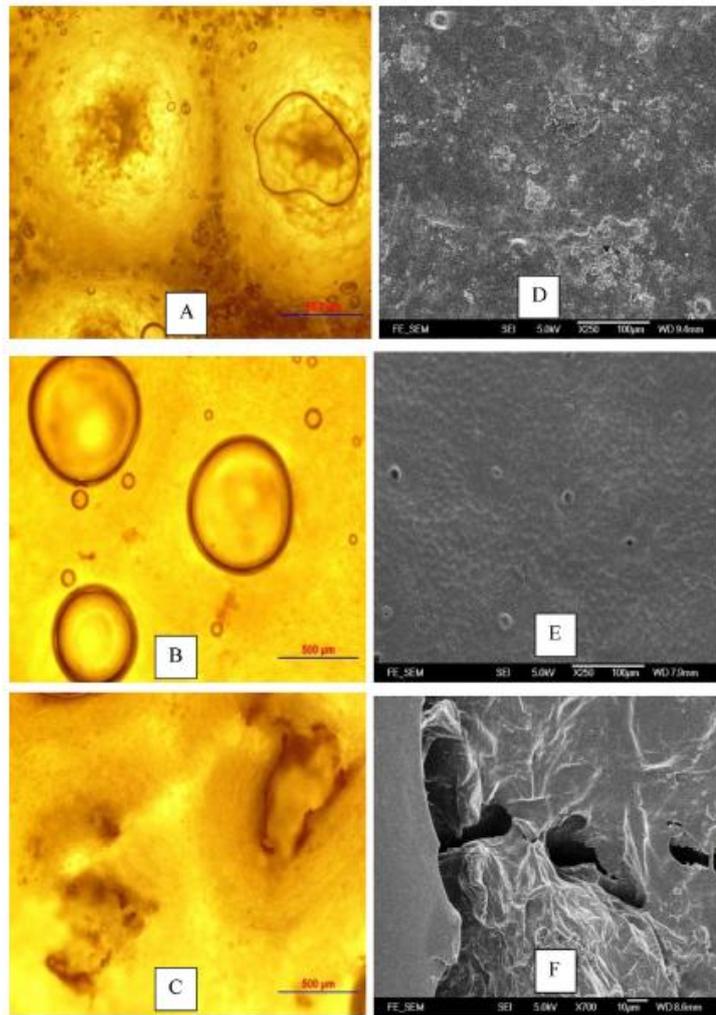
Kusuma y Mahfud (2016) señalan que el método empleado sólo influye en el tiempo de extracción del AE, siendo mayor la necesidad de tiempo en la HD tradicional que en los métodos por microondas (MAHD y SFME). Las mejores condiciones para reducir este tiempo (que está relacionado con los costos de extracción) se dieron utilizando el SFME. Para la extracción de aceite de una matriz con alto contenido de agua, esto es, alta pérdida dieléctrica; se pueden realizar aislamientos eficaces utilizando sólo microondas sin añadir ningún disolvente ni agua. Esto se puede dar gracias a que el agua dentro de la matriz es calentada localmente. Las microondas interactúan con las moléculas libres de agua que están en los sistemas vasculares y en las glándulas de la planta. Por lo tanto, tales sistemas sufren una expansión dramática,

con posterior ruptura del tejido, permitiendo que el AE fluya hacia la capa de agua. Esto se basa también en la capacidad de los componentes del AE para disolverse en agua. La solubilización es entonces el paso limitante y la solubilidad se convierte en el parámetro esencial que induce la extracción selectiva por microondas. Además, cuando se utiliza extracción de AE con SFME, los AE contienen compuestos orgánicos que tienen un momento dipolar alto, interactuando más vigorosamente con microondas y pudiéndose extraer más fácilmente que los compuestos aromáticos que tienen momentos dipolares bajos.

### **2.6.3.1 Comparación entre la HD y los MAE respecto al cambio estructural en la cáscara de naranja y las características organolépticas del aceite esencial extraído**

Sobre los cambios estructurales tras la obtención del AE, en la Figura 4 (B y E), se aprecia que la cáscara de pomelo posee sacos de aceite encogidos aún intactos después de la HD durante 180 minutos a 100 °C. Sin embargo, después del proceso de SFME a 150 W por 90 minutos (Fig. 4 C y F), los sacos de aceite intactos no fueron observados y una superficie desordenada apareció debido a la ruptura de los sacos de aceite. Tal cambio indica una presión acumulada dentro de las glándulas de aceite excediendo su capacidad de expansión, rompiéndose fácilmente cuando son sometidas a la irradiación por microondas. Esto implica que el microondas puede realmente afectar la estructura del tejido de la cáscara y causar cambios superficiales, mientras que la extracción convencional no puede (Chen *et al*, 2016).

Observaciones similares fueron realizadas por Bousbia *et al.* (2009), tras la obtención de AE de romero por HD y MHG, y por Li *et al.* (2012), después de la producción de AE de *D. fragans* por HD y SMFE.



**Figura 4:** Vista por microscopio óptico (A-C x 40) y microscopio electrónico de barrido (D-F) de cáscaras de pomelos: Sin tratamiento (A y D), después de HD (B y E), después de SFME (C y F)

Fuente: Chen *et al.* (2016)

Así también, Ferhat *et al.* (2006), menciona que el microondas parece causar la ruptura de las células y glándulas más rápidamente que en la hidrodestilación convencional. La Tabla 5 muestra una comparación entre las propiedades organolépticas del AE de naranja extraído por MAE y por HD, que estos mismos autores realizan.

**Tabla 5**

*Comparación entre las propiedades organolépticas del aceite esencial obtenido por MAE y por HD a partir de cáscara de naranja*

<b>Propiedades organolépticas</b>	<b>MAE</b>	<b>HD</b>
Color	Sin color	Amarillo pálido
Olor	Fresco, ligero y un olor cítrico dulce	Fresco, acre pero diferente que al fruto fresco
Aspecto	Líquido móvil	Líquido móvil

Fuente: Ferhat *et al.* (2006)

## **2.7 Efecto de la temperatura, potencia, tiempo, agitación y humedad en la extracción de aceite esencial por microondas.**

Franco-Vega *et al.* (2015) afirma que las condiciones de la muestra determinan el rendimiento de extracción, mientras que la potencia de microondas afecta el tiempo de extracción. Según Chen *et al.* (2016), el aumento de la potencia de los microondas puede provocar un comienzo más temprano de la extracción, ya que cuando se aplica mayor potencia al sistema de extracción, se transfiere más energía a la matriz de la muestra, mejorando así el rendimiento de los compuestos objetivo. Sin embargo, los resultados implican que, sobre una potencia de microondas determinada, no se podría conseguir una mejora adicional en el rendimiento de extracción. Así pues, Megawati *et al.* (2019), afirman que, la biodegradación de los compuestos del AE, origina posiblemente, la disminución en el rendimiento de AE procesado a 800 W.

Chen *et al.* (2016), observaron que a una temperatura de extracción de 106 °C o más, tiene lugar la degradación térmica del aceite esencial de pomelo. De igual manera, mencionan que condiciones extremas de proceso, especialmente altas temperaturas, pueden resultar en efectos negativos como por ejemplo, la degradación térmica del aceite esencial y, según Liu *et al.* (2018), la carbonización de materiales vegetales. Liu *et al.* (2018) observaron que el incremento de potencia de irradiación por microondas

(de 120 a 540 W) incrementa el rendimiento de aceite esencial alcanzando un límite bien definido, y el uso de una potencia de irradiación por encima de 540 W resulta en una ligera disminución en el rendimiento.

Bustamante *et al.* (2016) afirma por su parte que es necesario un tiempo de irradiación corto a una potencia alta, usando la cantidad mínima de agua adicional para una extracción eficiente del aceite por MAHD. Bajo estas condiciones, los rendimientos y la composición de los AEs extraídos de diversos cítricos fueron semejantes a los de la literatura.

Franco-Vega *et al.* (2018), mencionan que la relación sólido: líquido, así como la agitación, fueron las variables de proceso con más alto impacto en el rendimiento de AE de laurel. La agitación incrementa la distribución de energía microondas en la muestra. Estos mismos autores obtuvieron que la presencia de agitación durante la extracción por microondas no afectó las curvas típicas de extracción, pero incremento la velocidad de extracción. En efecto, la presencia de agitación se traduce en una ventaja significativa no solo por mejorar la eficiencia del proceso en términos de rendimiento y consumo de energía, sino por mejorar las cinéticas de extracción.

Puesto que el agua sobrecalienta localmente el medio y fomenta la liberación del analito objetivo, ciertas investigaciones señalan que, emplear muestras de alta humedad durante el proceso de extracción por microondas, incrementa los rendimientos de extracción. Sin embargo, el contenido de agua en la matriz debe ajustarse de modo que las cinéticas de extracción se intensifiquen y los resultados obtenidos sean reproducibles (Franco-Vega *et al.*, 2018). Liu *et al.* (2018) menciona al respecto que el bajo contenido de humedad resulta en una velocidad de evaporación relativamente baja, que, por lo tanto, resulta en una extracción ineficiente, mientras un alto contenido puede resultar en la hidrólisis de algunos componentes y disolución en agua.

Entre otros factores, Wei *et al.* (2018) afirman que la temperatura del aceite esencial en el colector es casi tan elevada como la de la base del aparato tipo Clevenger, durante la extracción por SFME. Por lo tanto, la temperatura del aceite esencial en el colector aún se mantiene en un nivel alto. Como resultado, la volatilización de aceite esencial es acelerada, y la reacción térmica de compuestos termolábiles e hidrolizables podría ocurrir.

## 2.8 Consumo de energía y emisión de CO<sub>2</sub>

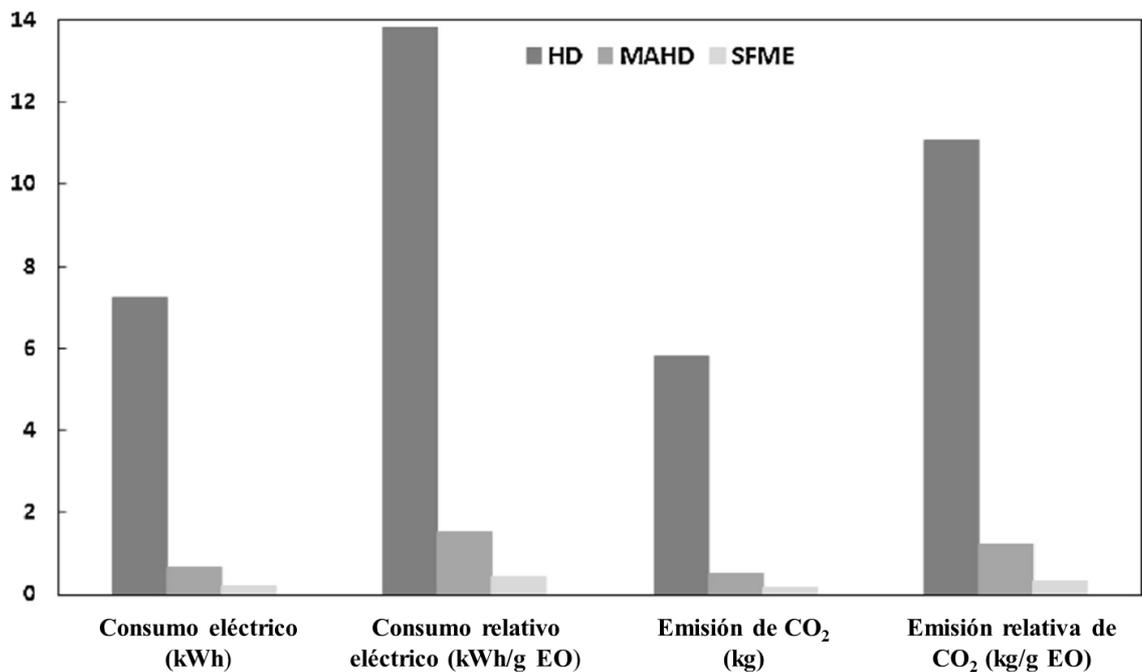
Desde la perspectiva de costos y energía, la reducción en el tiempo de extracción es evidentemente ventajoso para los métodos de MAHD y SFME (Ver Fig. 5) (Kusuma y Mahfud, 2016). Según Filly *et al.* (2013), la energía necesaria para la producción de AE de romero por HD y SFME es de 4,5 y 0,25 kW-h/ g de aceite esencial.

Bousbia *et al.* (2008) afirma que el costo reducido de extracción (en lo que a tiempo y energía se refiere), es claramente ventajoso para el método de hidrodifusión y gravedad por microondas (MHG por sus siglas en inglés) propuesto.

Benmoussa *et al.* (2016) por su lado menciona que el costo reducido de extracción por microondas libre de solventes mejorada (ESFME por sus siglas en inglés), fue claramente beneficioso en términos de tiempo, energía e impacto ambiental. El procedimiento ESFME requiere un tiempo de extracción de 30 minutos versus 37 minutos por SFME y 180 minutos por hidrodestilación. La energía requerida para desarrollar todos los métodos de extracción (energía emitida desde el horno microondas y el calentador eléctrico) fueron 0,56 kW-h por ESMFE, 0,59 kW-h por SFME y 3 kW-h por HD.

Respecto al impacto ambiental, Kusuma y Mahfud (2016) calcularon una mayor cantidad de emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera en el caso de HD (5,799 kg CO<sub>2</sub>), que en los casos de MAHD (0,558 kg CO<sub>2</sub>) y de SFME (0,158 kg CO<sub>2</sub>). En términos de cantidad de CO<sub>2</sub> liberado a la atmósfera para la producción de 1g de EO, hay una diferencia significativa entre MAHD y SFME (ver Fig. 5).

Bousbia *et al.* (2008) calculó una cantidad de dióxido de carbono rechazada en la atmósfera mucho mayor con HD (2400 g) que con MHG (160 g). Estos cálculos se realizaron de acuerdo con la literatura que considera que la recuperación de 1 kW-h de carbón o combustión de combustible se asocia con 800 g de CO<sub>2</sub> que se rechaza en la atmósfera.



**Figura 5:** Consumo eléctrico de la hidrodestilación (HD), hidrodestilación asistida por microondas (MAHD y extracción asistida por microondas libre de solvente (SFME) del aceite esencial de hojas de *Pogostemon cablin*

Fuente: Kusuma y Mahfud (2016)

La cantidad CO<sub>2</sub> emitida durante la producción de AE de *P. cablin*, es mucho mayor en HD que en MAHD y SFME (Kusuma y Mahfud, 2016).

## 2.9 Actividad antimicrobiana según tipos de microorganismos

Se ha estudiado ampliamente por años las propiedades antibacterianas de los AEs contra patógenos transmitidos por alimentos (Elizaquível *et al*, 2013).

En bacterias Gram negativas, la estructura compleja de su membrana externa representa la mayor barrera de permeabilidad, mientras que la correspondiente barrera en Gram positivos es la capa peptidoglicano (Viuda- Martos *et al.*, 2008; Elizaquível *et al*, 2013).

El AE de vid Kadsura chino (*Kadsura longipedunculata*) posee una alta actividad antibacteriana contra todos los Gram positivo testeadas, moderada actividad fungicida contra levaduras, pero falta de actividad contra bacterias Gram negativa. De igual

manera, un estudio de aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae)) mostró fuerte actividad antimicrobiana contra todas las bacterias Gram positivas (incluyendo *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*), bacterias Gram negativas (incluyendo *Pseudomonas* y *Clostridium*), y levaduras (incluyendo cultivos de *Candida*) testeados. La mayor cantidad de cinamaldehído puede deberse a una alta actividad antimicrobiana del aceite de canela (Seow *et al.*, 2014).

Viuda- Martos *et al.* (2008) mencionan que los aceites esenciales evaluados fueron más efectivos contra bacterias Gram positiva, especialmente *B. subtilis* y *S. epidermidis*. Los aceites esenciales obtenidos por SFME y SFME con doble enfriamiento, mostraron más actividad contra *B. subtilis* y *S. epidermidis* que el extraído por hidrodestilación. Según Seow *et al.* (2014), aun cuando bacterias Gram negativas son a menudo menos susceptibles, hay ciertos aceites esenciales que trabajan contra ellos vinculado a la relación bastante específica estructura- actividad.

Espina *et al.* (2011) tras evaluar aceites esenciales de cítricos extraídos por prensado en frío, reportaron que los AEs de limón y naranja no mostraron inhibición contra los microorganismos evaluados, el aceite esencial de mandarina mostró actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, siendo moderadamente activa contra las tres cepas bacterianas Gram positiva analizadas y fuerte actividad contra las dos cepas bacterianas Gram negativa (*E. coli* 0157.H7 y *Salmonella enteridis*).

## **2.10 Mecanismos sugeridos de actividad antimicrobiana**

Los mecanismos antimicrobianos pueden ser explorados observando primero su relación estructura- actividad. Debido a la gran diversidad de grupos de fitoquímicos presentes en los AEs, se sugiere que las acciones antimicrobianas involucran objetivos múltiples dentro de la célula más que confiar en un mecanismo particular (Seow *et al.*, 2014).

Se ha pensado que la membrana de la célula es el principal sitio de acción. La interacción de aceite esencial y las envolturas de las células microbianas ha sido estudiado a través de un microscopio electrónico de barrido para evaluar alteraciones estructurales. Los resultados muestran fuerte disminución de ácidos grasos insaturados

en las células tratadas, resultando en cambios de perfiles lipídicos y alteraciones estructurales de las envolturas de las células (Seow *et al.*, 2014).

Comparable con los hallazgos anteriores, se ha dicho que los AEs son capaces de interactuar con membranas fosfolipídicas, desempeñando un efecto fluidificante para introducir moléculas lipofílicas en la estructura ordenada de la bicapa lipídica (Seow *et al.*, 2014).

Es importante notar que tanto la parte hidrofílica como hidrofóbica de los compuestos fenólicos, contribuyen a la actividad antimicrobiana. Como tal, la parte hidrofílica interactúa con la parte polar de la membrana, mientras la parte hidrofóbica se entierra en la parte interna hidrofóbica de la membrana bacteriana. Además, experimentos cinéticos de transferencia transmembrana, que investiga si el medio lipofílico soporta mejor la absorción de compuestos bioactivos por membranas biológicas en comparación con los acuosos, muestra que el carvacol, que es más hidrofílico, tiene la cinética más rápida de interacción en comparación con el timol,  $\rho$ -cimeno, y  $\gamma$ -terpineno, por su mayor capacidad para migrar a través de la membrana acuosa para alcanzar la superficie de los liposomas multilamelares e interactuar con las bicapas lipídicas en la membrana (Seow *et al.*, 2014).

Como la integridad de la membrana está siendo dañada, esto además afecta el pH de homeostasis, el equilibrio de iones inorgánicos, síntesis de ácido nucleico, y balance de ATP. Un estudio que utiliza una mezcla de timol y carvacrol observó un incremento de permeabilidad en las células de *P. aeruginosa* y *S. aureus* a la tinción nuclear fluorescente con bromuro de etidio, gradientes disipados de pH independiente de la disponibilidad de glucosa, y fuga de iones inorgánicos. Sin embargo, esto no pasó de la misma manera en todos los microorganismos. Por ejemplo, se observó una pérdida en el potencial de la membrana, una disminución en la síntesis de ATP y en los valores de pH intracelular, a medida que la permeabilidad de la membrana aumentaba, tras usar una mezcla de AEs cítricos contra *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, los hallazgos existentes no han sido capaces de entender por completo los efectos exactos de los AEs en enzimas específicas, proteínas, procesos metabólicos y los mecanismos a los cuales, las células se adaptan (Seow *et al.*, 2014).

Mohamed *et al.* (2019) reportaron que los AEs de citronela, limoncillo, clavo y árbol de té dañaron la pared bacteriana; que los AEs de clavo y árbol de té impulsaron la pérdida de material electrónico- denso y desarreglos en el citoplasma; y que los AEs de árbol de té promovieron la vacuolización del citoplasma.

Un estudio antifúngico mostró que el AE de clavo conllevó a una lesión extensiva de la membrana. Una reducción considerable en la cantidad de ergosterol fue también observada. El ergosterol es el principal constituyente esteroide de las membranas de las células fúngicas, específico para hongos para el mantenimiento de la función e integridad celular. La interrupción de las vías biosintéticas de esteroides normales que resultan en la reducción de la biosíntesis de ergosterol, es el mecanismo primario de acción mediante el cual medicamentos antimicóticos reprimen el crecimiento celular de los hongos. Adicionalmente, la formación de tubo germinal, un cambio de la morfogénesis que juega un rol en la patogenicidad, fue completamente inhibido por el AE de clavo. Mecanismos similares fueron observados en las actividades antimicóticas de los AEs de tomillo y limoncillo (Seow *et al.*, 2014).

Viuda- Martos *et al.*, (2008) mencionan por su parte, que la inhibición del crecimiento micelar se relaciona con los monoterpenos contenidos en los AEs. Estos constituyentes podrían elevar la concentración de lípidos peróxidos como son los radicales hidroxilos, alcoxilo, y alcaroxilo y por lo tanto traer la célula a su muerte. Para otros autores, los AEs podrían actuar en las hifas de los micelios, originando la salida de constituyentes del citoplasma, la pérdida de rigidez e integridad de la pared celular de las hifas, resultando en el colapso y muerte del micelio.

Mediante el uso de enfoque de citometría de flujo, se encontró que yoduro de propidio penetró células de levaduras rápidamente dentro de un periodo de incubación corto. Esto revela que la actividad antifúngica comprende una inherente muerte de células, implicando una lesión primaria de la membrana, más que por deterioro metabólico que conduce a un daño secundario de la misma. Con la ayuda de un microscopio electrónico se observó una rápida fuga de potasio, rápida lisis de esperoplasto de levaduras, alteraciones severas de la membrana biológica con fracturación, y solubilización de membranas (Seow *et al.*, 2014).

Tras estudiar el mecanismo de acción del AE de árbol de té y sus compuestos contra *Candida albicans*, *Candida albata*, y *Saccharomyces cerevisiae*, se observó que los

terpenos presentes en este aceite habían modificado aparentemente, la permeabilidad de la célula, irrumpido la disposición de los lípidos, conduciendo a alteraciones en propiedades y funciones de membranas. Es notable que la posición del terpeno, en relación con su resistencia a la hidrofobicidad, esta estrechamente relacionada con su eficacia dentro de la bicapa lipídica de la membrana. Aparte de la alteración en los componentes de la membrana, hubo también una inesperada pérdida del material interno en la exocitosis apical de vesículas, que sirvió para llevar material para la construcción de la pared celular. Como resultado, se evita la alineación adecuada de varios compuestos parietales, como quitina, glucanos y glucoproteínas (Seow *et al.*, 2014).

Así mismo, se ha dicho que la formación de enlaces de hidrogeno entre el grupo hidroxil de los aceites fenólicos y los sitios activos de las enzimas objetivo, podría estar vinculada con la actividad fungitóxica de AEs (Viuda- Martos *et al.*, 2008).

La composición lipídica de la membrana bacteriana del microorganismo patógeno, así como la estructura del compuesto activo que afecta las interacciones membrana lipídica/ aceite esencial, determinan el efecto antibacteriano de los AEs. No obstante, desde la perspectiva de aplicación práctica de los AEs en la industria alimentaria, los factores resultantes de las características de los alimentos (por ejemplo, presencia de sal o grasas), así como las condiciones externas también son bastante importantes (Hąc-Wydro, Flasiński y Romańczuk, 2017).

En lo que a virus se refiere, se asocia el mecanismo de acción de los AEs con la inhibición de la síntesis de proteína viral en varias fases de la infección. En un estudio, a pesar que los virus tratados con aceite continuaron expresando mRNAs viral, ellos mostraron mínima expresión de proteínas de virus, indicando supresión en la traducción de proteínas virales (Seow *et al.*, 2014).

Por otro lado, para evitar resultados falso positivos o falso negativos, condiciones físicas capaces de afectar el mecanismo antimicrobiano de aceites esenciales deben ser considerados. Como tal, estos deben incluir contenido de grasa, complejidad de los alimentos, y temperatura. Otros adicionales, bajo pH, bajos niveles de oxígeno, alta actividad de agua, y niveles de sal han sido reportados previamente por ser capaces de perturbar las acciones de aceites esenciales (Seow *et al.*, 2014).

## 2.11 Actividad antimicrobiana y composición de los aceites esenciales

Los AEs pueden consistir en monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y otros componentes que podrían afectar solos o con otros constituyentes, causando un efecto antimicrobiano sinérgico. Varios terpenos actúan como moléculas de defensa en la planta; por ende, juegan un rol significativo en la infección microbiana (Mohamed *et al.*, 2019).

Espina *et al.* (2011) afirma que la actividad antimicrobiana del AE de mandarina se podría atribuir también a la interacción sinérgica de los otros constituyentes presentes en pequeñas cantidades. Madhumita, Guha y Nag (2019) mencionan que en aceites esenciales, la mayor parte de su actividad antibacteriana es atribuida a terpenoides oxigenados como alcoholes y terpenos fenólicos.

Los AEs con las mayores actividades antibacteriales contra patógenos, tienen una gran proporción de constituyentes fenólicos como timol y carvacrol de orégano, y eugenol de clavo. Por ende, se sabe que el mecanismo de acción de aceites esenciales es similar a la de estos compuestos fenólicos (Seow *et al.*, 2014).

El AE de hojas de alverja obtenido por SFME, inhibe mejor las bacterias respecto al obtenido por HD, pudiéndose enlazar este hecho con la más alta cantidad de sesquiterpenos- que son compuestos que poseen actividad antibacteriana- presentes en el AE extraído por SFME (Qia *et al.*, 2014).

Los compuestos oxigenados son más valiosos que los hidrocarburos monoterpénicos porque son altamente odoríferos y contribuyen sustancialmente a la fragancia del aceite esencial (Chen *et al.*, 2016; Liu, Zu y Yang, 2017). La mayor cantidad de sesquiterpenos oxigenados en el aceite obtenido por microondas se debe, probablemente, a los mayores momentos dipolares de estos compuestos respecto a los hidrocarburos sesquiterpénicos. Los compuestos con mayores momentos dipolares son capaces de reaccionar más intensamente bajo la irradiación de microondas y por lo tanto pueden extraerse más fácil y completamente de los materiales vegetales (Liu, Zu y Yang, 2017; Wei *et al.*, 2018).

Bousbia *et al.* (2009) relaciona la mayor actividad antibacteriana y antioxidante del AE de hojas de romero obtenido por MHG en comparación al extraído por HD, con el más alto contenido de componentes oxigenados en el producido por MHG.

Muchos autores han vinculado la capacidad antifúngica de los aceites esenciales cítricos con compuestos como D-limoneno, linalool o citral: que están presentes en diferentes concentraciones en estos aceites. Otro autor, atribuyó esta función a los compuestos fenólicos: la anfipaticidad de estos compuestos pueden explicar sus interacciones con bio- membranas y entonces, su actividad antimicrobiana. De hecho, la parte hidrofílica de la molécula interactúa con la parte polar de la membrana, mientras que el anillo de benceno hidrofóbico y las cadenas laterales alifáticas son enterradas en la parte interna hidrofóbica de la membrana bacteriana. Además, la participación del grupo hidroxilo en la formación de enlaces hidrógenos y la acidificación de estos compuestos fenólicos podrían tener otras posibles explicaciones (Viuda- Martos *et al.*, 2008).

Sobre el limoneno en específico, un modelo de membrana bacteriana es más sensible al efecto del mismo a bajas temperaturas, a pesar de que a bajas temperaturas la membrana está más condensada. Esta influencia puede estar conectada con que la volatilidad y evaporación del limoneno se incrementa con más altas temperaturas. Así pues, se evidencia que la temperatura es un factor importante para la aplicación del limoneno como preservante de alimentos, afectando tanto las propiedades de la membrana bacteriana, como la concentración del aditivo activo en el sistema (Hąc-Wydro, Flasiński y Romańczuk, 2017).

En la Tabla 6 se muestra la actividad antibacteriana de *Citrus medica* y limoneno contra los microorganismos comunes de deterioro y patógenos, monitoreados por la técnica de disco difusión.

Entre los monoterpenos detectados en el AE de mandarina, carvona y oxido de limoneno fueron activos contra varias de las especies de hongos y bacterias patógenas analizadas. En adición, se notó que carvona disipa el gradiente de pH y potencial de membranas de las células que pueden disturbar el estatus metabólico de las células (Espina *et al.*, 2011).

Verica y Petar (2014), al analizar aceite esencial de mirto, reportan que la mayor parte de compuestos del aceite - terpenos oxigenados, como son 1,3 cineole, linalool y  $\alpha$ -terpinol; exhiben potente actividad antioxidante. La actividad antibacteriana de la mayoría de terpenoides está relacionada con sus sus grupos funcionales y ha sido

demostrado que el grupo hidroxilo de terpenoides fenólicos y la presencia de electrones deslocalizados son importantes para la actividad antibacteriana.

**Tabla 6**

*Actividad antibacteriana de Citrus medica y limoneno contra los microorganismos comunes de deterioro y patógenos monitoreados por el ensayo de disco difusión*

Especies microbianas	Aceite esencial de <i>Citrica medica</i>		Limoneno	
	Inóculo inicial (log cfu/mL)			
	5	7	5	7
<i>Salmonella Enteritis</i>	10±0,3	7±0,7	25±0,5	17±0,7
<i>Salmonella Typhimurium</i>	10±0,5	7±0,7	26±0,3	20±0,5
<i>Escherichia coli</i>	12±0,5	10±0,5	25±0,7	20±0,7
<i>Listeria monocytogenes</i>	10±0,5	7±0,5	15±0,3	10±0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	16±0,5	10±0,3	18±0,3	15±0,3
<i>Pseudomonas fragi</i>	15±0,5	12±0,3	27±0,7	15±0,3

Fuente: Mitropoulou *et al.* 2017

Algunos compuestos terpenoides de los AEs son capaces de desempeñarse como desacopladores, interfiriendo de esta forma con la translocación de protones sobre la vesícula de la membrana y subsecuentemente interrumpiendo la fosforilación ADP. Los terpenoides son un ejemplo de agentes lipido solubles que afectan las actividades de las enzimas catalizadas por membrana exhibiendo acción sobre las vías respiratorias. Terpenoides específicos con grupos funcionales, por ejemplo alcoholes fenólicos o aldehidos, también interfieren con enzimas y/o proteínas integradas o asociadas a la membrana, deteniendo su producción o actividad (Verica y Petar, 2014).

Algunos resultados han indicado que los compuestos fenólicos contribuyen significativamente en la actividad antibacteriana. Se puede atribuir esta actividad a la inhibición enzimática llevada a cabo por los compuestos fenólicos más oxidados probablemente, mediante la reacción con los componentes sulfhidrilos o mediante las interacciones no específicas con proteínas. Los ácidos cinámico y cafeico mostraron

ser tóxicos para los microorganismos. Los taninos como fenoles poliméricos solubles en agua, están comúnmente presentes plantas herbáceas y leñosas. Los taninos han sido reportados por poseer actividad de eliminación de radicales libres y también efectos antibacteriales. Los taninos hidrolizables tienen potencial antibacterial *Helicobacter pylori* y parecen ser prometedores en la erradicación de la bacteria sin afectar la microbiota intestinal. Una gran cantidad de flavonoides es sintetizada por plantas para luchar contra bacterias de infección, entonces no es sorpresa que ellos exhiban actividad antimicrobiana *in vitro*, y similares referencias respecto a las catequinas (Verica y Petar, 2014).

## CAPÍTULO III. MÉTODO EXPERIMENTAL

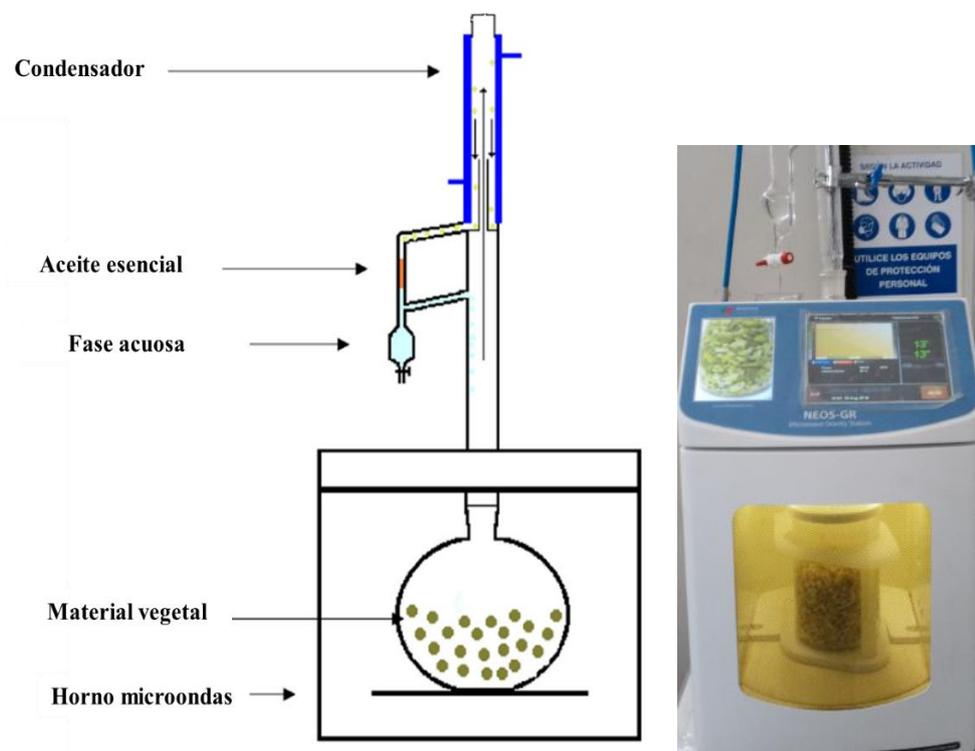
### 3.1 Extracción de aceite de cáscara de naranja por microondas libre de solvente (SFME)

El AE de cáscara de naranja fue extraído por microondas libre de solvente (SFME), en un equipo microondas MILESTONE modelo NEOS (fabricado por Milestone S.r.l), con una máxima potencia de salida de 900 W, a 2450 MHz., con incrementos variables de potencia de 1 W. Este equipo cuenta con un sensor infrarrojo de temperatura, una pantalla táctil y una cámara que permite visualizar la muestra en su interior durante el proceso. Durante el experimento, además de la temperatura, tiempo y potencia también fueron monitoreados por el equipo. La temperatura del agua de refrigeración fue de 5°C.

En la Figura 6 se esquematiza el proceso de extracción, donde 500 g de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), variedad Valencia; previamente cortada y picada (0.6 cm<sup>2</sup> aprox.), fueron colocados en un envase cilíndrico de 2 litros de capacidad. La muestra se calentó por la interacción con las ondas electromagnética producidas por el equipo, arrastrando el vapor de agua producido en consecuencia al aceite esencial ubicado en las glándulas de la matriz. Esta mezcla pasó a través del condensador dispuesto sobre el equipo (parte superior). Después de la condensación, la mezcla fue decantada para la separación de aceite de agua. Se secó el AE extraído con sulfato de sodio anhidro, y se almacenó a 4 °C (en refrigeración) hasta su uso.

El equipo microondas se programó según los experimentos desarrollados detallados en la Tabla 7, a una etapa: a 800 y 400 W; y a dos etapas: empleando potencias de 800 y 400 sucesivamente y viceversa. Los tiempos de extracción se definieron según se explica en el ítem 3.1. Las extracciones fueron realizadas por triplicado por cada tratamiento establecido.

En la Figura 7, se detalla el procedimiento experimental seguido de forma gráfica. Se analizó la humedad inicial de la cáscara de naranja, se obtuvo las curvas de rendimiento y temperatura en función del tiempo, se analizó la composición química y actividad antimicrobiana de los aceites extraídos. Así mismo, se calcularon los consumos de energía eléctrica y emisión de CO<sub>2</sub> por cada tratamiento.



**Figura 6:** Extracción por microondas libre de solvente (SFME)

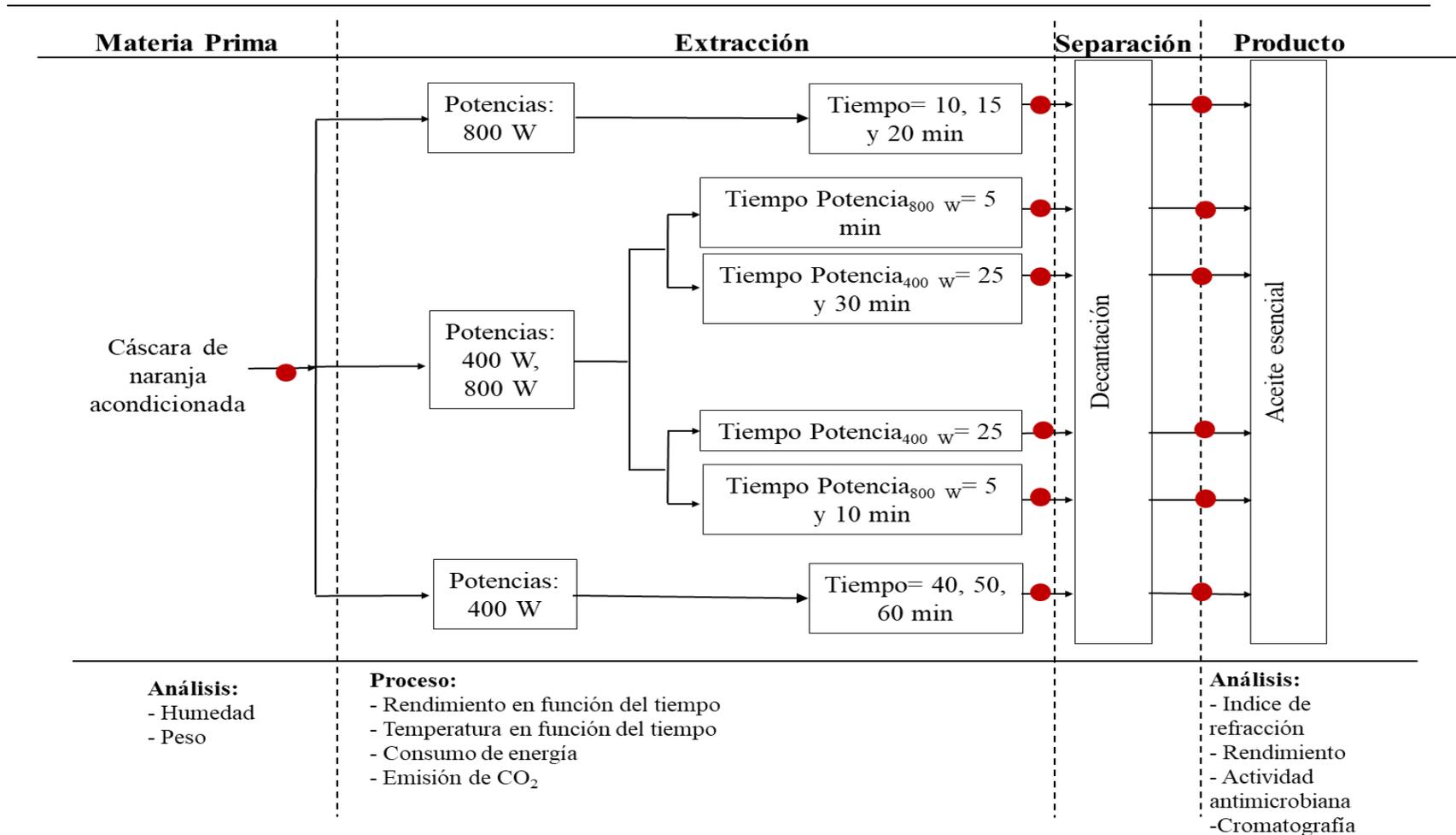
Fuente: Elaboración Propia (2019)

**Tabla 7**

*Tratamientos desarrollados*

<b>T<sub>i</sub> (i=1,...,4)</b>	<b>Número de etapas</b>	<b>Condiciones de extracción (Potencia y tiempo)</b>
T <sub>1</sub>	1	800 W por 10, 15 y 20 minutos
T <sub>2</sub>	1	400 W por 40, 50 y 60 minutos
T <sub>3</sub>	2	1° Etapa: 800 W por 5 minutos. 2° Etapa: 400 W por 25 y 30 minutos
T <sub>4</sub>	2	1° Etapa: 400 W por 25 minutos. 2° Etapa: 800 W por 5 y 10 minutos

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 7:** Diagrama experimental

Fuente: Elaboración Propia (2019)

### 3.2 Rendimiento de Extracción

El rendimiento de extracción se calcula como el porcentaje de la masa obtenida de AE sobre la masa del peso seco de la cáscara de naranja empleada, como se detalla en la Ec. 1 (Liu *et al.*, 2018).

$$\text{Rendimiento de aceite esencial (\%)} = \frac{\text{Masa de aceite esencial obtenido (g)} \times 100}{\text{Masa del peso seco de cáscara de naranja (g)}} \quad (\text{Ec. 1})$$

### 3.3 Consumo de Energía

El consumo específico de energía para obtener AE de la cáscara de naranja, fue calculado según la Ec. 2, que considera: potencia de salida del microondas y tiempo de extracción, considerándose este último como el tiempo en el que se extrae la mayor cantidad de aceite esencial según lo señalado en el ítem 3.1, ya que el tiempo remanente se consideró como un periodo no productivo (Kusuma y Mahfud, 2017).

$$\text{Consumo de energía (kW-h)} = \frac{\text{Potencia microondas (W)} \times \text{tiempo de extracción (s)}}{3600000} \quad (\text{Ec. 2})$$

Adicionalmente, el consumo específico de energía de los diferentes tratamientos puede ser expresada según la Ec. 3 (Kusuma y Mahfud, 2017)

$$\text{Consumo específico de energía (kW-h/g aceite esencial)} = \frac{\text{Consumo de energía (kW-h)}}{\text{Masa de aceite esencial extraído (g)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

### 3.4 Emisión de CO<sub>2</sub>

El impacto ambiental se estimó calculando la cantidad de CO<sub>2</sub> emitida. Esto se llevó a cabo según el procedimiento mencionado en estudios previos: para obtener 1 kW-h de energía a partir de carbono o combustible, 800 g de CO<sub>2</sub> serán liberados en la atmosfera durante su combustión. Por ende, la emisión de CO<sub>2</sub> se calculó de acuerdo a la Ec. 4 (Kusuma y Mahfud, 2017).

$$\text{Emisión CO}_2 \text{ (g)} = \text{Consumo de energía (kW-h)} \times 800 \quad (\text{Ec. 4})$$

Para la emisión de CO<sub>2</sub> por gramo de aceite esencial extraído bajo los diferentes tratamientos, se aplicó la Ec. 5 (Kusuma y Mahfud, 2017).

$$\text{Emisión CO}_2 \text{ específico (g/ g aceite esencial)} = \frac{\text{Emisión CO}_2 \text{ (g)}}{\text{Masa de aceite esencial extraído (g)}} \quad (\text{Ec. 5})$$

### **3.5 Análisis Físicos**

Como análisis físicos se realizaron los análisis de humedad sobre la cáscara de naranja por el método de desecación por estufa; y las mediciones de índice de refracción sobre el AE extraído. Ambos métodos se realizaron según lo indicado en el AOAC (2012). Los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.6 Análisis químicos**

Los AEs fueron analizados por cromatografía de masas acoplado a espectrofotómetro de masas (GC- MS) (Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C), usando una columna capilar J&W. Phase DB- 5ms, 60 m de largo x 250 µm de diámetro interno x 0.25 µm espesor de film.

El análisis se realizó bajo las siguientes condiciones: Gas portador He; velocidad de flujo 1 mL/ min; Split: splitless; rampa de temperatura: Empieza a 40 °C y sube a 6°C/ min hasta 180 °C; 3 °C/ min hasta 200 °C por 5 minutos y finalmente 30°C/ min hasta 300 °C manteniéndose por 3 minutos. Tiempo de corrida: 41 minutos 33 segundos.

Se diluyó 20 µL de aceite esencial en 1 mL de diclorometano y luego se inyectó 5 µL al cromatógrafo de gases.

Los constituyentes de los AEs se identificaron comparando el índice de retención relativa y los espectros de masas con los de los compuestos de la biblioteca de espectros de masas

NIST08.L, así como mediante la comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas con los datos publicados en la literatura.

Los análisis fueron ejecutados por triplicado. El promedio de éstas tres repeticiones y su desviación estándar fue calculado por cada componente.

### **3.7 Actividad Antimicrobiana**

La técnica de disco difusión fue empleada para calcular la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El fundamento básico de la misma, es la difusión del AE por medio del agar. Un compuesto antimicrobiano eficaz, por causa de la inhibición del crecimiento de microbios, puede exhibir una zona de inhibición (Seow *et al.*, 2014).

Se emplearon dos cultivos bacterianos: uno Gram positivo: *Listeria Monocytogenes* (ATCC 19115) y uno Gram negativo: *Escherichia Coli* (ATCC 8739). Una suspensión de la bacteria analizada (0.1 mL de  $10^6$  CFU/mL) fue inoculada en las placas previamente llenadas con medio sólido. Discos de papel filtro (6 mm de diámetro) fueron cargados con 50  $\mu$ L de aceite, colocados en las placas inoculadas e incubados a 37 °C por 24 h. El aceite esencial se difunde en el agar y evita el crecimiento microbiano en su área de acción (Seow *et al.*, 2014). Se miden las áreas claras alrededor del disco, que marcan la zona de inhibición, y una mayor área clara muestra una mayor eficacia antimicrobiana del aceite esencial. Los diámetros de las zonas de inhibición fueron medidos en mm. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **3.8 Análisis Estadístico**

Cada variable de respuesta fue testeada por triplicado. Métodos convencionales de estadística fueron usados para calcular las medias y desviaciones estándares. Un diseño completamente al azar (DCA) fue empleado para determinar si hay diferencia significativa entre los tratamientos aplicados ( $p < 0.05$ ) mediante un análisis de varianza (ANOVA), comprobándose los supuestos de homogeneidad de varianzas, independencia y normalidad de residuos, previamente. Posteriormente, para evaluar cuales son los tratamientos diferentes entre sí, el test de Tukey fue aplicado entre las medias de los tratamientos. Aquellos tratamientos que muestran letras iguales en la misma columna, no

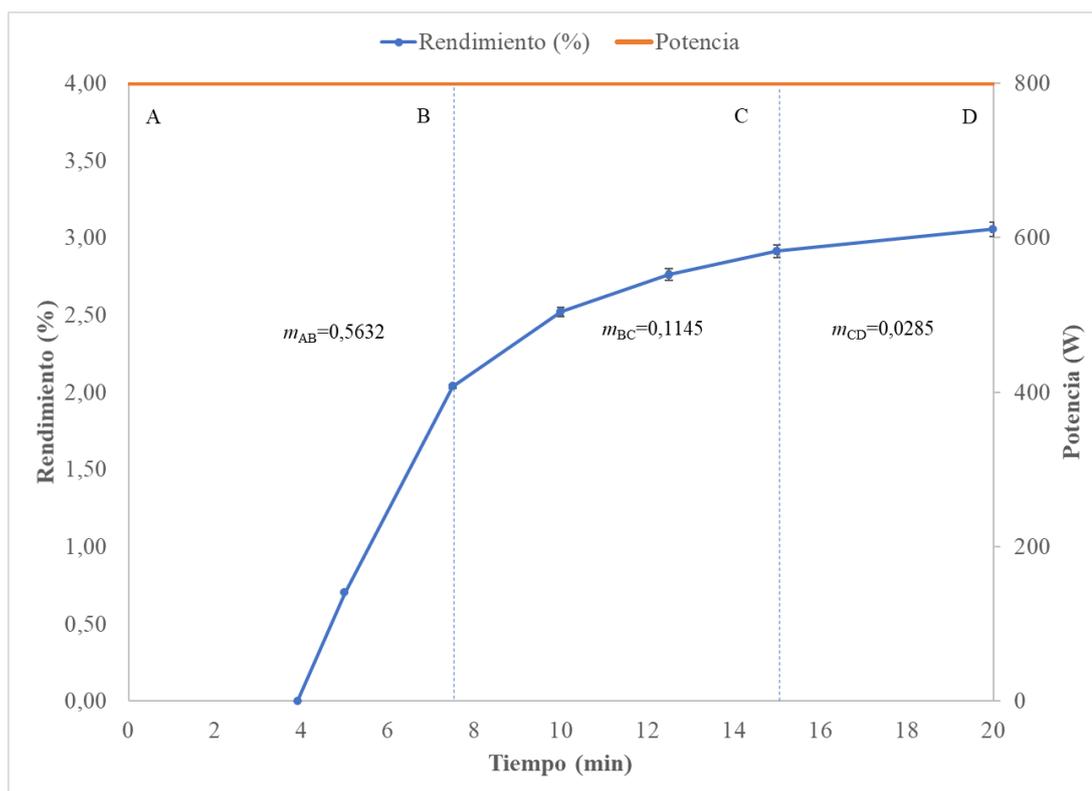
tienen diferencias significativas entre sí, y aquellos con letras diferentes, presentan diferencias significativas entre sí. Se empleó el paquete estadístico Minitab 18, en su versión gratuita para el análisis estadístico de los datos obtenidos. En los Anexos (Figuras 20, 21, 26, 27, 28 y 29; y Tablas 14, 15 y 16), se muestran las gráficas y tablas obtenidas en este software.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Rendimiento de las Extracciones realizadas por SFME

El mecanismo de extracción por microondas se fundamenta en la fuerte absorción de energía por el agua *in situ*, lo que proporciona el aumento de temperatura al interior de la muestra y, por ende, la ruptura de las células de aceite esencial por el agua *in situ* (Lucchesi *et al.*, 2007).

Las Figuras 8, 9, 10 y 11 muestran el rendimiento obtenido de AE de cáscara de naranja en el tiempo, bajo diferentes potencias de 800 (Tratamiento 1), 800/ 400 (Tratamiento 2), 400/ 800 (Tratamiento 3) y 400 W (Tratamiento 4) respectivamente. Se pueden observar tres fases distintivas en las cinéticas de extracción de todos los tratamientos, que se detallan a continuación:



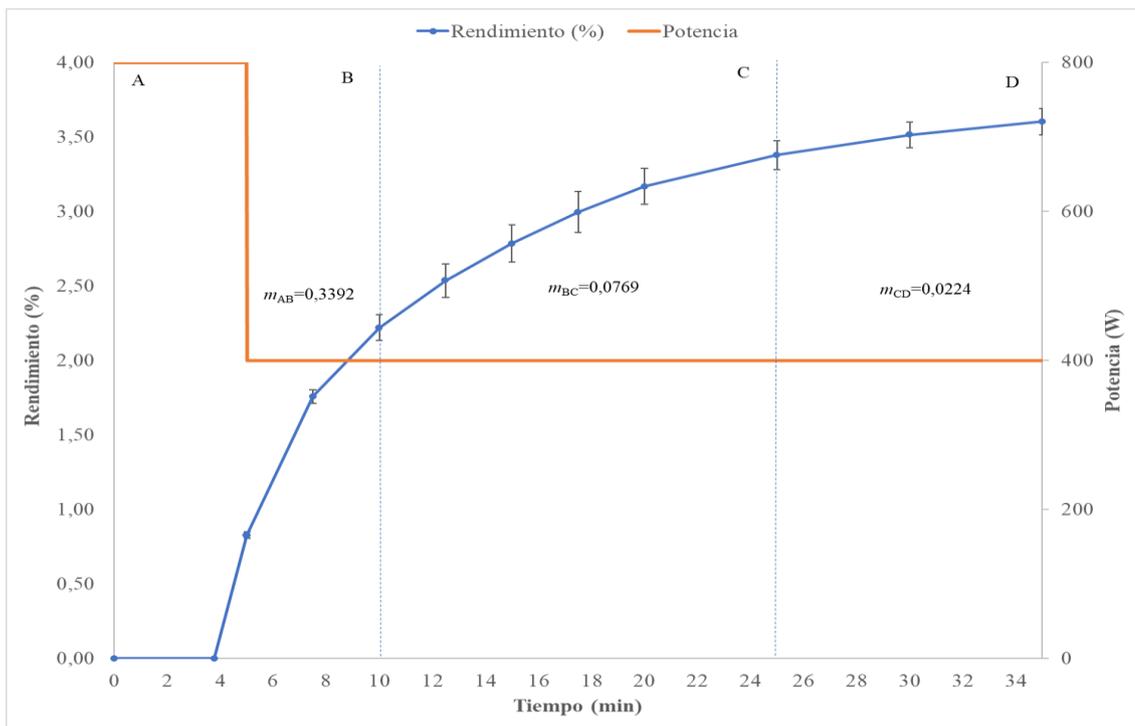
**Figura 8:** Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 800 W en función del tiempo

Fuente: Elaboración propia (2019)

- La primera fase AB, está representada por una línea creciente. En esta primera fase se observan las pendientes más inclinadas, con valores entre 0,2285 y 0,5632; lo que indica

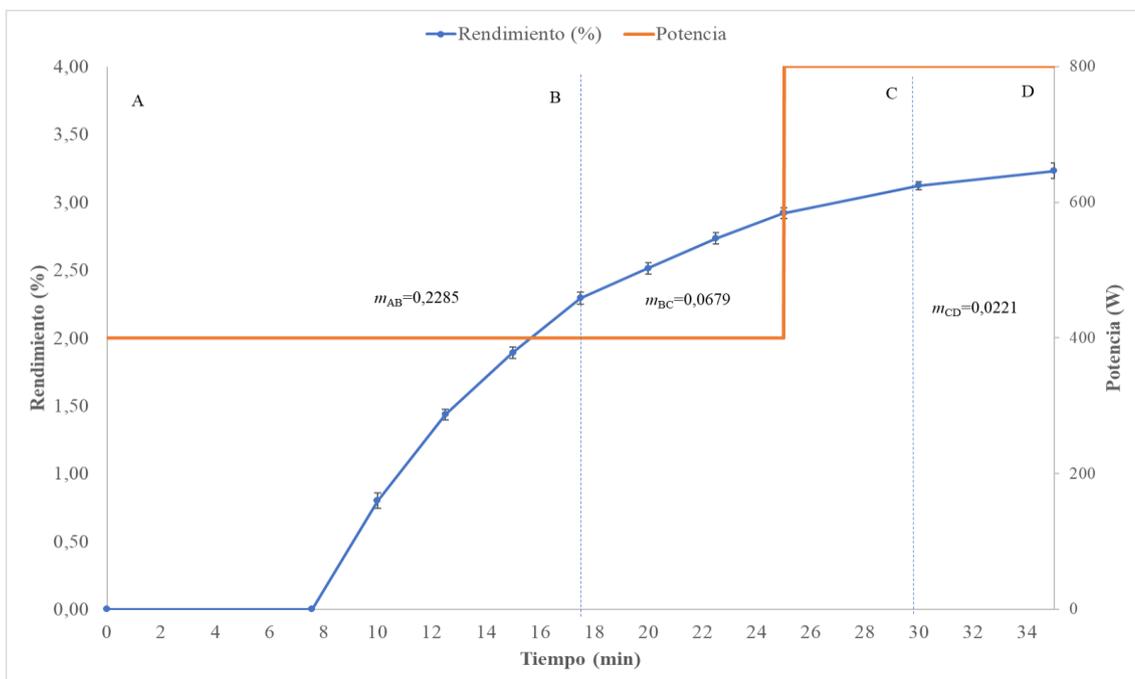
que la mayor parte de aceite esencial es extraído durante esta etapa. Según Benmoussa *et al.* (2016), esto se debe a la facilidad de extracción de las primeras cantidades, ubicadas en la superficie de las células vegetales. Estas representan entre 63,2% y 70,9% del rendimiento total obtenido por SFME. En general, ésta primera fase, es más prolongada en los tratamientos que inician a 400 W (tratamiento 3 y 4), respecto a los que inician a 800 W (tratamientos 1 y 2). Esto se vincula con el menor tiempo requerido por los tratamientos que inician con alta potencia (800W), para alcanzar la temperatura de ebullición (3,9 y 3,8 minutos para los tratamientos 1 y 2 respectivamente) -definido como tiempo de demora ( $t_{cut}$ ), donde las primeras gotas de aceite empiezan a aparecer- respecto a los tratamientos que inician con baja potencia (400W), donde los  $t_{cut}$  son 7,6 y 7,7 minutos para los tratamientos 3 y 4 respectivamente. Según Navarrete, Mato y Cocero (2012), a mayores niveles de potencia, la temperatura se incrementa más rápido, consumiendo menos tiempo. En las Figuras 8 y 9 se observa que esta primera etapa es más prolongada en el tratamiento 2 (800/ 400 W) respecto al tratamiento 1 (800 W) a pesar de que ambos inician con la misma potencia de 800 W. Esto último puede atribuirse al cambio de potencia que tiene lugar dentro de esta primera fase en el tratamiento 2, lo cual conlleva a una desaceleración inicial en el rendimiento, y subsecuente prolongación de esta primera etapa. La temperatura alcanzada en esta primera fase se encuentra alrededor de los 100 °C. Este comportamiento es similar a lo observado por Benmoussa *et al.* (2016), quien menciona que la primera fase estuvo representada por una línea creciente hasta que la temperatura alcanzó los 100 °C, y así se logró la evaporación de las primeras gotas de aceite esencial.

- La segunda fase BC está marcada por una segunda línea en aumento de menor pendiente (entre 0,0568 y 0,1145), donde las cantidades extraídas de aceite representan aproximadamente entre 19,9% y 33,0%. Bousbia *et al.* (2009) afirman que ésta segunda fase representa la difusión interna del aceite esencial desde el centro de las partículas hacia el medio externo, involucrado con el calentamiento interno del agua situado en las células de la planta. En esta segunda fase, la temperatura se conserva alrededor de los 100 °C a presión atmosférica, llegando a alcanzar entre 102 y 104 °C en la última etapa de extracción. La duración de esta etapa es similar en todos los tratamientos, fluctuando entre 12,5 minutos para los tratamientos 1 y 2 (ver Fig. 8 y 9), y 15 minutos para los tratamientos 3 y 4 (ver Fig. 10 y 11).



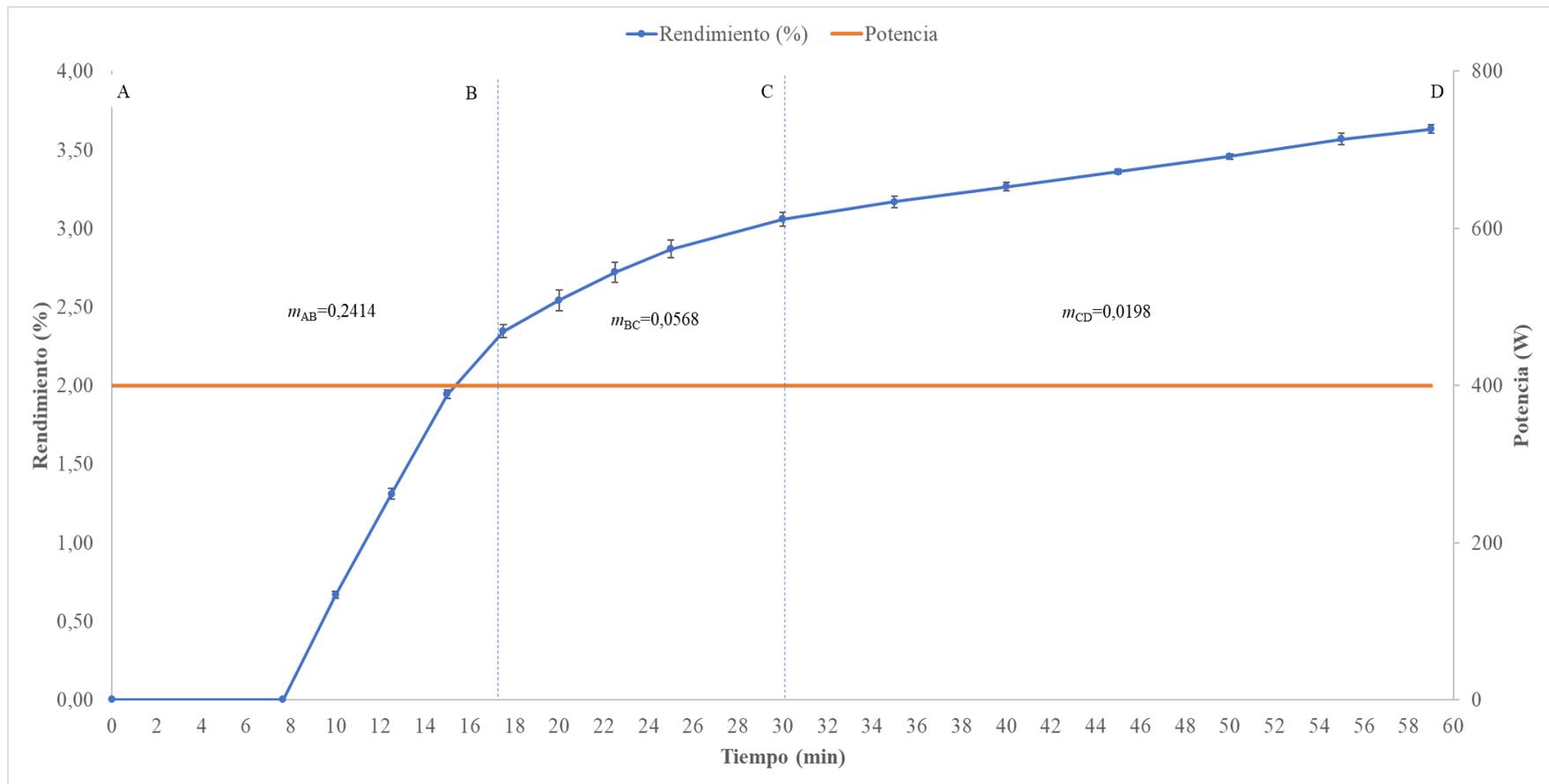
**Figura 9:** Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 800/ 400 W en función del tiempo

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 10:** Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 400/ 800 W en función del tiempo

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 11:** Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 400 W en función del tiempo

Fuente: Elaboración propia (2019)

- La tercera fase CD está representada por una línea de menor inclinación, con valores de pendiente entre 0,0198 y 0,0285; casi horizontal al final, lo cual marca el final de la extracción. En el caso del cuarto tratamiento, el rendimiento sólo es graficado hasta el minuto 59, ya que la matriz empieza a presentar quemaduras pasado este tiempo de extracción. Los tiempos de duración de esta etapa son similares en los tratamientos 1, 2 y 3 (entre 5 y 10 minutos) (ver. Fig. 8, 9 y 10), mientras que en el tratamiento 4, en donde la extracción se lleva a cabo a 400 W, el tiempo de duración es de 29 minutos (ver Fig. 11).

El perfil de rendimiento observado es similar al descrito por Bousbia *et al* (2009), quienes utilizaron hidrodifusión por microondas y gravedad para la obtención de AE de romero. Los tiempos totales de extracción (hasta que no se obtuviera más aceite esencial), se establecieron considerando que los mismos, tal como afirma Lucchesi *et al*. (2007), deben ser los óptimos para maximizar el rendimiento sin afectar la calidad del aceite esencial. En base a lo observado en la tercera etapa CD y dando por concluida la extracción cuando los rendimientos fueron inferiores a 0,1%, se establecieron tiempos de extracción de 20, 30, 35 y 55 minutos para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente (ver Tabla 8).

**Tabla 8**

*Tiempos de extracción, rendimiento e índice de refracción de los aceites esenciales obtenidos*

		Tiempos totales de extracción (min)	Rendimiento (%)	Índice de refracción (20°C)
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Trat. 1 (800 W)</b>	<b>20</b>	3,05 <sup>c</sup> ± 0,05	1,47
	<b>Trat. 2 (800 W/ 400 W)</b>	<b>30</b>	3,60 <sup>a</sup> ± 0,09	1,47
	<b>Trat. 3 (400 W/ 800 W)</b>	<b>35</b>	3,25 <sup>b</sup> ± 0,03	1,47
	<b>Trat. 4 (400 W)</b>	<b>55</b>	3,57 <sup>a</sup> ± 0,11	1,47

<sup>a, b, c</sup> Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí

Fuente: Elaboración propia (2019)

Según los resultados obtenidos por Li *et al*. (2012), al evaluar la influencia de la potencia de extracción y el tiempo sobre el rendimiento de AE de *Dryopteris fragrans*, mencionan que el tiempo es el principal parámetro que incide en la eficiencia de extracción. Aunque

extender el tiempo de irradiación conduce a un ligero aumento en el rendimiento del AE, prolongar aún más este tiempo, resulta en poca volatilización y descomposición.

Esto último coincide con lo observado en el tratamiento 4, donde a partir del minuto 55 el rendimiento está por debajo del 0,1%, y a partir del minuto 59, se observa que la cáscara de naranja empieza a presentar quemaduras lo que resulta en la extracción de otros tipos de compuestos de descomposición. En la misma Tabla 8 también se hace referencia a los rendimientos, observándose que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 3, ni entre los tratamientos 2 y 4; siendo estos últimos significativamente mayores. Los rendimientos obtenidos en base seca se encuentran entre 3,05 y 3,57%. Bousbia *et al.* (2008), al someter tres diferentes variedades de cáscaras naranja a MHG, obtuvieron rendimientos entre 0,9 y 1,2%.

El menor rendimiento obtenido en el tratamiento 1, el cual se llevó a cabo a 800 W durante toda la extracción, puede relacionarse con lo mencionado por Bousbia *et al.* (2008) sobre que una potencia alta podría resultar en pérdida de compuestos volátiles. Esto podría deberse a que, tal como Kusuma y Mahfud (2016) afirman, potencias elevadas promueven un aumento de temperatura más rápido, de manera que en algunos casos el sistema de refrigeración no es capaz de condensar todo el vapor a la misma velocidad y puede dar lugar a la pérdida de compuestos volátiles. Así mismo, esta pérdida también podría deberse a que un cambio brusco de temperatura resulta en descomposición térmica (Li *et al.*, 2012).

Esto último podría relacionarse a su vez con lo obtenido en el tratamiento 3, donde si bien se obtuvo un ligero incremento en el rendimiento de extracción respecto al tratamiento 1, este no fue estadísticamente significativo, debido probablemente, a la descomposición térmica que refiere Li *et al.* (2012), en los últimos 10 minutos de extracción, donde el material fue llevado de 400 W a 800 W.

Por otro lado, es en los tratamientos 2 y 4 en donde se obtiene un mayor rendimiento de extracción. En el primer caso, la extracción inicia a una potencia alta durante 5 minutos, de los cuales 3,8 minutos corresponden al tiempo de demora ( $t_{cut}$ ) para iniciar la destilación propiamente dicho. Este tiempo es similar al  $t_{cut}$  del tratamiento 1 (3,9 minutos). Durante este tiempo se extrajo 22% del total de aceite esencial y, al reducir la potencia a la mitad, se estarían evitando las pérdidas de compuestos volátiles mencionados anteriormente por lo cual se obtendría un mayor rendimiento de extracción.

Así mismo, la elevada velocidad de evaporación en este tratamiento, caracterizado por la pendiente inclinada de la primera fase de extracción ( $m= 0,3392$ ) (ver Figura 9), estaría relacionado con el alto rendimiento obtenido, ya que, tal como afirma Lucchesi *et al.*, (2007), el poder de irradiación determina la velocidad de evaporación del agua durante SFME. Cuanto más elevada es la velocidad de evaporación, mayor es el rendimiento de la cantidad de AE extraído.

En general, observaciones similares a las realizadas fueron hechas por Megawati y Murniyawati (2015), quienes reportan que a la potencia de 800 W, menor aceite esencial de naranja de Bali fue obtenido, mientras que a la potencia de 600 W, se obtuvo un mayor rendimiento.

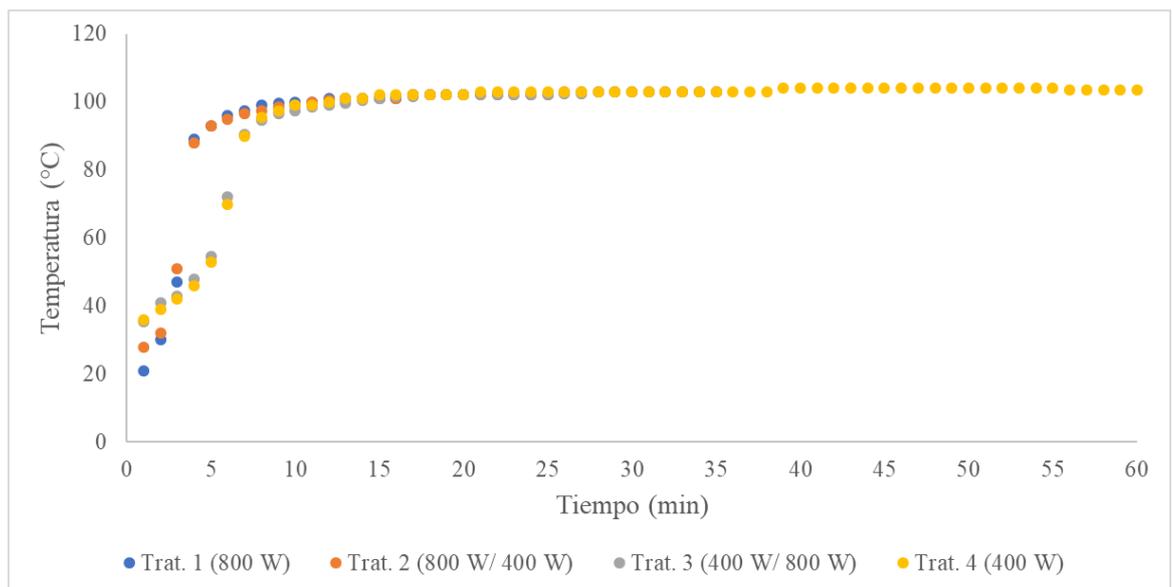
Megawati *et al.* (2019), explican que el mecanismo de transferencia de masa de aceite esencial de maza de nuez moscada por MAHD es controlado por difusión intra- partícula siguiendo la ley de Fick. El coeficiente de difusión ( $De$ ) para una potencia de 800 W ( $1,65 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ) es mayor para una de 600 W ( $1,39 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ). Consecuentemente, el rendimiento de extracción durante los 10 primeros minutos fue mayor para el proceso llevado a cabo a 800 W, en comparación con el llevado a cabo a 600 W. Situación contraria ocurrió a los 15 y 20 minutos, donde el rendimiento fue mayor en el caso de la potencia de 600 W en relación a la potencia de 800 W.

Ante estos resultados, los autores mencionan que la temperatura de operación incrementa cuando la potencia es mayor. La temperatura aumenta como resultado de la habilidad de los materiales y solventes de absorber energía microondas. A mayor potencia, mayor será la energía absorbida por el material. La energía absorbida es convertida en calor por lo que, en una primera fase, mayores rendimientos se obtendrán. Luego, se presume que a 800 W, ocurre la mayor degradación de compuestos del aceite. Al mismo tiempo se sospecha que el área superficial del condensador no es suficiente para proveer el área de transferencia de calor necesaria para completar la condensación.

En el caso del tratamiento 4, se emplea una baja potencia de extracción durante todo el proceso, siendo este tratamiento el que requiere mayor tiempo de extracción (55 minutos), ya que, al aplicar una menor potencia, se transfiere energía de forma más lenta al proceso, siendo el  $t_{\text{cut}}= 7,7$  minutos. Según Chen *et al.* (2016), la prolongación del tiempo de extracción sería útil para completar la extracción de los compuestos objetivo cuando la potencia de los microondas permanece baja. Estos autores recomendaron una baja

potencia de extracción (150 W) por un tiempo prolongado (90 minutos) para obtener por SFME aceite esencial de cáscara de pomelo, en donde se tuvo el mayor rendimiento.

En la Figura 12, se grafican las curvas de temperatura obtenidas en cada tratamiento. En los tratamientos 1 (800 W) y 2 (800/ 400 W), las curvas son más verticales, lo que indica que se alcanza más rápidamente la temperatura a la que se inicia la destilación en estos tratamientos que comienzan con alta potencia; en comparación con aquellos que inician con una baja potencia (tratamientos 3: 400/ 800 W y tratamiento 4: 400 W). Esta relación entre potencia y temperatura es mencionada por Costa *et al.* (2014), quienes dicen que la potencia de microondas y temperatura están interrelacionados, ya que la alta potencia de microondas aumenta la temperatura del sistema, lo que resulta en menores rendimientos de extracción de compuestos termo sensibles.



**Figura 12:** Curvas de temperatura en función del tiempo

Fuente: Elaboración propia (2019)

Respecto a la humedad obtenida de la cáscara de naranja, la misma fue de  $67,05 \pm 1,05\%$ . El índice de refracción de los AEs producidos fue 1,47; lo que concuerda con lo reportado por Viuda- Martos *et al.* (2008), quienes mencionan un valor de 1,47 a  $20^{\circ}\text{C}$  para el AE de naranja (*Citrus Sinensis*).

## 4.2 Consumo de energía y emisión de CO<sub>2</sub>

La reducción de extracción de tiempo usando dos potencias en un mismo proceso es claramente ventajoso (ver Fig. 13). En la Tabla 9 se indica el consumo de energía y emisión de CO<sub>2</sub> que requieren y conllevan los tratamientos estudiados. El mayor consumo de energía se obtuvo en el tratamiento 4 (0,367 kW-h), precisamente el tratamiento de donde se obtuvo una de las eficiencias de extracción más altas, mientras que, el menor consumo de energía se observó en el tratamiento 2 (0,233 kW-h), del cual también se obtuvo uno de los rendimientos más altos, numéricamente mayor que el tratamiento 4, y estadísticamente igual (sin diferencia significativa) a este tratamiento. El segundo menor consumo de energía se observó en el tratamiento 1 (0,267 kW-h), seguido del tratamiento 3 (0,300 kW-h).

**Tabla 9**

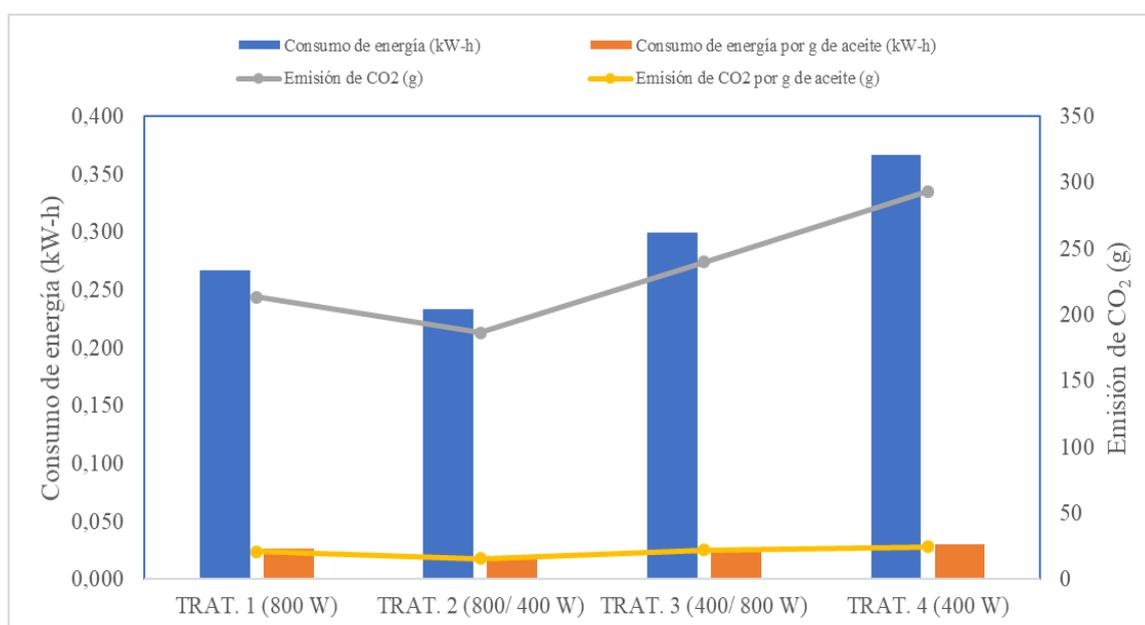
*Consumo de energía (kW-h) y Emisión de CO<sub>2</sub>*

		Consumo de energía (kW-h)	Consumo de energía por g de aceite (kW-h/g)	Emisión de CO <sub>2</sub> (g)	Emisión de CO <sub>2</sub> por g de aceite (g)
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Trat. 1 (800 W)</b>	0,267	0,026 ± 0,0003	213,3	20,8 ± 0,25
	<b>Trat. 2 (800/ 400 W)</b>	0,233	0,019 ± 0,0001	186,7	15,5 ± 0,07
	<b>Trat. 3 (400/ 800 W)</b>	0,300	0,028 ± 0,0008	240,0	22,0 ± 0,63
	<b>Trat. 4 (400 W)</b>	0,367	0,031 ± 0,0002	293,3	24,5 ± 0,16

Fuente: Elaboración propia (2019)

Consumos similares fueron mencionados por Kusuma y Mahfud (2016), quienes mostraron gastos de energía de 7,249 kW-h, 0,660 kW-h y 0,198 kW-h, para la producción de AE de *Pogostemon cablin* por HD, MAHD y SFME respectivamente; y por Bousbia *et al.* (2009), quienes refieren que el costo reducido de extracción es claramente ventajoso para el método de hidrodifusión por microondas y gravedad (MHG por sus siglas en inglés) propuesto, en términos de tiempo y energía. La energía necesaria para realizar los dos métodos de extracción son respectivamente 3 kW-h para HD y 0,2 kW-h para MHG.

Respecto al impacto ambiental, la cantidad calculada de emisión de dióxido de carbono emitido en la atmosfera presenta la misma tendencia que el consumo de energía. El tratamiento 4 resulta en la mayor emisión de CO<sub>2</sub> (293,33 g), seguido del tratamiento 3 (240,00 g), tratamiento 1 (213,33 g), y tratamiento 2 (186,67 g).



**Figura 13:** Consumo de energía (kW-h) y Emisión de CO<sub>2</sub>

Fuente: Elaboración propia (2019)

Bousbia *et al.* (2008) reportaron una emisión de 160 g durante la obtención de AE a partir de cáscara de naranja por MHG. A su vez, Benmoussa *et al.* (2016), reportaron una emisión de 472 g CO<sub>2</sub> por gramo de AE de semillas de hinojo, extraído por SFME; y Chemat *et al.* (2006), reportaron un valor de 25 g CO<sub>2</sub> por gramo de AE de lavanda, extraído por microondas.

ESFME fue propuesto como un proceso rápido y limpio para la extracción de compuestos volátiles de plantas medicinales y aromáticas (Benmoussa *et al.*, 2016).

Los métodos de extracción por microondas como MAHD y SFME ya son considerados como métodos de extracción "verdes", debido al bajo consumo de energía que requieren (Kusuma y Mahfud, 2016). Según los resultados obtenidos, variando las condiciones de proceso, se pueden incurrir en aún más ahorros de energía y emisión de CO<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo observado por Bustamante *et al.* (2016), quienes aducen una disminución en la eficiencia de energía de microondas aplicada a medida que aumenta el tiempo de extracción. Por lo tanto, con la finalidad de desarrollar un proceso de extracción eficiente utilizando energía de microondas, deben elegirse tiempos de irradiación cortos. Sin embargo, los mayores rendimientos que estos autores obtuvieron de aceites esenciales fueron después de tiempos de extracción más largos.

Estos mismos autores mencionan que, esto llevaría a creer que en lugar de aplicar una potencia constante sobre el tiempo de extracción (lo que conduce a un procedimiento menos eficiente), sería más beneficioso para el proceso de extracción aplicar la energía de microondas en (al menos) dos etapas diferentes para i) Ahorrar costos de energía y ii) Aumentar el rendimiento del aceite esencial. En efecto, los resultados obtenidos muestran que al aplicar dos etapas, se puede conseguir un mayor rendimiento de extracción, y al mismo tiempo, un menor gasto de energía y emisión de CO<sub>2</sub>, tal como se observa en el tratamiento 2 (800/ 400 W).

### **4.3 Composición del aceite esencial**

Según los resultados obtenidos y detallados en la Tabla 10, la composición de los aceites analizados está conformada por: entre 98,44 y 99,51% de monoterpenos hidrocarburos, entre 0,47 y 1,30% de monoterpenos oxigenados, entre 0 y 0,26% de otros compuestos aldehídos. En los Anexos (Figura 22 23, 24 y 25), se muestran los cromatogramas obtenidos.

En los tratamientos 1, 2 y 3 se identificaron 4 compuestos que constituyen el 100% de los aceites esenciales. En el tratamiento 4 se identificaron 9 compuestos que constituyen el 100% del aceite esencial. Esto podría atribuirse al menor efecto térmico e hidrolítico en este último tratamiento, al haberse llevado a cabo a una baja potencia constante durante toda la extracción.

Los principales componentes de estos aceites fueron los mismos en todos los tratamientos: Limoneno (95,11- 97,33%), seguido de  $\beta$ - Mirceno (1,77- 2,47%), Linalool (0,47- 1,25%) y  $\alpha$ - Pineno (0,37- 0,59%). Según Tisserand y Young (2014), limoneno, linalool y pinenos se encuentran en diversos aceites esenciales, de hecho, muy pocos no contienen ninguno de éstos.

**Tabla 10**

*Composición química de los aceites esenciales de naranja*

	TRATAMIENTO							
	Trat. 1 (800 W)		Trat. 2 (800 W/ 400 W)		Trat. 3 (400 W/ 800 W)		Trat. 4 (400 W)	
	t <sub>R</sub> (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t <sub>R</sub> (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t <sub>R</sub> (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t <sub>R</sub> (min.)	% en la muestra (áreas relativas)
α- Pineno	12,30	0,42 ± 0,02	12,31	0,38 ± 0,11	12,31	0,37 ± 0,07	12,30	0,59 ± 0,09
Sabineno	-	- -	-	- -	-	- -	13,34	0,23 ± 0,03
β- Mirceno	13,64	1,81 ± 0,07	13,64	1,77 ± 0,10	13,64	1,81 ± 0,04	13,64	2,47 ± 0,29
Octanal	-	- -	-	- -	-	- -	14,02	0,08 ± 0,02
D- Limoneno	14,87	96,83 ± 0,32	14,87	97,33 ± 0,17	14,87	97,32 ± 0,17	14,89	95,11 ± 0,75
Terpinoleno	-	- -	-	- -	-	- -	16,38	0,05 ± 0,01
Linalool	16,60	0,96 ± 0,37	16,61	0,51 ± 0,07	16,61	0,47 ± 0,11	16,60	1,25 ± 0,25
α- Terpeneol	-	- -	-	- -	-	- -	19,25	0,05 ± 0,01
Decanal	-	- -	-	- -	-	- -	19,32	0,18 ± 0,06
<b>Monoterpenos hidrocarburos</b>		99,22 ± 0,37		99,49 ± 0,07		99,51 ± 0,08		98,44 ± 0,33
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		0,78 ± 0,37		0,51 ± 0,07		0,47 ± 0,11		1,30 ± 0,26
<b>Otros (aldehidos)</b>		- -		- -		- -		0,26 ± 0,07

Fuente: Elaboración propia (2019)

Esta composición es similar a la reportada por Bousbia *et al.* (2008), quienes al caracterizar aceites esenciales obtenidos de cáscara de tres variedades diferentes de naranja por MHG, encontraron entre 97,57 y 98,33% de Monoterpenos hidrocarburos (principalmente: 94,64- 95,20% de Limoneno; 1,64- 1,85% de  $\beta$ -Mirceno; 0,43-0,46% de  $\alpha$ - Pineno); y entre 0,67- 0,99% de Monoterpenos oxigenados (principalmente: 0,41- 0,88% de Linalool; 0,06-0,09 de  $\alpha$ - Terpeneol), Sesquiterpenos (0,11- 0,19%), Sesquiterpenos oxigenados (0-0,08%) y otros compuestos oxigenados (0,23- 0,43%).

Un estudio reveló que la HD podría promover la formación de alfa- pineno y beta- pineno a causa de la alta temperatura por tiempos prolongados (Wei *et al.*, 2018). En la presente investigación, la mayor cantidad de alfa-pineno se obtuvo efectivamente en el tratamiento que más tiempo requiere (55 min., Trat. 4), donde la temperatura alcanzada es de 104°C en los últimos minutos del proceso.

Cabe mencionar que los aceites esenciales contienen compuestos orgánicos que absorben fuertemente la energía microondas. Compuestos con alto y bajo momentos dipolares pueden ser extraídos en varias proporciones mediante extracción por microondas. Compuestos orgánicos, como compuestos oxigenados, que tienen un momento dipolar alto van a interactuar más vigorosamente con las microondas y pueden ser extraídos más fácilmente en contraste con compuestos aromáticos que tienen bajo momentos dipolares (como hidrocarburos monoterpenos) (Bousbia *et al.*, 2009). Existe la posibilidad entonces de que, en los tratamientos que involucren mayores potencias, esto haya impulsado la extracción de mayor contenido de hidrocarburos monoterpenos respecto al tratamiento 4 (400W), el cual se llevó a cabo a una baja potencia en su totalidad.

#### **4.4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja**

A pesar del empleo de preservantes para prevenir el deterioro de alimentos y los patógenos transmitidos por alimentos, la seguridad alimentaria es aún un reto en esta industria. Actualmente, hay una necesidad para desarrollar la aplicación de ingredientes naturales, como una alternativa segura y efectiva a los preservantes químicos (Elizaquível *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se emplearon cepas de *Listeria Monocytogenes* y *Escherichia coli*, ambos ampliamente difundidos en la industria alimentaria por ser microorganismos patógenos para el hombre e indicadores de higiene respectivamente, que pueden estar presentes tanto en superficies como en alimentos.

Según Reza *et al.* (2014) la propiedad antimicrobiana de los AEs ha sido el fundamento de muchas aplicaciones, incluyendo la preservación de alimentos crudos y procesados, farmacéuticos, medicina alternativa y terapias naturales. Más aún, esta propiedad muestra un efectivo camino para prevenir el desarrollo de varios sabores desagradables y compuestos indeseables como resultado de la peroxidación lipídica en alimentos.

Basándonos en la escala de medición mencionada por Espina *et al.* (2011), donde una zona de inhibición  $\geq 20$  mm es fuertemente inhibitoria; una zona de inhibición  $<20-12$  mm es moderada/medianamente inhibitoria; y una zona de inhibición  $< 12$  mm es no inhibitoria; se puede decir que tanto en el caso de *L. Monocytogenes* como de *E. coli*, se obtuvo una actividad antimicrobiana moderada ( $<20-12$ mm) en todos los tratamientos.

Se ha reportado que aceites esenciales de cítricos como mandarina, tienen efecto antimicrobiano contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *Salmonella entérica*. El aceite esencial de limón tiene propiedades contra *Lactobacillus plantarum*, *L. monocytogenes*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella entérica*. Adicionalmente, algunos estudios han demostrado inhibición y reducción en el número de patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, y *L. monocytogenes* por aceites esenciales cítricos (Chávez- Gonzales, Rodríguez- Herrera y Aguilar, 2016). Juárez *et al.* (2010), observaron que el AE de naranja obtenido por hidrodestilación, presenta actividad antibacterial contra bacterias Gram positivas como son *S. aureus* y *S. epidermidis*; sin embargo, no obtuvieron actividad contra *E. coli*.

La actividad antibacterial de los aceites esenciales tiene relación con su característica de hidrofobicidad, lo cual, tal como explica Seow *et al.* (2014), representa su habilidad de reaccionar con lípidos en la membrana bacteriana. Esto incrementa la permeabilidad de la membrana, perturba la estructura original de la célula y rompe homeostasis. Cuando hay una cantidad sustancial de fuga del contenido celular de la bacteria, éstas se convierten susceptibles a la muerte celular.

Otros autores sugieren que la actividad antibacteriana es producida por las interacciones provocadas por los AEs en los sistemas enzimáticos relacionados con la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales de las células bacterianas. Por otra parte, se sugiere que los constituyentes de aceites esenciales cruzan la membrana bacteriana, interactuando sus enzimas y proteínas, produciendo por lo tanto, un flujo de protones hacia el exterior de la célula, lo que provoca cambios celulares y, por último, la muerte celular. También se ha revelado que la actividad antimicrobiana está vinculada a la habilidad de los terpenos de alterar la permeabilidad y otras funciones de la membrana, pudiendo estos compuestos cruzar las membranas celulares, ingresando entonces a la célula e interactuando con sitios críticos intracelulares (Viuda- Martos *et al.*, 2008).

En general, la Tabla 11 muestra que los aceites esenciales extraídos exhiben una mayor actividad antimicrobiana contra *L. Monocytogenes* (Gram positiva) que contra *E. coli* (Gram negativa); siendo la mayor actividad exhibida por aquellos obtenidos por los tratamientos 2, 3 y 4 contra *L. Monocytogenes*, los cuales no presentan diferencias estadísticas entre sí, pero si respecto al aceite correspondiente al tratamiento 1, quien presentó la menor actividad contra esta bacteria.

**Tabla 11**

*Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de naranja obtenidos*

		Diámetro de zona de inhibición (mm)	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Trat. 1 (800 W)</b>	15,3 <sup>b</sup> ± 0,8	14,7 <sup>a</sup> ± 0,3
	<b>Trat. 2 (800/ 400 W)</b>	17,5 <sup>a</sup> ± 0,5	14,5 <sup>a, b</sup> ± 0,5
	<b>Trat. 3 (400/ 800 W)</b>	17,5 <sup>a</sup> ± 0,5	13,5 <sup>b</sup> ± 0,5
	<b>Trat. 4 (400 W)</b>	18,2 <sup>a</sup> ± 0,3	12,2 <sup>c</sup> ± 0,3

<sup>a, b, c</sup> Valores que comparten la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes entre sí

Fuente: Elaboración propia (2019)

Por otro lado, la mayor actividad contra *E. coli* corresponde a los aceites obtenidos por los tratamientos 1 y 2, seguido de los tratamientos 3 y 4 respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas entre los aceites de los tratamientos 2 y 3.

Los resultados obtenidos muestran una mayor actividad antimicrobiana sobre una bacteria Gram positiva (*L. Monocytogenes*) en comparación con una Gram negativa (*E. coli*). Seow *et al.* (2014) y Umagiliyage *et al.* (2016) mencionan que en general, fitoquímicos y aceites esenciales tienen una mejor actividad antimicrobiana en microorganismos Gram-positivos. Microorganismos Gram- negativos poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que es casi impermeable a componentes lipofílicos, previniendo entonces que varios componentes antimicrobianos del aceite esencial la penetren. Las enzimas hidrolíticas presentes en su espacio periplásmico pueden también ayudar en la hidrolización de sustancias antimicrobianas. Por otro lado, según Seow *et al.* (2014), las bacterias Gram- positiva no tienen esta barrera, pudiendo los componentes hidrofóbicos del aceite esencial contactar directamente con la bicapa fosfolípida de la membrana bacteriana y causar el aumento de permeabilidad iónica, fugas de constituyentes intracelulares así como impedancia del sistema enzimático. Sin embargo, los aceites esenciales pueden aún actuar en las bacterias Gram- negativa debido a la presencia de proteínas porina en la membrana externa que crea canales suficientemente largos para permitir el paso de componente de poca masa molecular. Espina *et al.* (2011) también encontró que la actividad antibacteriana de aceites esenciales de cítricos en bacterias Gram positiva fue mayor que en las Gram negativas.

Según la literatura, hay una correlación entre la actividad antimicrobiana y la composición de los aceites esenciales (Madhumita, Guha y Nag, 2019). Respecto al hecho de que los aceites obtenidos por el tratamiento 4 y 1 posean una de las mayores actividades contra *Listeria Monocytogenes* y *E. coli* respectivamente, podría relacionarse con su mayor contenido ligero de monoterpenos oxigenados (Linalool en ambos casos y  $\alpha$ - Terpineol adicionalmente en el aceite del tratamiento 4).

Ciertos autores han demostrado que los monoterpenos oxigenados tienen una mayor actividad antimicrobiana que los hidrocarburos (Espina *et al.*, 2011). Al respecto, se ha reportado que la actividad antioxidante del linalool es suficientemente fuerte para justificar sus activas propiedades biológicas en la terapia de cáncer y tratamientos antimicrobianos (Noacco *et al.*, 2018).

Madhumita, Guha y Nag (2019), relaciona la fuerte actividad antimicrobiana del aceite esencial de betel, con la mayor cantidad de Linalool presente en este aceite. Éstos mismos autores, mencionan que el Linalool muestra una fuerte actividad antimicrobiana contra cultivos bacterianos como *E. coli*, *S. Aureus* y *P. Aeruginosa*. Chávez- Gonzales, Rodríguez- Herrera y Aguilar (2016) hacen referencia además a las propiedades antimicrobianas de este compuesto contra *Shigella sonnei*, *Salmonella flexneri*, *Staphylococcus epidermis*, *Arcobacter butzleri*, *Campylobacgter jejuni*, *E. coli* O157:H7, y *L. monocytogenes*.

De igual manera, Chávez- Gonzales, Rodríguez- Herrera y Aguilar (2016), mencionan que  $\alpha$ - Terpineol tiene un efecto importante en *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Así mismo, también se puede observar, que el aceite obtenido mediante el Tratamiento 2 exhibió una de las mayores actividades antimicrobianas contra *L. Monocytogenes* y *E. coli* respectivamente, no siendo su actividad estadísticamente diferente respecto al aceite obtenido por el Tratamiento 3. En general se observa una ligera mayor cantidad de monoterpenos hidrocarburos en ambos casos, siendo el Limoneno, el compuesto predominante.

Según Chávez- Gonzales, Rodríguez- Herrera y Aguilar (2016), las propiedades físico-químicas y biológicas del limoneno tienen un importante impacto en las propiedades biológicas de los primordiales constituyentes del aceite esencial. Umagiliyage *et al.* (2016) mencionan que muchas publicaciones han revelado que los aceites esenciales que poseen limoneno como fitoquímico prominente, tienen actividad antimicrobiana contra varias especies de microorganismos.

Limoneno ha mostrado ser efectivo contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella entérica*, y *Saccharomyces bayamus*, así como otros microorganismos. Se ha encontrado que este compuesto es efectivo contra cultivos de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Staphylococcus epidermis*, pudiendo ejercer una actividad antimicrobiana potente y de amplio espectro.

Los resultados de los experimentos realizados en membranas bacterianas artificiales por Hąc-Wydro, Flasiński y Romańczuk (2017) evidencian que el limoneno es capaz de incorporarse en el sistema lipídico y alterar sus propiedades, sin embargo, la fluidización

inducida por el aceite esencial es determinado por la concentración de limoneno, modelo de la composición de membrana y sus propiedades.

Mitropoulou *et al.* (2017) reportan una zona de inhibición de  $15 \pm 0,3$  y  $25 \pm 0,7$  mm contra *L. Monocytogenes* y *E. coli* respectivamente por parte del Limoneno, partiendo de una inoculación inicial de 5 log UFC/ mL en ambos casos.

Hay que considerar que la actividad antimicrobiana, si bien está relacionada con los compuestos que forman parte de los aceites esenciales, también lo está con la interacción de los mismos. Verica y Petar (2014) señalan que pruebas *in vitro* indican que los terpenos son ineficientes como antimicrobianos cuando son aplicados como compuestos individuales.

De igual manera Viuda- Martos *et al.* (2008) mencionan que es razonable creer que por causa de la complejidad de los aceites esenciales, difícilmente se podría atribuir su total efecto antimicrobiano a uno o unos pocos principales componentes. Diversas investigaciones han demostrado que los aceites esenciales exhiben actividades antimicrobianas más pronunciadas que sus principales constituyentes, y que el efecto sinérgico de los diferentes compuestos del AE fueron bien observados.

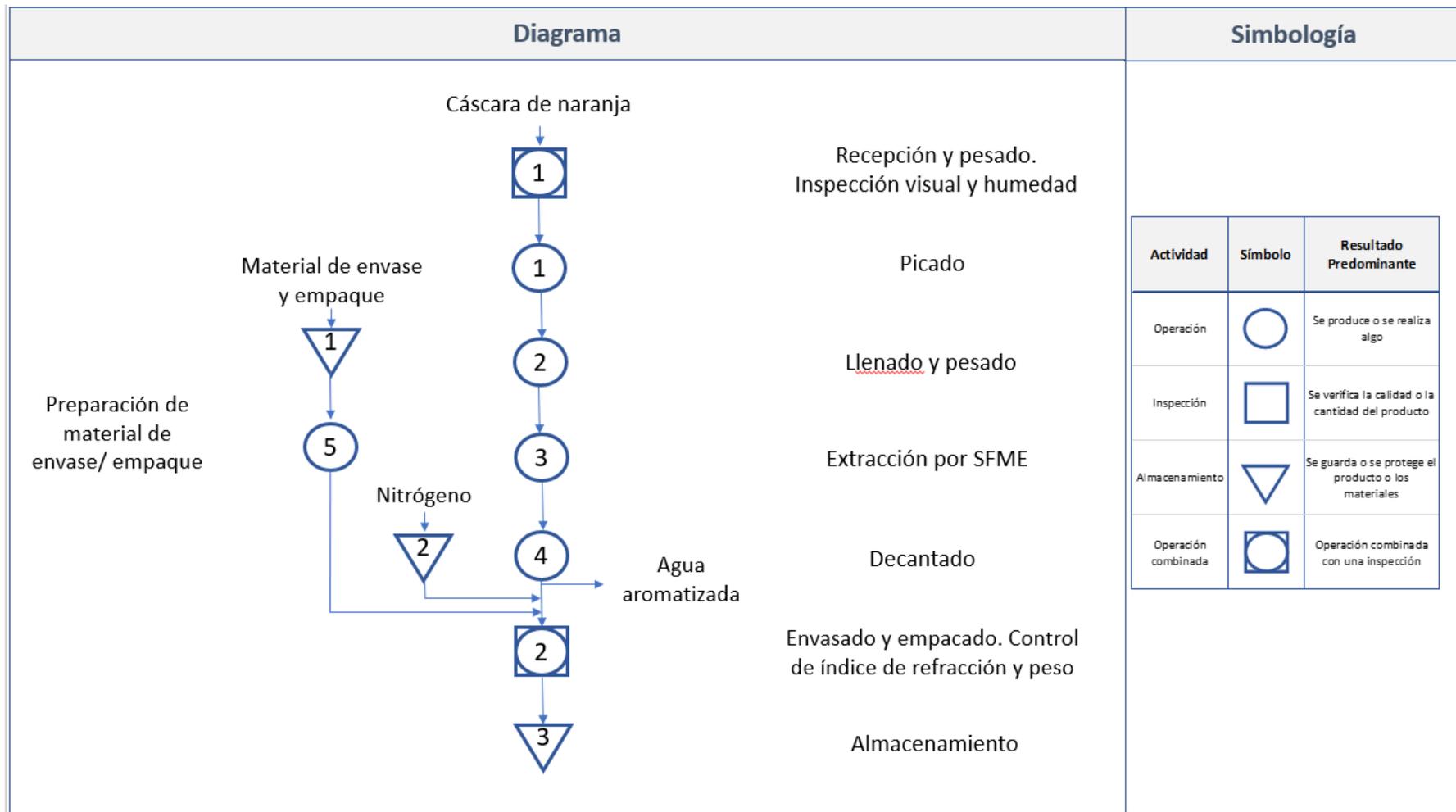
## **CAPÍTULO V. DISEÑO DE UNA LÍNEA DE PRODUCCIÓN PILOTO DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE NARANJA**

Según muchos investigadores, el diseño de planta es una forma de reducir el costo de fabricación y aumentar la productividad. También aumenta el buen flujo de trabajo en la ruta de producción (Shewale, Shete y Sane, 2012; Wiyaratn y Watanapa, 2010)

Dedicar un poco de tiempo a planificar el arreglo antes de la instalación puede evitar pérdidas innecesarias. Planificar el diseño desde el principio antes de construir la planta u oficina es la mejor manera de reducir los costos notablemente. Es importante que las instalaciones se gestionen adecuadamente para lograr el objetivo (Ojagui *et al.*, 2015).

Para el diseño de una línea de producción piloto de aceite esencial de naranja, se emplean herramientas de la metodología Planeamiento Sistemático de la distribución (SPL por sus siglas en inglés). Esta metodología es ampliamente usada según Naqvi *et al.* (2016), en el diseño para varias pequeñas y medianas empresas. Para esto, se definió primero, el flujo de operaciones a seguir para conseguir el producto deseado (ver Fig. 14) y se enumeró las áreas y equipos requeridos para una planta con capacidad de procesar 3,350 kg/ h de cáscara de naranja, con lo cual se podría obtener- en base a los resultados de esta investigación- 80,7 g/ h aproximadamente de aceite esencial de naranja. Bousbia *et al.* (2009) obtuvieron rendimientos de aceite esencial de naranja entre 0,84% y 1,26%, por hidrodestilación durante 180 minutos. Considerando estos datos, y usando un equipo de hidrodestilación con la misma capacidad en volumen de materia prima, se obtendría una capacidad de producción entre 5 y 7 g de aceite esencial/ h.

En la Fig. 14 se presenta el diagrama de operaciones propuesto para la línea de producción piloto de aceite esencial de naranja. La materia prima, cáscara de naranja obtenida de comercializadores/ productores de jugo de naranja, es ingresada a la planta, inspeccionada visualmente y pesada en la etapa de Recepción y pesado. Aquí se controla adicionalmente, la humedad de la materia prima. A continuación, la materia prima es alimentada al equipo picador semi automático, donde el producto es trozado y recibido en jabs.



**Figura 14:** Diagrama de operaciones para la extracción de aceite esencial

Fuente: Elaboración propia (2019)

Luego, el producto es colocado en recipientes de 5 litros de capacidad, el cual es colocado al interior del equipo de extracción por microondas, de donde se obtiene el aceite esencial arrastrado por el vapor generado en la misma materia prima.

La separación del agua y aceite esencial se realiza por decantación, y el aceite obtenido es envasado en frascos oscuros. Antes del cierre del envase, se realiza una inertización con nitrógeno, con la finalidad de prolongar la vida de anaquel del producto. Posteriormente, el producto es colocado en cajas y almacenado.

En base a la información anterior, se listaron las áreas requeridas (ver Tabla 12) y los equipos requeridos por área (ver Tabla 13). Se tienen 15 áreas en total de las cuales 10 no requieren de divisiones físicas por estar relacionadas con actividades de producción y control de materia prima (MP) y producto terminado (PT). Así mismo, en la Tabla 14 se mencionan los equipos requeridos de proceso, análisis, y de registro de resultados y controles.

**Tabla 12**

*Lista de áreas requeridas*

<b>N°</b>	<b>AREA</b>
1	Recepción y pesado de MP
2	Picado Llenado y pesado de MP
3	picada
4	Extracción
5	Decantación
6	Envasado y empaçado
7	Control de PT y MP
8	Registro de controles
9	Lavado de materiales
10	Lavado de manos
11	Aduana sanitaria
12	Preparación de material de envasado/ empaçado
13	Almacén de nitrógeno Almacén de producto
14	terminado
15	SSH y vestuarios

Fuente: Elaboración propia (2019)

**Tabla 13***Lista de equipos requeridos*

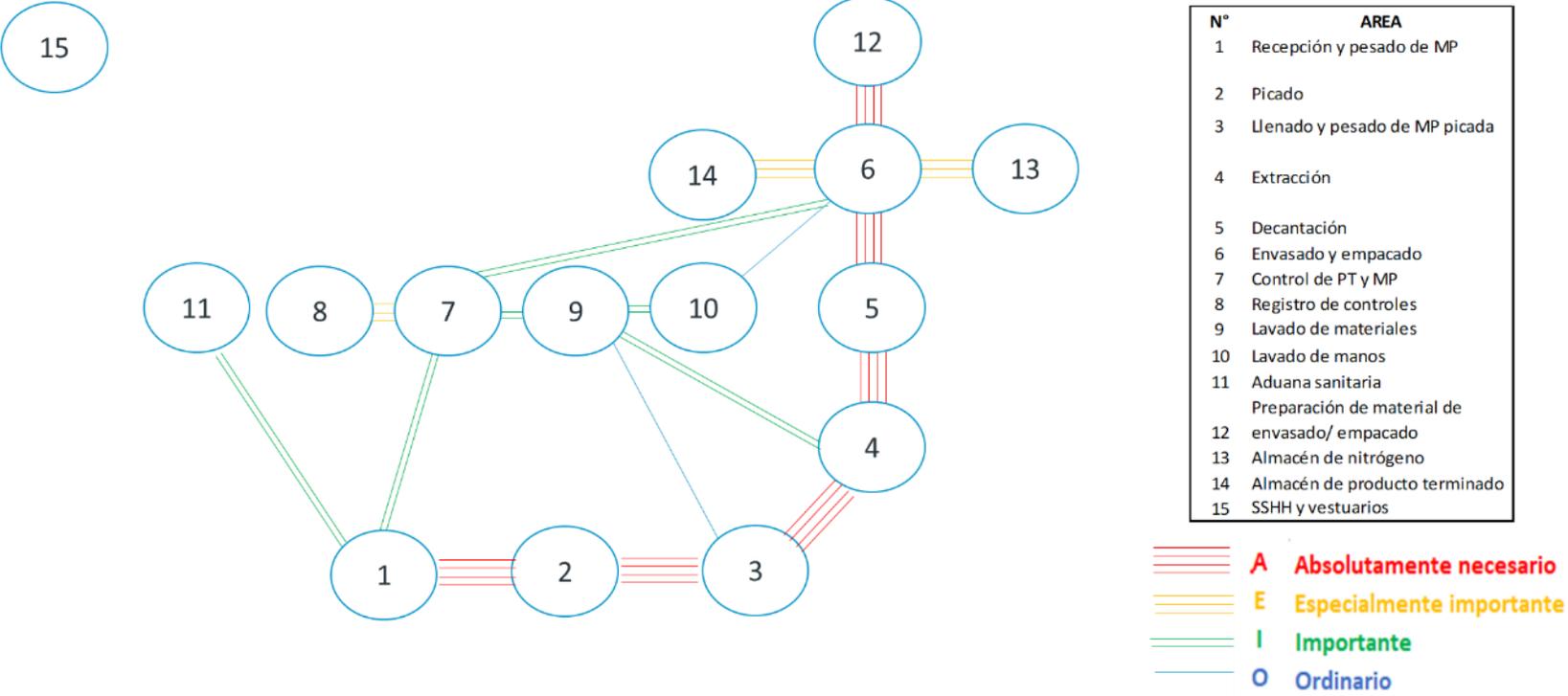
<b>N°</b>	<b>EQUIPO</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>AREA</b>
A	Balanza	1	Recepción y pesado
B	Picadora	1	Picado
C	Balanza de precisión	2	Llenado y pesado de materia prima/ Envasado y empacado
D	Microondas	1	
E	Baño de recirculación	1	Extracción
F	UPS	1	
G	Pera de decantación	2	Decantación/ Envasado y empacado
H	Balanza de humedad	1	
I	Refractómetro	1	Control de PT y MP
J	Computadora	1	
K	Impresora	1	Registro de controles

Fuente: Elaboración propia (2019)

Mediante un cuadro relacional de actividades (ver Fig. 15), se evaluaron las posibles interrelaciones de cada área respecto a todas las demás áreas requeridas. Se tienen seis niveles de relación (Absolutamente necesario, Especialmente importante, Importante, Ordinario, No importante, No deseable) y siete razones de proximidad (Flujo de producto en proceso, Facilidad de supervisión/ inspección, Flujo de personal, Buenas prácticas de manufactura, Registro de controles, Flujo de accesorios/ material de análisis/ residuos, Por conveniencia/ comodidad). En este cuadro se puede observar que la interrelación más fuerte viene dada por flujo de producto en proceso.



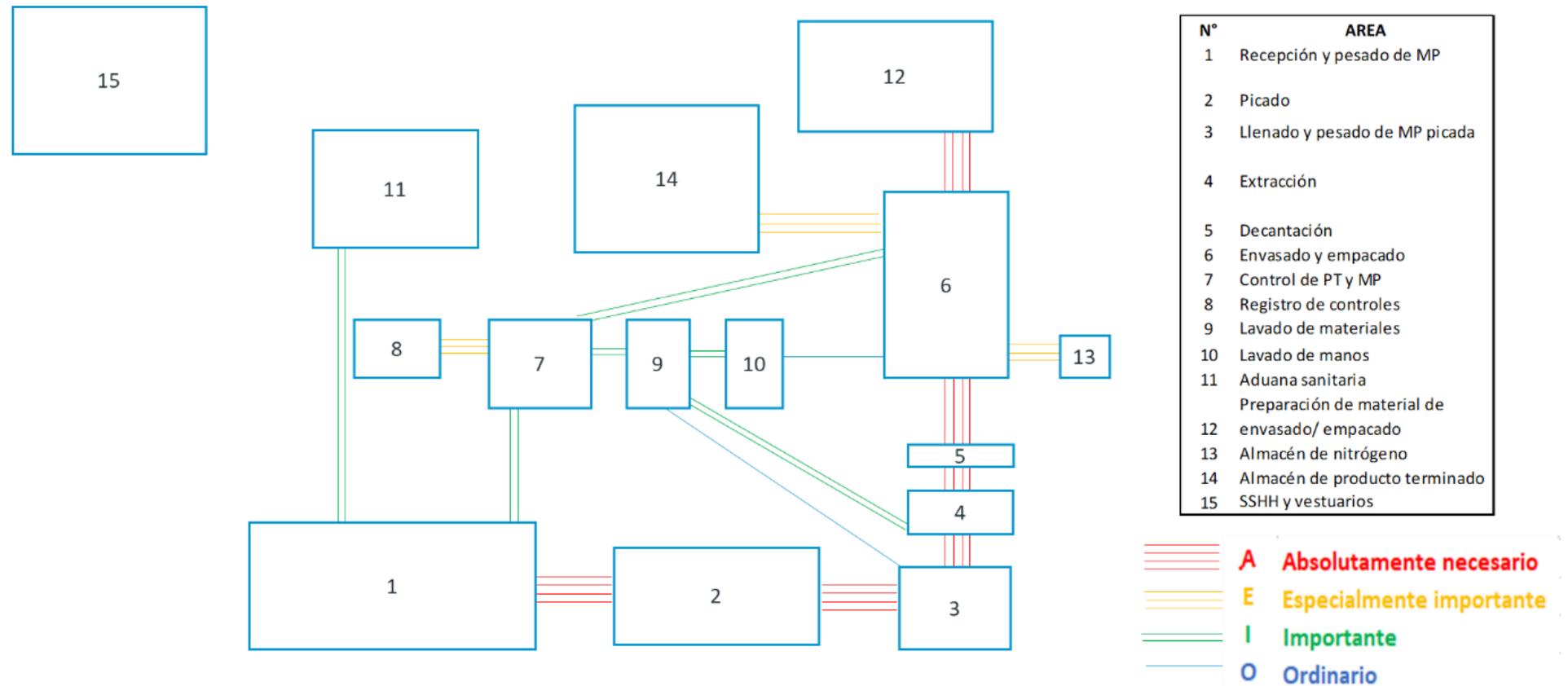
Luego, con ayuda del diagrama relacional de actividades (ver Fig. 16), las áreas fueron distribuidas tratando que la secuencia de las operaciones esté de acuerdo al diagrama de operaciones, y que las actividades con mayor flujo de material estén lo más próximas posibles entre sí; cumpliendo de esta manera, con el principio de circulación o flujo de materiales y el principio de mínima distancia recorrida.



**Figura 16:** Diagrama relacional de actividades

Fuente: Elaboración propia (2019)

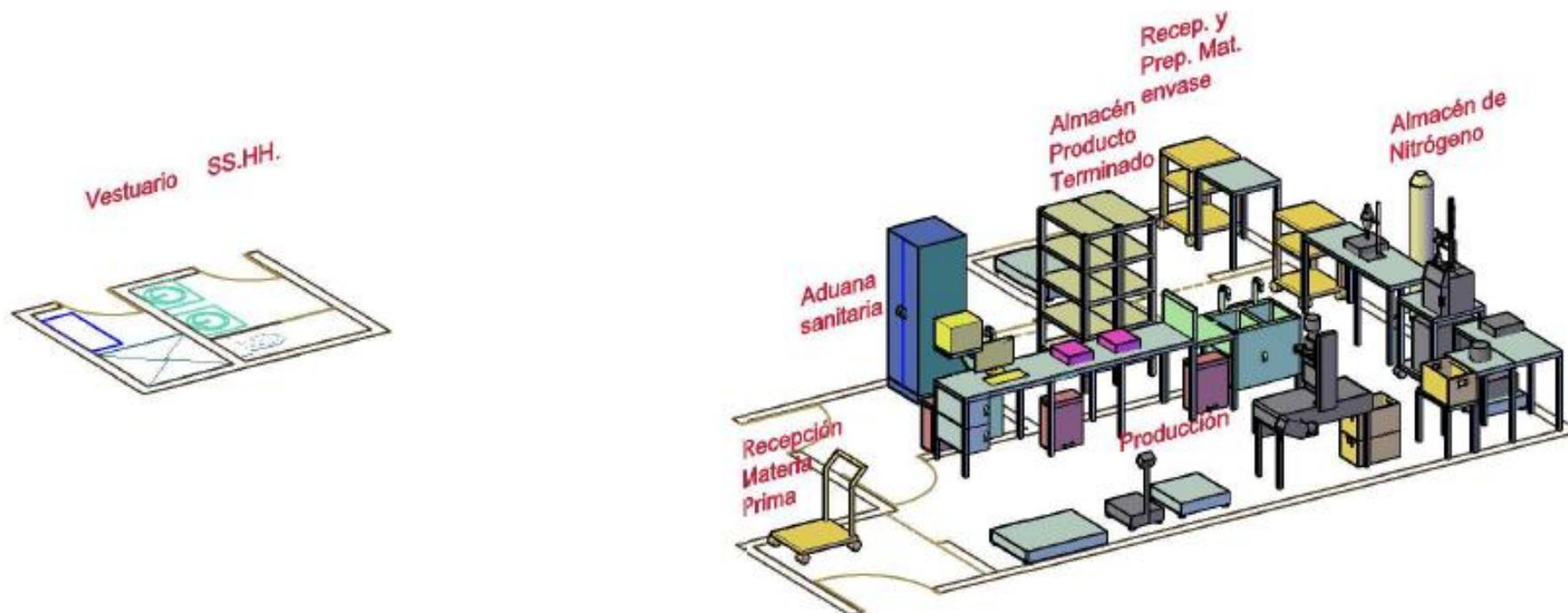
En base al tamaño aproximado que requiere cada área y al diagrama relacional de actividades, se elabora el Diagrama Relacional de Espacios (ver Fig. 17), en el cual la dimensión que ocupa cada actividad es proporcional al área que requiere.



**Figura 17:** Diagrama relacional de espacios

Fuente: Elaboración propia (2019)

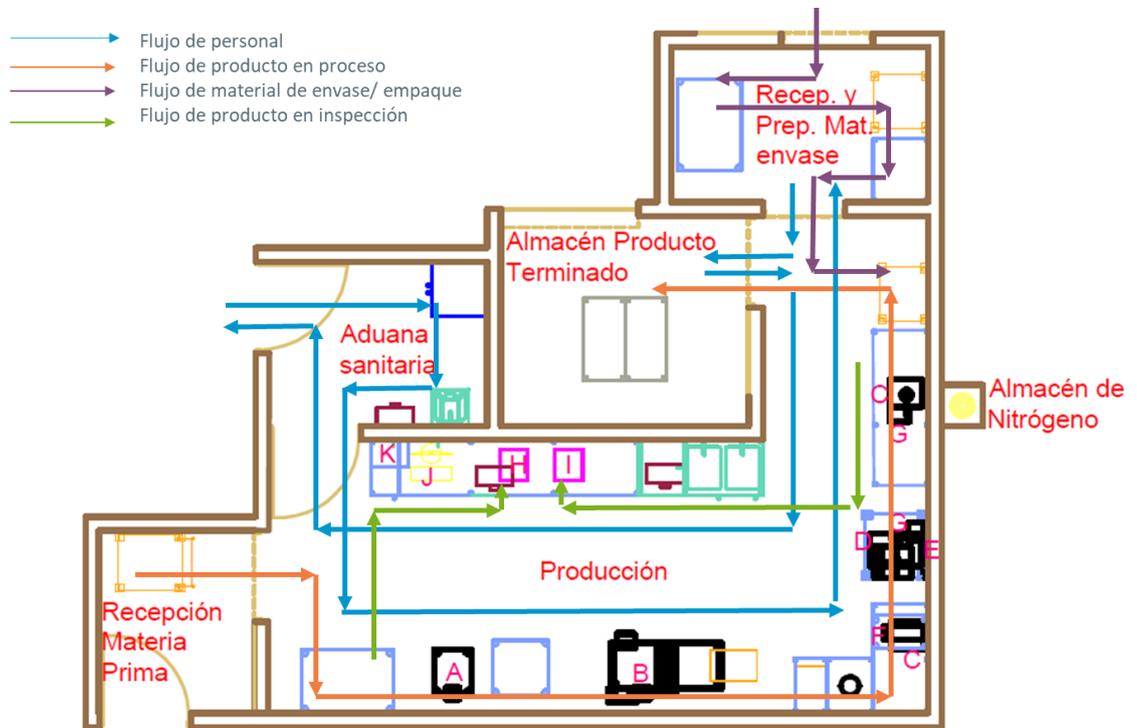
Finalmente, en la Figura 18, se presenta el plano en 3D del diseño propuesto para una línea de producción piloto de aceite esencial de cáscara de naranja, realizado con el software Autocad 2018.



**Figura 18:** Diseño de una línea de producción piloto de aceite esencial a partir de cáscara de naranja

Fuente: Elaboración propia (2019)

En la Fig. 19, se presentan los flujos de personal, producto en proceso, producto en inspección y material de envase/ empaque.



**Figura 19:** Flujos de personal, producto en proceso, material de envase/ empaque y producto en inspección

Fuente: Elaboración propia (2019)

# CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 6.1 Conclusiones

Tras realizar el estudio del efecto de la curva de temperatura en el proceso de extracción de aceite esencial de naranja por microondas libre de solventes, en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1) La curva de temperatura obtenida durante el proceso de extracción tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción. La Tabla 8 muestra que son los tratamientos 2 (800/ 400 W) y 4 (400 W) los que presentaron mayores rendimientos (3,05 y 3,60% respectivamente); siendo el tratamiento 2 el que conlleva menor consumo de energía (0,233 kW-h) y emisión de CO<sub>2</sub> (186,7 g) (ver Tabla 9 y Figura 13).
- 2) La composición de los aceites esenciales de naranja, detallada en la Tabla 10, presentó en general los mismos compuestos mayoritarios: Limoneno (95,11- 97,33%), seguido de  $\beta$ - Mirceno (1,77- 2,47%), Linalool (0,47- 1,25%) y  $\alpha$ - Pineno (0,37- 0,59%). El tratamiento 4 presentó adicionalmente, tres hidrocarburos oxigenados adicionales en menores cantidades (1,30% en total) y dos aldehídos (0,26% en total).
- 3) Todos los aceites esenciales obtenidos por SFME, presentan actividad antimicrobiana contra *Listeria Monocytogenes* (Gram positivo) y *Escherichia Coli* (Gram negativo). En la Tabla 11 se muestra que esta actividad es mayor contra *Listeria Monocytogenes*. Los tratamientos 2, 3 y 4 presentan actividad similar y significativamente mayor (zona de inhibición= 17,5; 17,5 y 18,2 mm respectivamente) contra *L. Monocytogenes* respecto al tratamiento 1 (15,3 mm); y los tratamientos 1, 2 y 3 (zona de inhibición= 14,7; 14,5 y 13,5 mm) presentan mayor actividad contra *E. coli* respecto al tratamiento 4 (12,2 mm).
- 4) El diseño propuesto para una línea de producción piloto de extracción de aceite esencial a partir de cáscara de naranja por SFME, y que se muestra en las Figuras 18 y 19, tiene una capacidad para procesar 3,350 kg/h de cáscara de naranja lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, podría resultar en 80,7 g/h de aceite esencial. Emplear un equipo de extracción tradicional por hidrodestilación, con la misma capacidad en volumen para contener la misma prima, resultaría en una capacidad de planta mucho menor (entre 5 y 7 g de aceite esencial/h aproximadamente), considerando los resultados

obtenidos por Bousbia *et al.* (2009), sobre tiempos y rendimientos de aceites de cáscara de cítricos. La línea de producción propuesta tiene una distribución monolineal, que requiere 30 m<sup>2</sup> de área aproximadamente para operaciones de proceso y control de producto/ materia prima, y 19 m<sup>2</sup> aproximadamente para áreas relacionadas.

## **6.2 Recomendaciones**

Se tienen las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios similares (extracciones por microondas en dos o más etapas, combinando potencias altas y bajas) en otras matrices, y evaluar su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana.
- Llevar a cabo el estudio realizado a mayor escala, empleando equipos microondas industriales para las extracciones de aceite esencial.
- Cuantificar la concentración de los compuestos de los aceites esenciales producidos por microondas.
- Desarrollar investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales extraídos por microondas en alimentos, productos cosméticos y de higiene personal, y su impacto sobre la vida en anaquel y test de desafío.
- Evaluar el impacto de aceites esenciales producidos por microondas, sobre los atributos sensoriales de alimentos, cosméticos y productos de higiene personal; en los que pueda estar presente como ingrediente.
- Evaluar el impacto de aceites esenciales producidos por microondas sobre la actividad antimicrobiana de los sanitizantes, en los que pueda estar presente como ingrediente.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC International. (2012). *Official Methods of Analysis*. Edición 19.
- Artiga-Artiga, M., Acevedo-Fani, A., & Martín-Belloso, O. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin. *Food Control*.
- Benmoussa, H., Farhat, A., Romdhane, M., & Bouajila, J. (2016). Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill essential oil seeds using double walled reactor. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2008). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M., Petitcolas, E., Meklati, B., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*.
- Bustamante, J., van Stempvoort, S., García-Gallarreta, M., Houghton, J., Briers, H., Budarin, V. L., Mat, A. S., Clark, J. (2016). Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production*.
- *Centro de Comercio Internacional (ITC). Trade Map*. (2019). Obtenido de <https://www.trademap.org/Index.aspx>
- Chávez-González, M., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2016). Chapter 11 Essential Oils A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. En K. Kon, & M. Rai, *Antibiotic Resistance*. El Servier.
- Chemat, F., Lucchesi, M., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G., & Visinoni, F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*.
- Chen, Q., Hu, Z., Yao, F. Y., & Liang, H. (2016). Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT-Food Science and Technology*.

- Costa, S. S., Garipey, Y., Rocha, S., & Raghavan, V. (2014). Microwave extraction of mint essential oil- Temperature calibration for the oven. . *Food Journal Engineering*.
- Elizaquível, P., Azizkhani, M., Sánchez, G., & Aznar, R. (2013). Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* entérica and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. *Food Control*.
- El-Sayed, H. S., Chizzola, R., & Rama, A. A. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. . *Food Control*.
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A., Visinoni, F., Romdhane, M., & Chemat, F. (2010). A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography*.
- Ferhat, M., Brahim, Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal for Chromatography A*.
- Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. *Food Chemistry*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat>
- Franco-Vega, A., Ramirez-Corona, N., López-Malo, A., & Palou, E. (2018). Studying microwave assisted extraction of *Laurus nobilis* essential oil: static and dynamic modelling. *Journal of Food Engineering*.
- Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Estimation of mass transfer coefficients of the extraction process of essential oil from orange peel using microwave assisted extraction. *Journal of Food Engineering*.

- Guo, J.-j., Gao, Z.-p., Xia, J.-l., Ritenour, M., Li, G.-y., & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*.
- Hąc-Wydro, K., Flasiński, M., & Romańczuk, K. (2017). Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limoneno antibacterial activity. *Food Chemistry*.
- Hautea, S., Raesa, K., Devlieghereb, F., & Sampersa, I. (2017). Combined use of cinnamon essential oil and MAP/vacuum packaging to increase the microbial and sensorial shelf life of lean pork and salmon. *Food Packaging and Shelf Life*.
- *Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI)*. (2019). Obtenido de <https://www.inei.gob.pe>
- Juárez, J. R., J., C. A., Jaúregui, J. F., Lizano, J. V., Carhuapoma, M. C., Félix, L. M., Cotillo, P. A., López, J. P., Jaramillo, M. R., Córdova, A. I., Ruíz, J. R., Ramos, N. J. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación*.
- Kusuma, H., & Mahfud, M. (2016). Comparison of conventional and microwave-assisted distillation of essential oil from *Pogostemon cablin* leaves: Analysis and modelling of heat and mass transfer. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*.
- Kusuma, H., & Mahfud, M. (2017). Kinetic studies on extraction of essential oil from sandalwood (*Santalum album*) by microwave air-hydrodistillation method. *Alexandria Engineering Journal*.
- Li, X.-J., Wang, W., Luo, M., Li, C.-Y., Zu, Y.-G., Mu, P.-S., & Fu, Y.-J. (2012). Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*.
- Lin, C.-M., Sheu, S.-R., Hsu, S.-C., & Tsai, Y.-H. (2010). Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel. *Food Control*.

- Liu, Z., Deng, B., Li, S., & Zou, Z. (2018). Optimization of solvent-free microwave assisted extraction of essential oil from *Cinnamomum camphora* leaves. *Industrial Crops*.
- Liu, Z., Zu, Y., & Yang, L. (2017). A process to preserve valuable compounds and acquire essential oils from pomelo using a microwave irradiation treatment. *Food Chemistry*.
- Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica L. var. sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT - Food Science and Technology*.
- Lucchesi, M. E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., & Chemat, F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum L.*: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*.
- Madhumita, M., Guha, P., & Nag, A. (2019). Extraction of betel leaves (*Piper betle L.*) essential oil and its bio- actives identification: Process optimization, GC- MS analysis and anti- microbial activity. *Industrial Crops and Products*.
- Megawati, & Murniyawati. (2015). Microwave assisted hydrodistillation for the extraction of essential oils from Bail Orange peel as aromatherapy candles. .
- Megawati, Fardhyanti, D. S., Sediawan, W. B., & Hisyam, A. (2019). Kinetics of mace (*Myristicae arillus*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power. *Industrial Grops and Products*.
- Mitropoulou, G., Fitsiou, E., Spyridopoulou, K. T.-K., Bardouki, H., Vamvakias, M., Panas, P., Chlichlia, K., Pappa, A., Kourkoutas, Y. (2017). *Citrus medica* essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. *LWT- Food Science and Technology*.
- Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Younes, H. A., Ashmawy, N., Salem, M. Z., Márquez-Molina, O., & Barbabosa- Pilego, A. (2019). Antibacterial activity of three essential oils and some monoterpenes against *Ralstonia solanacearum* phylotype II isolated from potato. *Microbial Pathogenesis*.
- Murniyawati, M. y. (2015). Microwave assisted hydrodistillation for the extraction of essential oils from Bail Orange peel as aromatheray candles.

- Naqvi, S. A., Fahag, M., Atir, M., Zabair, M., & Shehzad, M. M. (2016). Productivity improvement of a manufacturing facility using systematic layout planning. . *Production and manufacturing research article*.
- Navarrete, A., Mato, R., & Cocero, M. (2012). A predictive approach in modeling and simulation of heat and mass transfer during microwave heating. Application to SFME of essential oil of Lavandin Super. *Chemical Engineering Science*.
- Noacco, N., Rodenak- Kladniew, B., García de Bravo, M., Castro, G. R., & Islan, G. A. (2018). Simple colorimetric method to determine the in vitro antioxidant activity of different monoterpenes. *Analytical Biochemistry*.
- Ojaghi, Y., Khademi, A., Yusof, N. M., Renani, N. G., & Hassan, S. A. (2015). Production Layout Optimization for small and Medium scale Food Industry. *12th Global Conference on Sustainable Manufacturing*.
- Qia, X., Lia, T., Weia, Z., Guoa, N., Luo, M., Wanga, W., Zua, Y.G., Fua, Y.J, Penga, X. (2014). Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*.
- Razzaghi, S. E., Arabhosseini, A., Turk, M., Soubrat, T., Cendres, A., Kianmehr, M. H., Perino, S., Chemat, F. (2018). Operational efficiencies of six microwave based extraction methods for orange peel oil. *Journal of Food Engineering*.
- Reza, S., Delfan, B., Ghambarzadeh, S., Rashidipour, M., Veiskarami, G. H., & Ghasemian- Yadegari, J. (2014). Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. *Asian Pacific Journal* .
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2014). Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Shewale, P. P., Shete, M. S., & Sane, S. (2012). Improvement in plant layout using systematic layout planning (SLP) for increased productivity. *International Journal of Advanced Engineering research and studies*.

- Sirocchi, V., Devlieghere, F., Peelma, N., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., & Ragaert, P. (2016). Effect of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil combined with different packaging to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chemistry*.
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). *Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals.* . Editorial Churchill Livingstone. Segunda Edición.
- Umagiliyage, A. L., Becerra- Mora, N., Kohli, P., Fisher, D. J., & Choudhary, R. (2016). Antimicrobial efficacy of liposomes containing -Limonene and its effect on the storage life of blueberries. *Postharvest Biology and Technology*.
- Verica, A., & Petar, K. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis L.* *Microbiol Research*.
- Viuda- Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández- López, J., & Pérez- Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food control*.
- Wei, Z.-F., Zhao, R.-N., Dong, L.-J., Zhao, X.-Y., Su, J.-X., Zhao, M., Lin, L., Bian, Y.-J., Zhang, L.-J. (2018). Dual-cooled solvent-free microwave extraction of *Salvia officinalis L.* essential oil and evaluation of its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*.
- Wiyaratn, W., & Watanapa, A. (2010). Improvement Plant Layout Using Systematic Layout Planning (SLP) for Increased Productivity. *International Journal of Industrial and Manufacturing Engineering*.

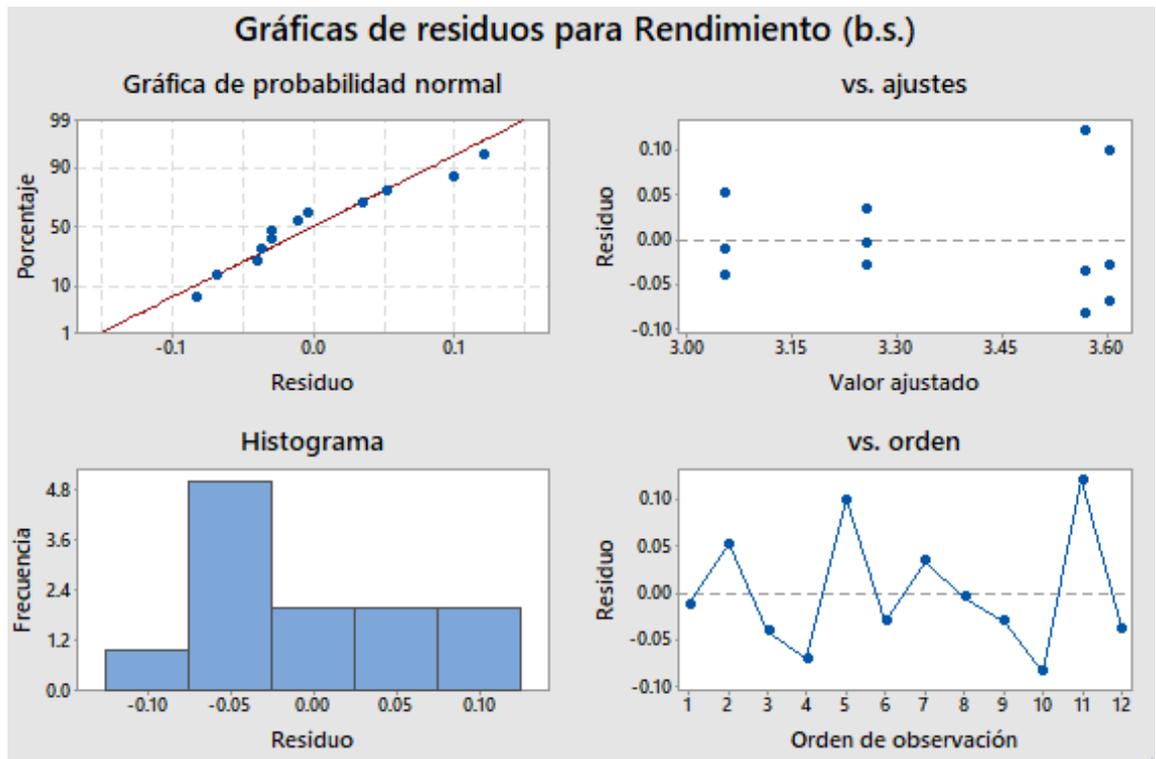
## ANEXOS

**Tabla 14**

*Análisis de varianza (ANOVA) sobre el rendimiento de aceite esencial*

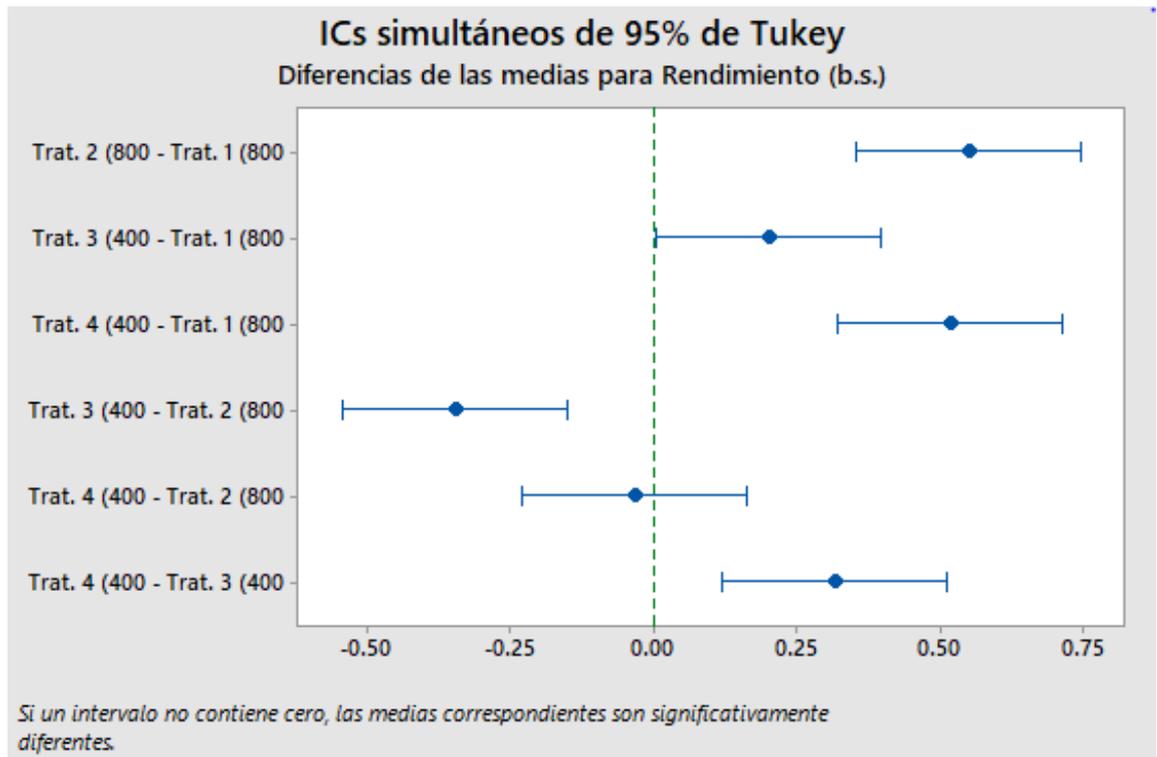
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	0.62069	0.206898	36.77	0.000
Error	8	0.04502	0.005627		
Total	11	0.66571			

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 20:** Gráfico de residuos para el rendimiento de aceite esencial

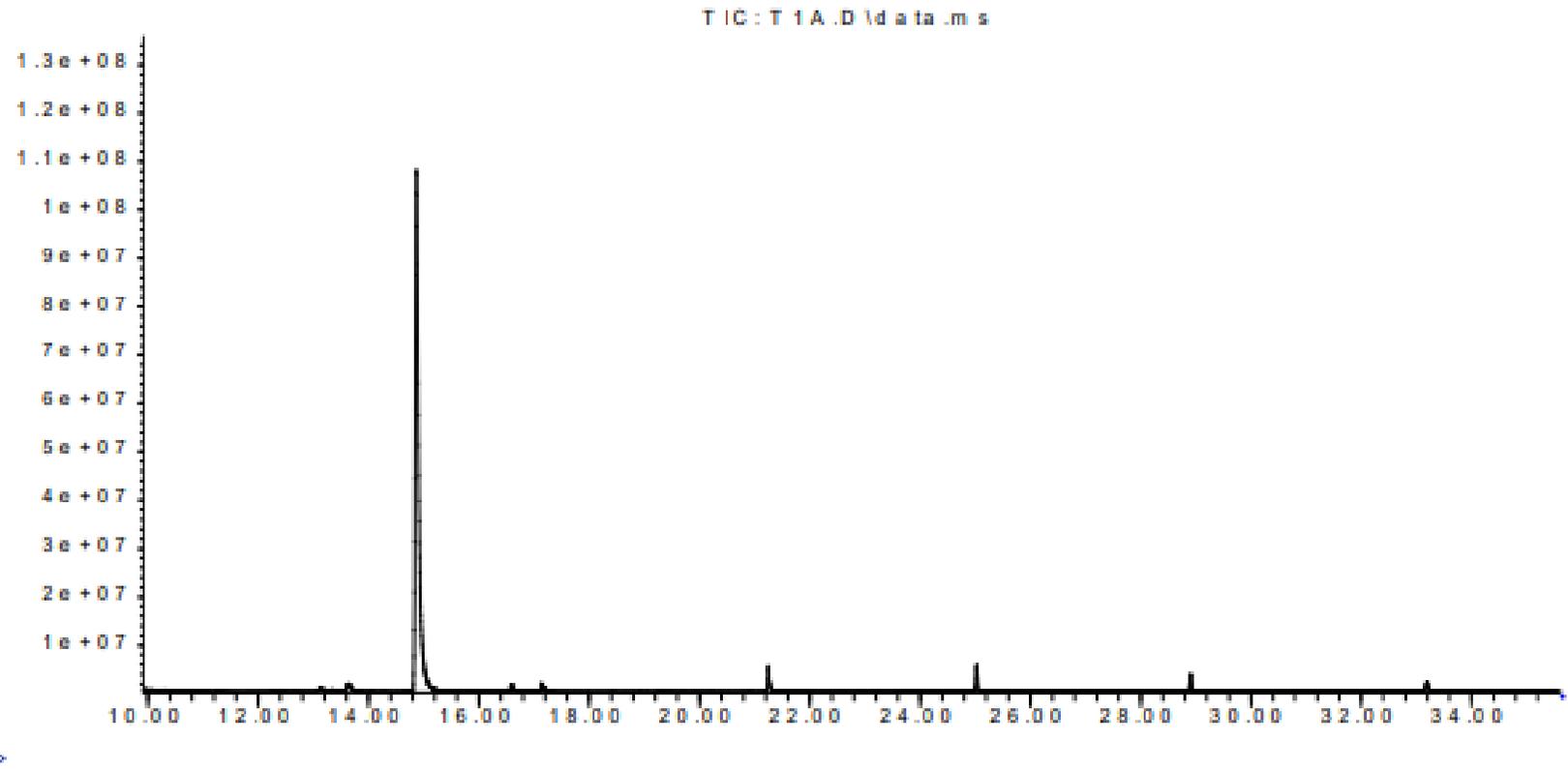
Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 21:** Análisis de Tukey para el rendimiento de aceite esencial

Fuente: Elaboración propia (2019)

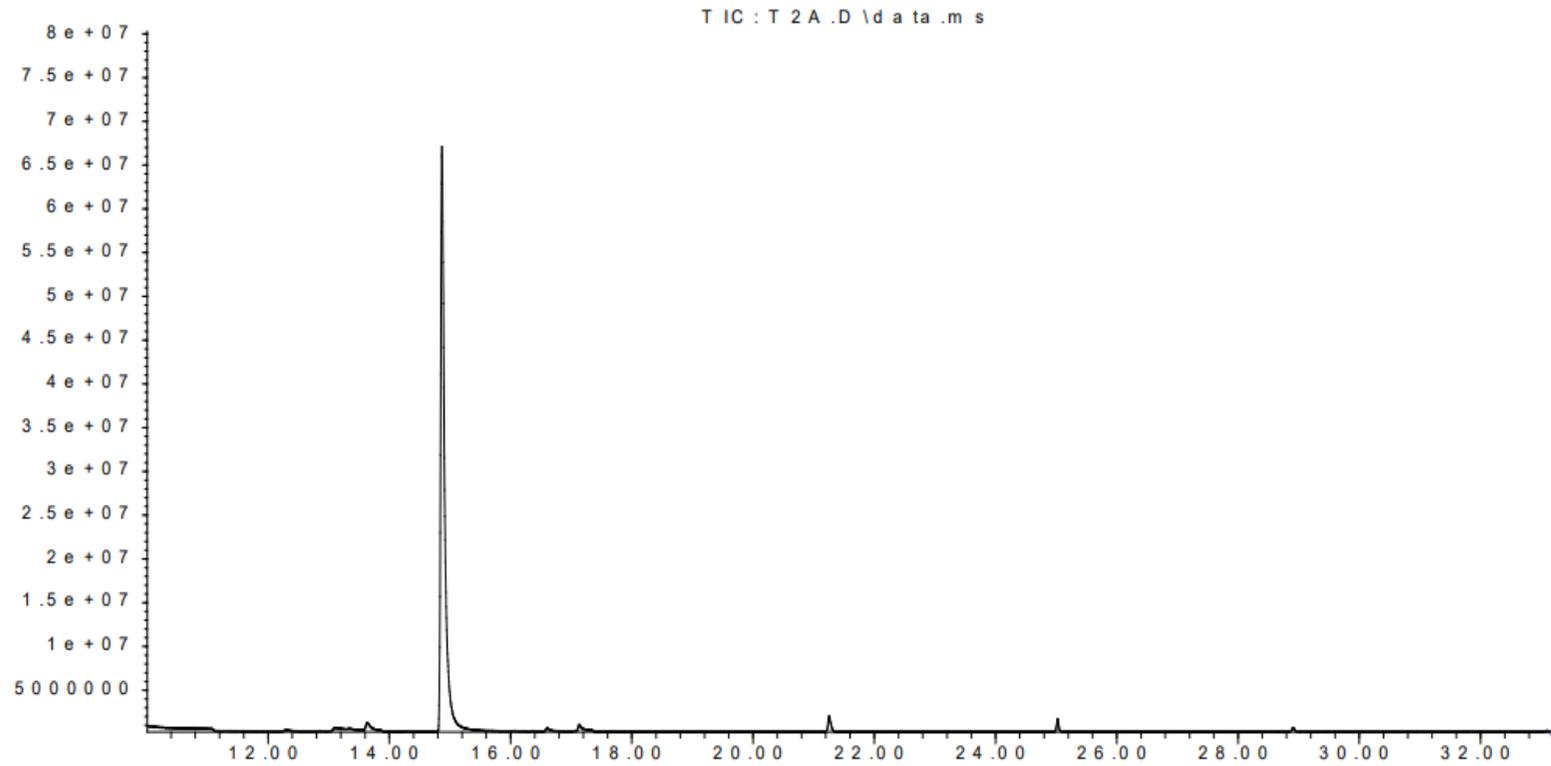
Abundance



**Figura 22:** Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 1 (800 W)

Fuente: Elaboración propia (2019)

Abundance

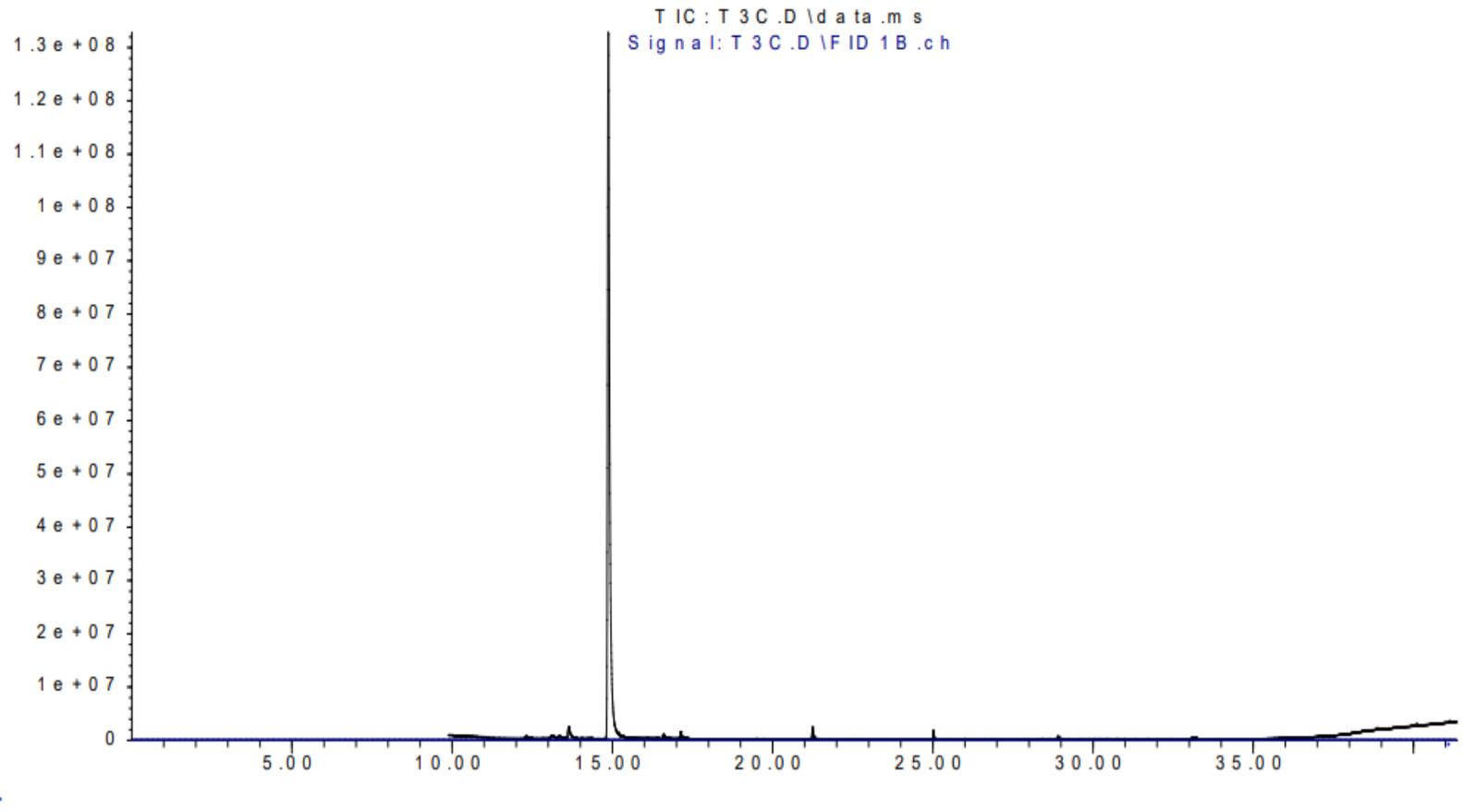


Time -->

**Figura 23:** Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 2 (800/ 400 W)

Fuente: Elaboración propia (2019)

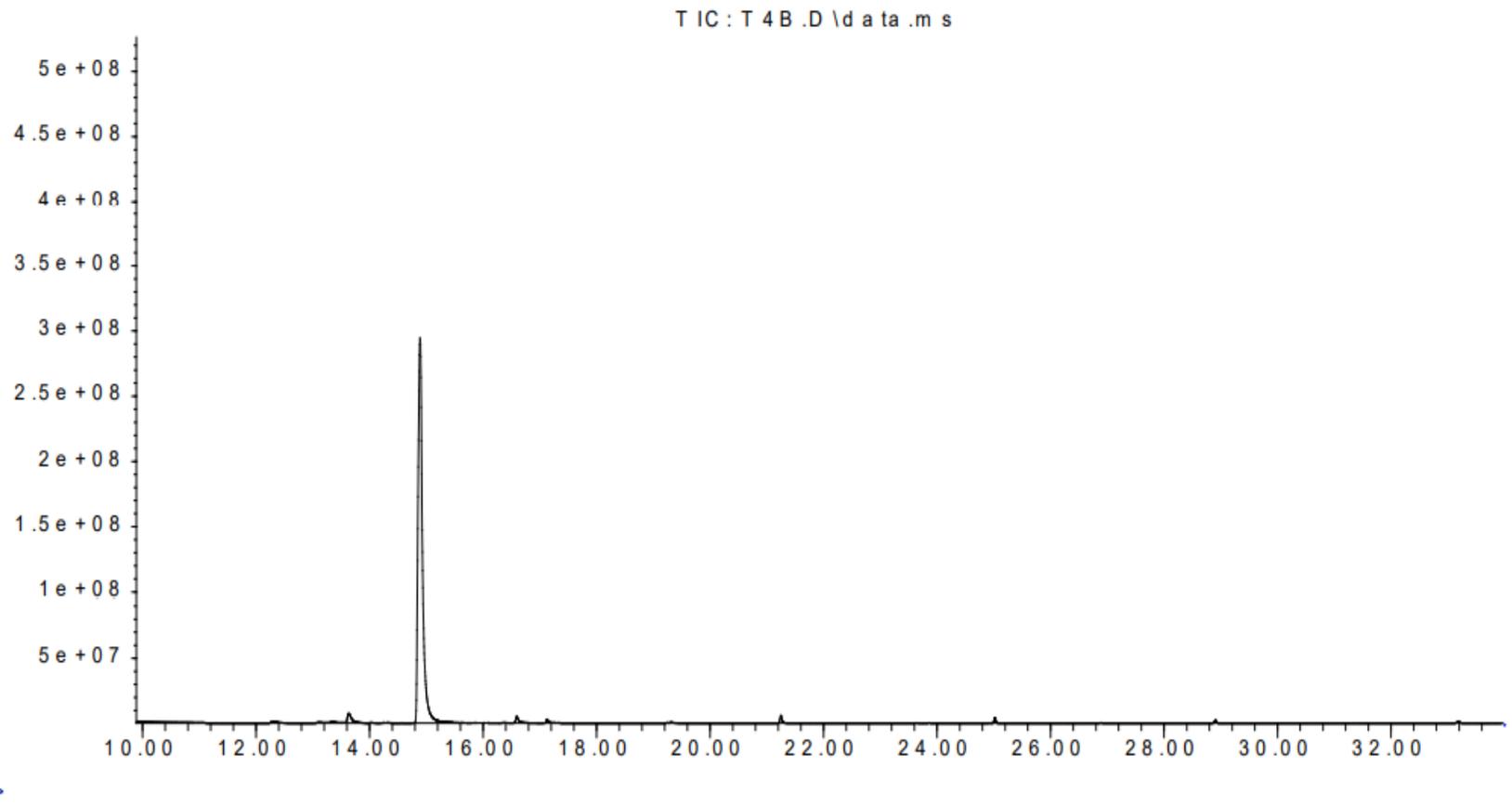
Abundance



**Figura 24:** Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 3 (400/ 800W)

Fuente: Elaboración propia (2019)

Abundance



**Figura 25:** Cromatograma del aceite esencial obtenido por el Tratamiento 4 (400 W)

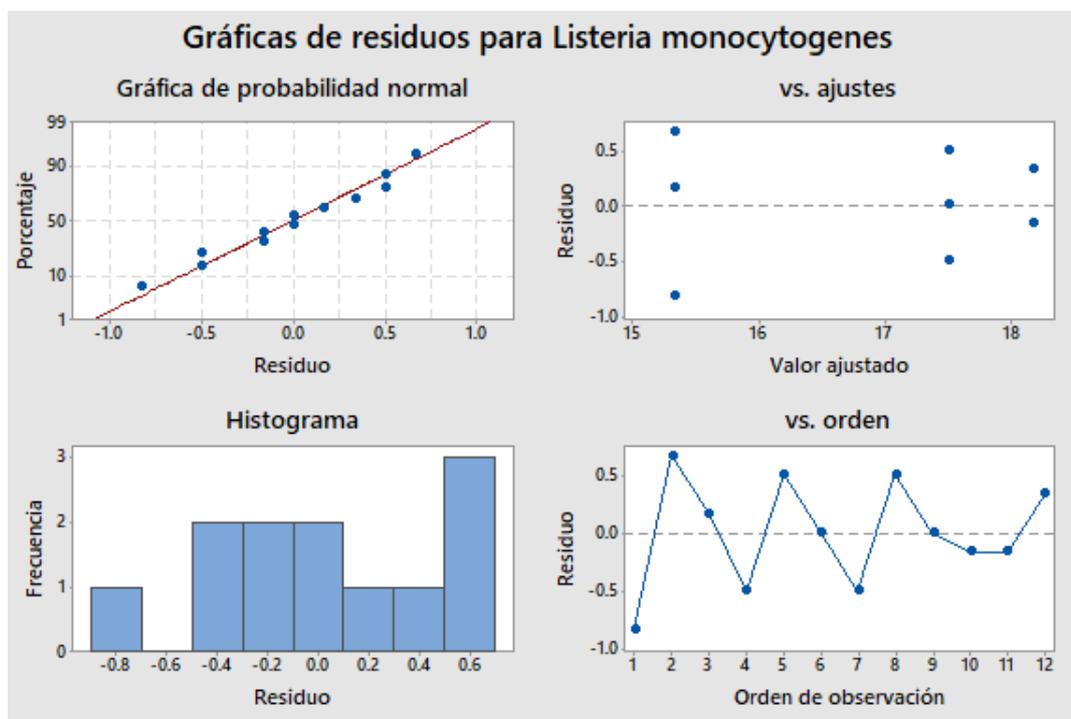
Fuente: Elaboración propia (2019)

**Tabla 15**

*Análisis de varianza (ANOVA) sobre la actividad antimicrobiana contra Listeria Monocytogenes*

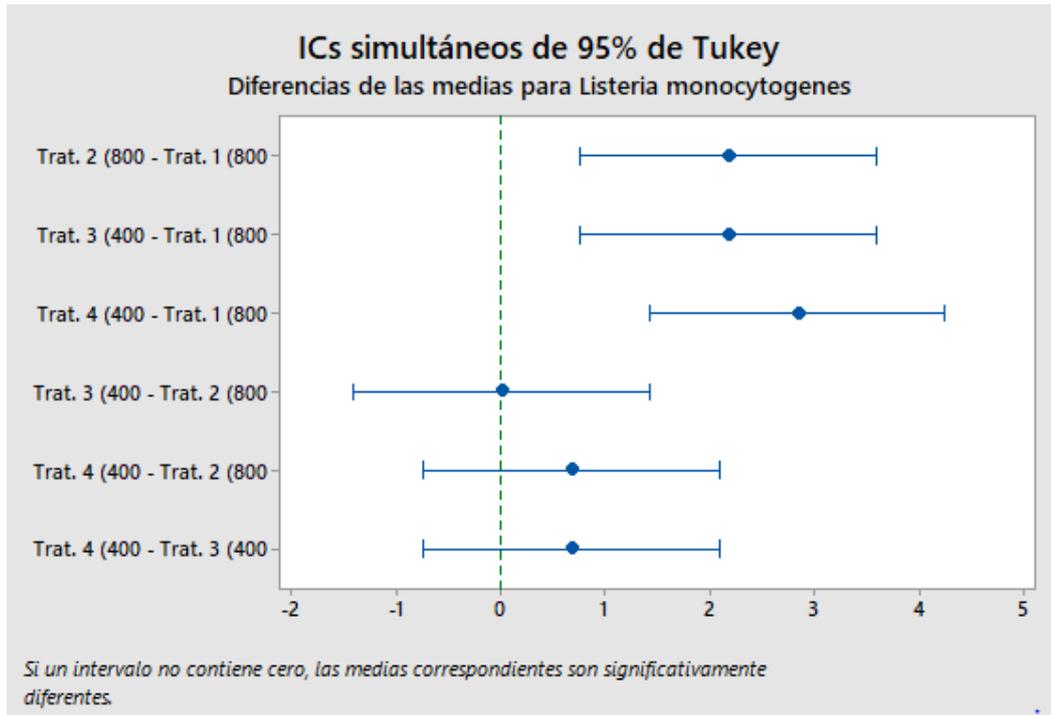
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	13.729	4.5764	15.69	0.001
Error	8	2.333	0.2917		
Total	11	16.062			

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 26:** Gráfica de residuos para la actividad antimicrobiana contra *Listeria Monocytogenes*

Fuente: Elaboración propia (2019)



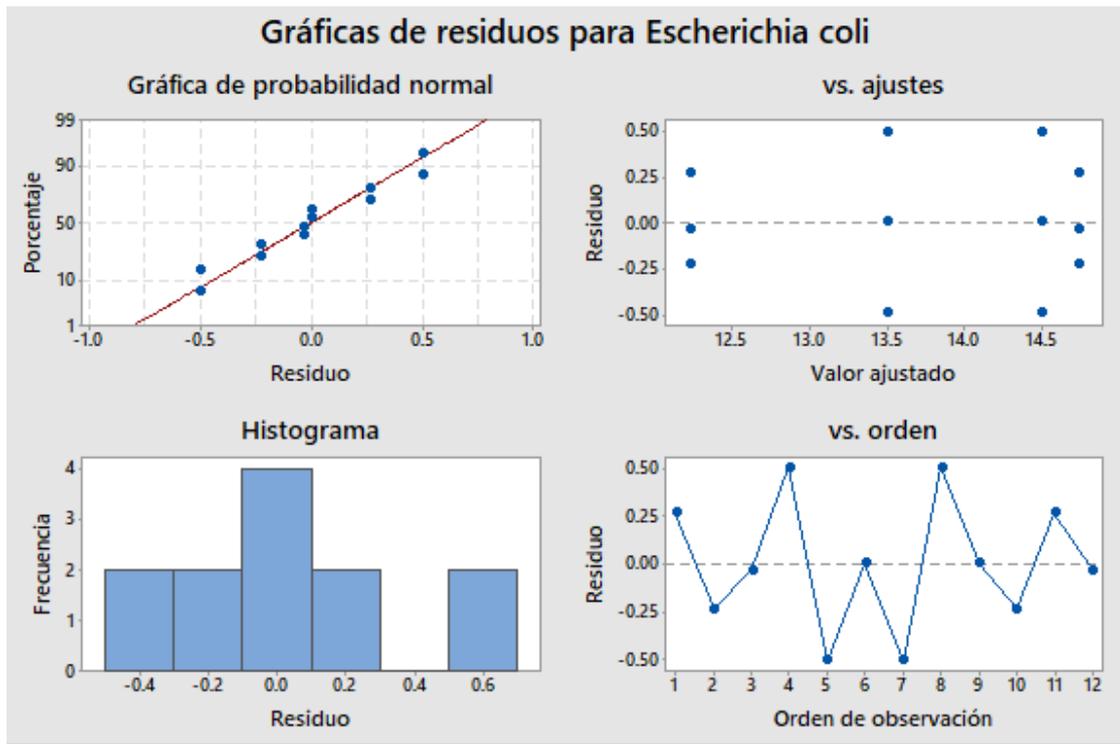
**Figura 27:** Análisis de Tukey para la actividad antimicrobiana contra *Listeria Monocytogenes*  
Fuente: Elaboración propia (2019)

**Tabla 16**

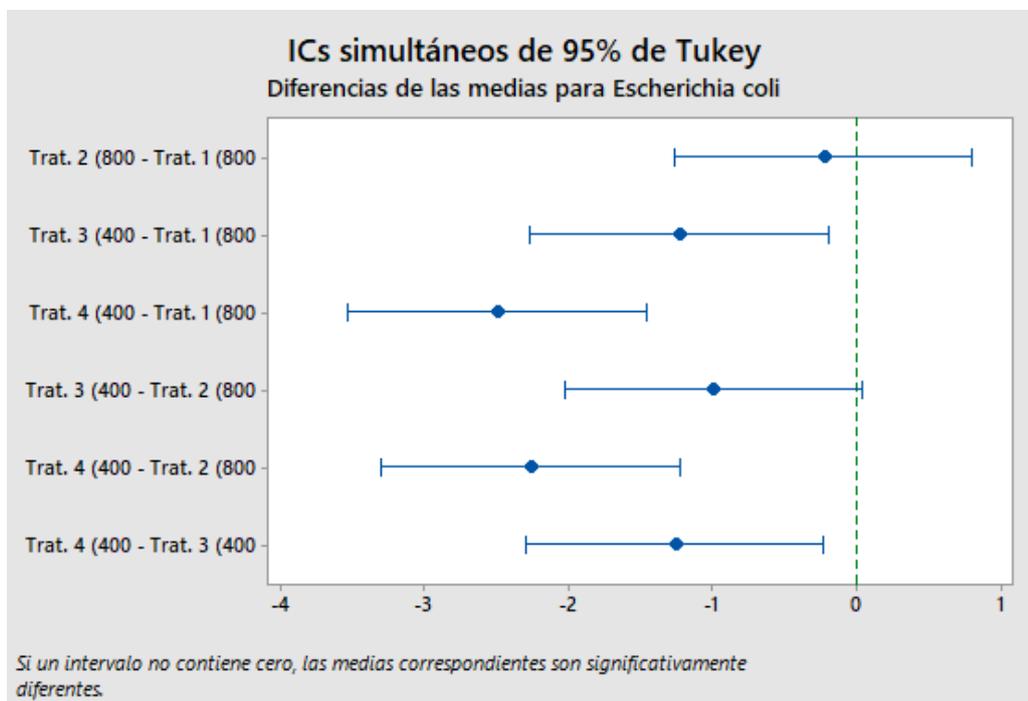
*Análisis de varianza (ANOVA) sobre la actividad antimicrobiana contra Escherichia Coli*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	11.676	3.8919	24.84	0.000
Error	8	1.253	0.1567		
Total	11	12.929			

Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 28:** Gráfica de residuos para la actividad antimicrobiana contra *Escherichia Coli*  
Fuente: Elaboración propia (2019)



**Figura 29:** Análisis de Tukey para la actividad antimicrobiana contra *Escherichia Coli*  
Fuente: Elaboración propia (2019)