



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN FACILITADA DE ACEITE ESENCIAL
DE CÁSCARAS DE CÍTRICOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA

RAFAEL DÍAZ ALONSO

TUTOR-DIRECTOR DE TESIS

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: BÁRZANA GARCÍA EDUARDO
VOCAL: Profesora: MONTIEL PACHECO CARMINA
SECRETARIO: Profesor: HERNÁNDEZ MELÉNDEZ ÓSCAR
1er. SUPLENTE: Profesor: LEÓN FÉLIX MARCO ANTONIO
2° SUPLENTE: Profesor: NAVARRO OCAÑA ARTURO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314, EDIFICIO E
LABORATORIO AGROINDUSTRIAL
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. BÁRZANA GARCÍA EDUARDO

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. HERNÁNDEZ MELÉNDEZ ÓSCAR

SUSTENTANTE:

DIAZ ALONSO RAFAEL

Índice.

1.	Introducción.....	5
1.1.	Aceites esenciales.....	5
1.1.1.	Sectores en los que se emplean los aceites esenciales.....	7
1.1.2.	Exportación e importación de los aceites esenciales.....	8
1.2.	Cítricos.....	11
1.2.1.	Composición de los cítricos.....	12
1.3.	Toronja (Citrus paradisi).....	13
1.3.1.	Producción de la toronja en México.....	15
1.3.2.	Comercialización de la toronja.....	16
1.4.	Caracterización química de aceites esenciales de la toronja.....	16
1.5.	Extracción verde de productos naturales.....	19
1.6.	Métodos de extracción verde.....	25
1.6.1.	Tecnología mecano-química.....	25
1.6.2.	Energía solar para destilación (hidro o por arrastre por vapor).....	25
1.6.3.	Cavitación acústica (ultrasonido).....	26
1.6.4.	Enzimas.....	29
1.6.5.	Otros métodos de extracción.....	34
1.7.	Legislación de aceites esenciales.....	34
2.	Justificación.....	39
3.	Objetivos.....	40
4.	Hipótesis.....	41
5.	Equipos y materiales.....	42
6.	Desarrollo experimental.....	44
6.1.	Procedimientos previos a la extracción del aceite esencial.....	44
6.1.1.	Selección y adquisición de la toronja.....	44
6.1.2.	Procesamiento para la extracción de la cáscara y conservación.....	44

6.1.3. Determinación de la humedad en la cáscara de la toronja.	46
6.2. Extracción del aceite esencial.....	46
6.2.1. Procedimiento con ultrasonido de inmersión.	46
6.2.2. Procedimiento con ultrasonido para la homogeneización de tejidos. ...	49
6.2.3. Extracción por uso de enzimas.....	50
6.3. Análisis del aceite esencial mediante cromatografía de gases.	51
7. Resultados.	53
7.1. Determinación de la humedad en la cáscara de la toronja.	53
7.2. Extracción asistida por ultrasonido de inmersión.	55
7.3. Extracción asistida por homogeneizador de tejidos.	58
7.4. Extracción vía enzimática.....	60
7.5. Cromatografía de gases.....	61
7.5.1. Cromatogramas obtenidos.....	61
8. Discusión de resultados.....	69
9. Conclusiones y recomendaciones.	74
10. Referencias.	76
Anexo A.....	80
Métodos cromatográficos.....	80
Anexo B.....	82
Cálculos realizados para la preparación de la solución amortiguadora.	82

1. Introducción.

1.1. Aceites esenciales.

Se denomina aceite esencial a la mezcla de compuestos volátiles contenidos en las plantas, obtenidos por medio de la destilación, maceración, maceración en frío con aceites fijos y extracción por medios mecánicos y se caracterizan por su olor, apariencia aceitosa y su habilidad para volatizarse a temperatura ambiente (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

Esta mezcla está compuesta de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos ($(C_5H_8)_n$) junto con otros compuestos casi siempre oxigenados que son partícipes del aroma que los caracteriza (Véliz-Jaime et al., 2019). Por lo general, son mezclas complejas constituidas por más de cien componentes y se agrupan en: A) compuestos orgánicos de bajo peso molecular entre los que se encuentran los alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos; B) Monoterpenos; C) Sesquiterpenos y D) Fenilpropanos (Martínez, 2003).

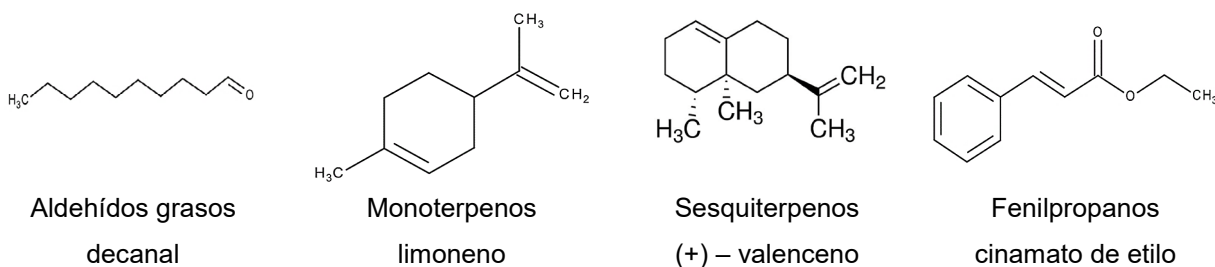


Figura 1. Estructuras representativas de aldehídos grasos, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.

Fuentes:

decanal: https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Decanal,MDA_CHEM-803211

limoneno: https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/DL-Limonene,MDA_CHEM-814546

(+) - valenceno: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/75056>

cinamato de etilo: https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Ethyl-cinnamate,MDA_CHEM-800238

Los aceites esenciales se pueden clasificar en tres tipos de acuerdo con su consistencia: esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas al encontrarse a temperatura ambiente son líquidos volátiles; los bálsamos son espesos, poco volátiles y vulnerables a sufrir reacciones de polimerización; y las oleorresinas que son, en la mayoría de las veces, líquidos de alta viscosidad o semisólidas que también conservan el aroma de las plantas (Martínez, 2003).

Por su origen, se clasifican en naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales no sufren alteraciones físicas y químicas después de haberse obtenido directamente de la planta; su rendimiento es tan bajo que se ve reflejado en un alto costo. Los artificiales se consiguen a partir de procesos de enriquecimiento de la esencia obtenida con uno o varios componentes. Los sintéticos se producen al combinar sus componentes que en la mayoría de las ocasiones son elaborados por procesos de síntesis química; este tipo de aceite esencial se caracteriza por tener el menor costo y consecuentemente es la más utilizada en la industria de los saborizantes y aromatizantes (Martínez, 2003).

En cuanto al punto de vista químico los aceites esenciales suelen clasificarse por el tipo de sustancias que contienen mayoritariamente. Los que tienen un alto contenido en monoterpenos se les conoce como aceites esenciales monoterpenoides; los que son abundantes en sesquiterpenos, se les llaman aceites esenciales sesquiterpenoides; y los ricos en fenilpropanos son a los que se les denomina aceites esenciales fenilpropanoides (Martínez, 2003).

Además de las clasificaciones antes descritas, la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos describe los siguientes:

- Desterpenado o desesquiterpenado: al que se le ha eliminado parcial o totalmente hidrocarburos mono, sesquiterpénicos y ceras.

- Refinado: al que ha sido sujeto a una destilación fraccionada para eliminar impurezas o modificar el contenido (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

En la Tabla 1 se presenta la clasificación con base al tipo de sustancia que la contiene y algunos productos vegetales donde se encuentra.

Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales por su composición química.

Contenido	Clasificación	Productos donde se encuentran
Monoterpenos	Aceites Esenciales Monoterpenoides	Hierbabuena, albahaca, salvia
Sesquiterpenos	Aceites Esenciales Sesquiterpenoides	Copaiba, pino, junípero
Fenilpropanos	Aceites Esenciales Fenilpropanoides	Clavo, canela, anís

Fuente: (Martínez, 2003).

1.1.1. Sectores en los que se emplean los aceites esenciales.

Se emplean en una amplia gama de actividades por sus propiedades antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas, pero también se aprovechan para mejorar la asimilación de los nutrientes, estimular enzimas digestivas o dar mejor sabor a ciertos alimentos. Además, inciden en la salud por sus efectos: espasmolíticos, psicotrópicos, expectorantes, antitumorales y antidiabéticos, por mencionar algunos (Pérez-Faggiani et al., 2015).

Los aceites esenciales por si solos no son un bien de consumo directo, pero son utilizados como materias primas o insumos industriales fundamentalmente, en la industria cosmética y de las fragancias, de aromas y sabores, de productos de aseo, de producción de medicamentos, antifúngicos, agrícolas, pecuarios y derivados (Stashenko, 2018).

En las granjas con animales se han empleado aceites esenciales para la engorda o el tratamiento y prevención de enfermedades de los animales. Tal es el caso de la mezcla comercial de aceites esenciales de clavo y orégano la cual estimula el apetito de las aves, o el aceite esencial del orégano y la sábila para la atención de diarreas en el cerdo. En el

caso de los rumiantes (ovejas, cabras y bovinos) también se han visto efectos positivos en su nutrición lo cual mejora la producción de leche y de carne. Los médicos veterinarios se sustentan en el hecho que los aceites esenciales estimulan la digestión, aumentan la regulación del metabolismo gastrointestinal o mejoran la capacidad de absorción de nutrientes, ya que potencian la actividad de las enzimas digestivas en la mucosa intestinal y en el páncreas. En el caso de los peces también se considera su empleo porque reducen los niveles de estrés, lesiones, mortalidad y enfermedades, con lo que mejora su productividad (Martínez-Martínez et al., 2015).

De acuerdo con experimentos in vitro, se ha comprobado que, de 15 aceites esenciales obtenidos a partir de plantas nativas, el 46% cuenta con un efecto antiesporulante sobre el *P. digitatum*, que es un hongo que genera el principal decaimiento en época de post-cosecha y causante de la putrefacción en los cítricos (Pérez-Faggiani et al., 2015) (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Beneficios y limitantes en el uso de aceites esenciales como fungicidas de postcosecha de cítricos.

-
- Pueden ser bioactivos en fase vapor y/o líquida permitiendo diferentes opciones de aplicación.
 - Los compuestos fungicidas volátiles pueden penetrar en el fruto mejorando el control de infecciones latentes.
 - Son efectivos a bajas concentraciones.
 - Presentan mayores posibilidades de inocuidad para mamíferos (su ocurrencia en la naturaleza lleva a que algunos de ellos ya sean parte de la dieta humana).
 - Baja residualidad (son de naturaleza efímera) y biodegradables.
 - Pueden alterar procesos metabólicos del fruto aumentando la vida de mostrador.
 - Pueden controlar cepas de hongos resistentes a fungicidas sintéticos.
 - Pueden actuar en sinergia con fungicidas sintéticos.
 - Pueden agregar otras propiedades benéficas para el consumidor, como propiedades antioxidantes, antitumorales, antimutagénicas, antiinflamatorias, entre otras.
 - Como aspecto negativo pueden alterar los aromas y el sabor de la fruta expuesta.
-

Fuente: (Pérez-Faggiani et al., 2015).

1.1.2. Exportación e importación de los aceites esenciales.

México es un país que importa y exporta aceites esenciales. De acuerdo con el Banco de México, en el año 2021 el monto para las importaciones de aceites esenciales fue de 3,509,921 miles de dólares (Figura 2) y de 139,186 miles de dólares para aceites

esenciales de cítricos. Desde 1993 y hasta el año 2021 ha existido un incremento paulatino en el monto de la importación de aceites esenciales y en particular de las de cítricos (Banco de México, 2022).

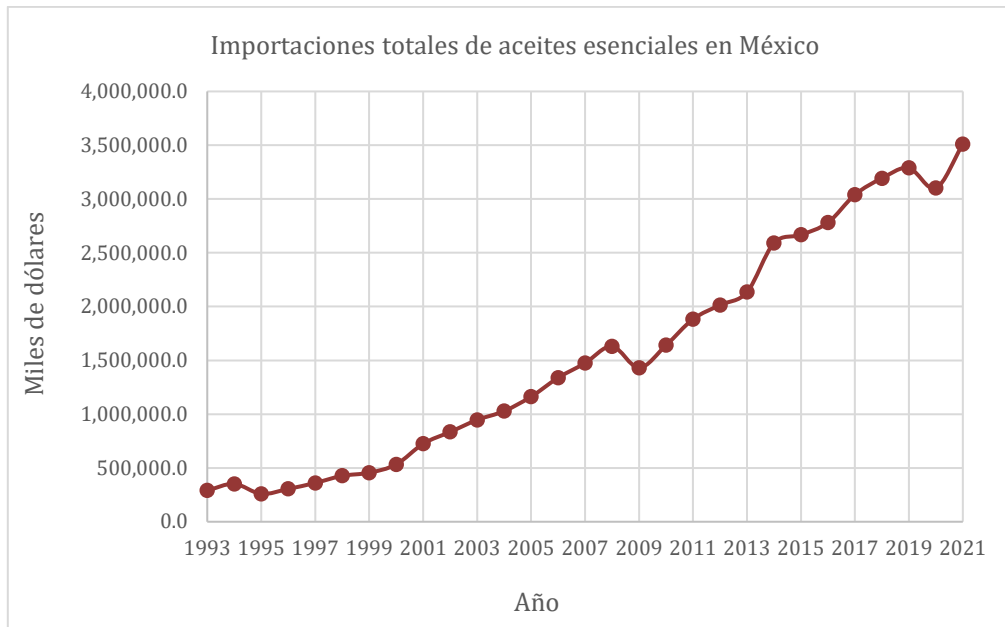


Figura 2. Monto en dólares de las importaciones de aceites esenciales a México durante el período 1993 al 2021.

Fuente:

Banco de México. (diciembre de 2022). Sistema de Información Económica. Obtenido de: <https://www.banxico.org.mx/SieInternet/consultarDirectorioInternetAction.do?accion=consultarCuadro&idCuadro=CE37§or=1&locale=es>

Para el caso de las exportaciones también se tiene un importante comercio para los aceites esenciales. En el año 2021 el Sistema de Información Económica del Banco de México reportó una exportación de 2,498,994 miles de dólares para el caso de aceites esenciales (Figura 3) y de 164,343 miles de dólares para el caso de aceites esenciales de cítricos.

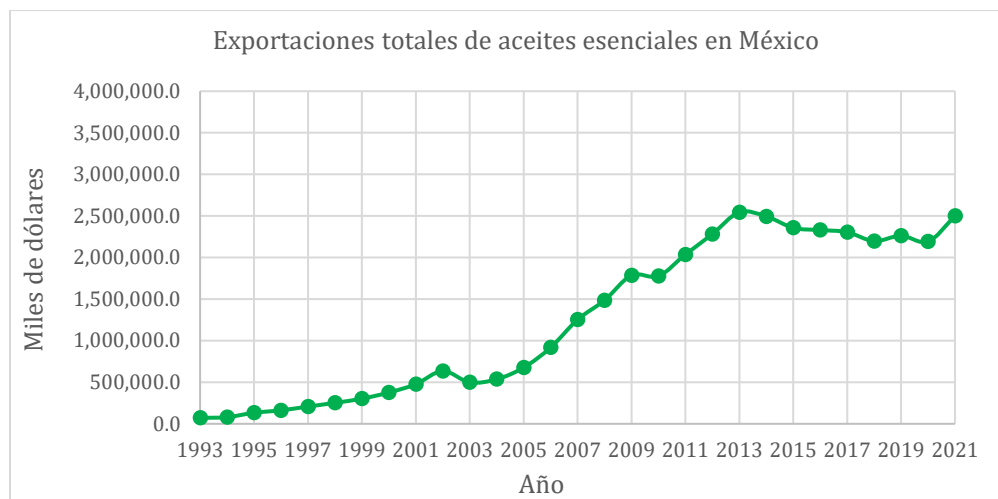


Figura 3. Monto en dólares de las exportaciones de aceites esenciales de México durante el período 1993 al 2021.

Fuente:

Banco de México. (diciembre de 2022). Sistema de Información Económica. Obtenido de: <https://www.banxico.org.mx/SielInternet/consultarDirectorioInternetAction.do?accion=consultarCuadro&idCuadro=CE37§or=1&locale=es>

La Secretaría de Economía, con el Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI), proporciona los datos del comercio de importación y exportación de aceite esencial. En la Tabla 3 se observa para México el monto en dólares de las exportaciones e importaciones de aceites esenciales de diversos frutos cítricos durante los primeros 11 meses del 2021. Podemos darnos cuenta de que México exporta una cantidad mucho mayor que la que importa de estos productos (Secretaría de Economía, 2022).

Tabla 3. Exportaciones e importaciones de México en el periodo enero a noviembre de 2021 de aceites esenciales de toronja; mandarina; lima de las variedades *Citrus limettioides* Tan y *Citrus aurantifolia-Christmann Swingle* (limón "mexicano"). Valor en dólares.

País	Exportaciones	País	Importaciones
Total	86,370,159	Total	11,461,193
Estados Unidos de América	36,536,966	Estados Unidos de América	5,839,628
República de Irlanda	11,587,590	Perú (República del)	2,071,215
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda	10,294,635	Brasil (República Federativa del)	1,976,964
Uruguay (República de)	8,506,899	Italia	901,837
Alemania (República Federal de)	7,030,463	Argentina, República	217,430
Países Bajos (Reino de Los)	5,352,615	España (Reino de)	135,129
Indonesia (República de)	2,498,458	Canadá	116,710
Japón	942,679	Alemania (República Federal de)	82,112
Italia	937,395	Uruguay (República de)	42,649
Singapur (República de)	866,921	Sudáfrica (República de)	31,725
Brasil (República Federativa del)	327,808	Países Bajos (Reino de Los)	14,164
Francia	322,900	Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda	14,033
China (República Popular de)	230,652	Israel (Estado de)	4,879
Argentina, República	216,210	Francia	4,756
Israel (Estado de)	124,740	Guatemala (República de)	3,416
Otros (12 países)	513,934	Otros (10 países)	3,318

Fuente: (Secretaría de Economía, 2022).

En virtud de que los aceites esenciales se obtienen de una amplia variedad de cítricos, a continuación, se presenta una breve descripción de estos, su composición y en particular se describirá a la toronja (*Citrus paradisi*) por ser el fruto con el que se trabajó en esta investigación. La decisión obedece a su importancia comercial ya que México es el cuarto productor a nivel mundial y a que en términos bibliográficos es poca la literatura que se tiene.

1.2. Cítricos.

Los cítricos son las frutas que pertenecen al género *Citrus*. Se clasifican botánicamente para el orden como *Geraniales*, familia de las *Rutáceas*, y con tres géneros: *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*. Son de amplio consumo, destacando los casos de la naranja (*Citrus sinensis*), el limón (*Citrus aurantifolia swingle*), la mandarina (*Citrus*

nobilis), la toronja (*Citrus paradisi*) y la lima (*Citrus aurantifolia*), a los cuales se les reconoce por sus características funcionales como antisépticos, antiparasitarios, antiinflamatorios, con efecto en el sistema nervioso central, el aparato respiratorio y vías urinarias, además de ser hoy ampliamente utilizados en la aromaterapia. En la Tabla 4 se informan las producciones que se han detectado en México para diversos cítricos. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) señala que la citricultura se ve reflejada en 23 entidades productoras, siendo la más importantes los estados de Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Tabla 4. Producción de cítricos en México en el año 2020.

Producto	Volumen (Toneladas)	Ranking mundial	Consumo Per cápita
Naranja	4,648,620	5	36.1 kg
Limón	2,851,427	2	16.1 kg
Toronja	490,834	4	3.7 kg
Mandarina	302,721	14	No Disponible
Tangerina	227,647	14	No Disponible
Tangelo	137,822	No Disponible	No Disponible
Lima	27,596	No Disponible	No Disponible

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2021.

1.2.1. Composición de los cítricos.

Los cítricos en su conjunto tienen gran similitud en su estructura anatómica o composición y existen diferentes autores que los describen. A continuación, se presenta una breve descripción obtenida de Martínez-Alcántara et. al., y complementada por la que presenta la empresa española VEVAV3X S.L. (Citrus and Life).

- **Exocarpo, Flavedo o Epicarpio:** Es la parte más externa de la corteza del fruto y la cual se diferencia en dos zonas: epidermis y la hipodermis. En la epidermis se ubican las células que cubren la parte superior de las glándulas de aceites esenciales. Esta capa suele ser de color verde, amarillo o anaranjado generalmente dependiendo del fruto que se trate.

- **Albedo o Mesocarpio:** Parte interna blanquecina de tejido laxo ubicada en la parte de la corteza de los frutos cítricos. En esta parte se encuentran enclavadas las glándulas de los aceites esenciales.
- **Piel o corteza:** Es la parte exterior, integrada por el flavedo y el albedo.
- **Endocarpio:** Parte interna del pericarpio o cáscara, la cual forma los gajos (que es la parte en la que se encuentra la pulpa con el zumo y fibra comestible).
- **Extremidad del pedúnculo:** Porción del tallo de la planta que une el fruto al brote.
- **Tabique:** Segmento de carácter membranoso que divide dos cavidades internas de un organismo y son conocidos como gajos.
- **Vesículas oleíferas u oleaginosas (fragantes):** Ojuelos de la piel de los cítricos, constituidas por paredes muy finas y frágiles, las cuales contienen los aceites esenciales (aromáticos) que permiten la recuperación de la capa de flavedo por abrasión.
- **Vesículas de zumo:** Se les denomina a los sacos que contienen el zumo del fruto (VEVAV3X S.L., 2023), (Martínez-Alcántara, et al., 2015).

1.3. Toronja (*Citrus paradisi*).

La toronja es fruto del árbol del pomelo o toronjo al que también se le conoce como cidro. Los frutos del pomelo se caracterizan por ser de color amarillo, de forma esférica o de globo y en lo general miden entre 10 y 15 cm de diámetro. En su interior se encuentra una pulpa jugosa con característica ácida, la cual se encuentra envuelta en una cáscara coriácea de color regularmente amarillo claro, aunque también puede observarse en algunas variedades con el color rosado. En nuestro país se producen tres variedades clasificadas por el color de la pulpa en:

- Pulpa blanca. La toronja de este tipo tiene una gran demanda para la extracción de jugos y la preparación de bebidas, también suele consumirse en fresco. Dentro de esta clasificación encontramos a la variedad *Marsh*.

- Pulpa rosa. Esta toronja ha disminuido su demanda sobre todo por la importante producción de la toronja de pulpa roja. Dentro de esta encontramos a la variedad *Ruby Red*.
- Pulpa roja o doble roja. Es considerada la de mayor demanda en el mercado en fresco por lo que han incrementado el área de producción en el país. Dentro de estas encontramos a la variedad *Star Ruby* y *Rio Red* (Trujillo-Juárez et al., 2017A).

La Figura 4 presenta la anatomía de la toronja.

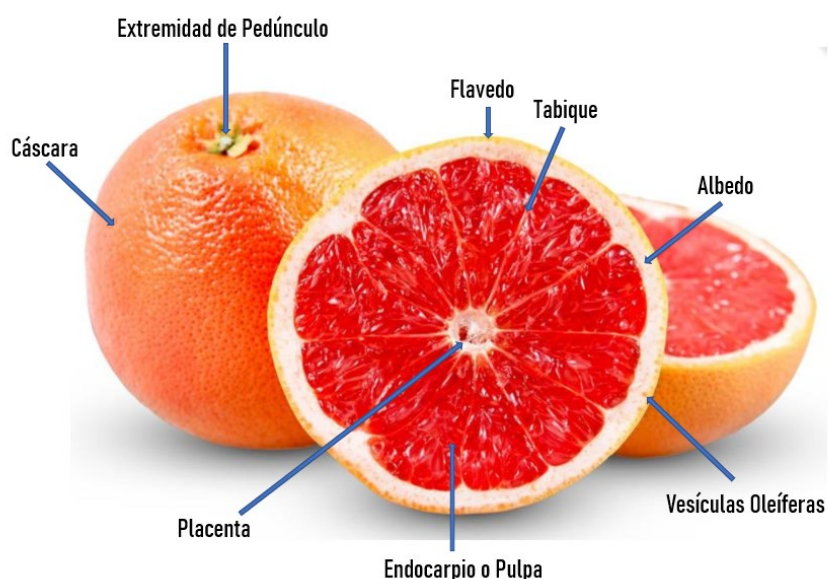


Figura 4. Sección transversal de la toronja con identificación de sus partes.

Fuente:

<https://www.diariolibre.com/estilos/blogs/diario-de-nutricion/toronja-la-fruta-prohibida-OL10280284> Imagen modificada

En la imagen obtenida en el laboratorio de Ingeniería Agroindustrial en la Facultad de Química que se presenta a continuación, se puede apreciar con claridad las vesículas oleíferas ubicadas en el flavedo y albedo de la cáscara de toronja (Figura 5).



Figura 5. Imagen de cáscara de toronja con presencia de vesículas oleíferas.

Fuente:
Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial. FQ. UNAM.

1.3.1. Producción de la toronja en México.

En el informe “Panorama Agroalimentario” publicado en el año 2021 por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, se menciona que en el año 2020 en México el cultivo de la toronja se llevó a cabo fundamentalmente en 19 estados, con un total de 490 mil 834 toneladas. En la Tabla 5, se presentan el volumen en toneladas por entidad federativa de los 10 estados con mayor producción. La importante producción de toronja en México permite que el consumo per cápita anual sea de 3.7 kg y ubica a este cítrico con una participación en la producción nacional del 2.0 % con respecto a otros (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Tabla 5. Volumen de producción por tonelada de toronja en México.

Rank	Entidad Federativa	Volumen (Toneladas)
1	Veracruz	274,303
2	Michoacán	77,436
3	Tamaulipas	59,241
4	Nuevo León	29,486
5	Campeche	16,371
6	Sonora	11,747
7	Yucatán	10,305
8	Puebla	6,793
9	Sinaloa	1,551
10	Tabasco	856
	Resto	2,746
Total		490,834

Fuente: (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

1.3.2. Comercialización de la toronja.

En lo que respecta al comercio internacional, se ha reportado un volumen de 1 millón 126 toneladas a nivel mundial de los cuales, México aporta 21 mil 490 toneladas al mercado global. Las compras más importantes a nuestro país en orden de volumen son de los siguientes países: Estados Unidos, Japón, Francia, Países Bajos, Canadá, Rusia, Alemania y España. Países Bajos es el país que mayor cantidad de toronja compra en el mundo (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Para el caso de la toronja la cantidad de cáscara por litro de jugo es de aproximadamente 0.6 kg, lo que da una idea de la magnitud del residuo generado. Su aprovechamiento incluye la alimentación de ganado o su composteo para generar un acondicionador de suelos, sin embargo, en términos numéricos los montos son marginales. Debido a que este material se produce en épocas de cosecha y con picos altos de producción, el material generado es simplemente desechado al medio ambiente en basureros a cielo abierto y sin control, lo que genera graves daños ambientales como la acidificación del suelo, la lixiviación de líquidos con una alta DBO al subsuelo y mantos freáticos, o la atracción de fauna nociva como roedores y cucarachas (Trujillo-Juárez et al., 2017B).

1.4. Caracterización química de aceites esenciales de la toronja.

El reporte presentado por Rojas, Perea y Stashenko basado en cromatografía de gases acoplada a espectrometrías de masas y usando columnas capilares de fases estacionarias apolares y polares, incluye la caracterización química de los aceites esenciales (AE) de cítricos. Para la Tabla 6 se extrajo la parte correspondiente a los aceites esenciales de toronja (Rojas et al., 2009).

Tabla 6. Principales compuestos de los aceites esenciales extraídos de las cáscaras de Toronja *Ica Hatico* y Pomelo *Star Ruby*.

Compuestos, Cantidad relativa (%)	
Toronja <i>Ica Hatico</i>	Pomelo <i>Star Ruby</i>
limoneno 72 ± 1.75	limoneno 76.6 ± 0.18
β -mirceno 5.55 ± 0.05	β -mirceno 6.15 ± 0.07
n-octanal 4.3 ± 0.41	trans-4,5-muroladieno 4.6 ± 0.37
linalool 2.11 ± 0.01	β -pineno 2.66 ± 0.04
trans- β -cariofileno 1.8 ± 0.15	trans- β -ocimeno 2.5 ± 0.15

Fuente: (Rojas et al., 2009).

Algunos componentes activos que se encuentran en los aceites esenciales de la toronja son el D-limoneno, mirceno, α -pineno, β -pineno y el β -terpinoleno, mismos que tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y cuya estructura química, se presenta a continuación (Jirovetz et al., 2005).

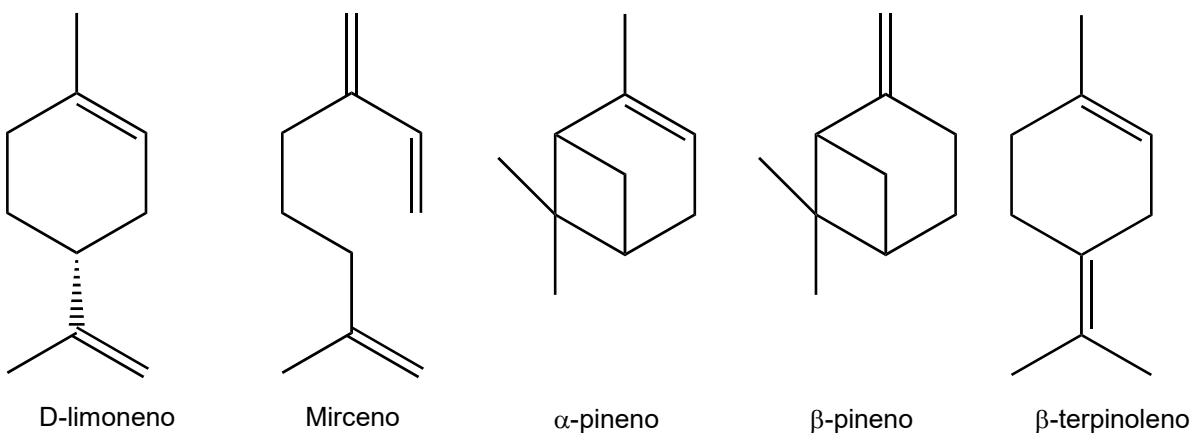


Figura 6. Principales terpenoides del aceite esencial de toronja.

Fuente: (Mathers et al., 2006), (Trujillo-Juárez et al., 2017A).

La obtención de aceites esenciales tiene su origen hace más de 4,000 años en la civilización faraónica donde se realizaba la extracción sólido-líquido. Por su parte los griegos, romanos e islámicos innovaron al incorporar en sus procesos la base de la destilación. Existen diversos métodos físicos de extracción de aceites esenciales entre

los que se encuentran la destilación por alambique (vapor, vapor/agua y agua), expresión (también conocida como prensado en frío de aceites de cáscara obtenida de cítricos) (Chemat et al., 2020).

En la Tabla 7, se presentan las ventajas de la utilización de algunos métodos de extracción de aceites esenciales que han sido empleados por muchos años y en la Tabla 8 se presentan las desventajas de estos mismos.

Tabla 7. Ventajas de los métodos de extracción de los aceites esenciales

Método de extracción	Ventajas
Enfleurage	<ul style="list-style-type: none"> • Gran calidad del aceite esencial obtenido.
Extracción con solventes	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de temperaturas bajas. • Posibilidad de separación de componentes individuales.
Extracción por prensado	<ul style="list-style-type: none"> • Es una tecnología bien conocida hace años, pero todavía tiene sus detalles y secretos.
Hidrodestilación	<ul style="list-style-type: none"> • No se requiere de una caldera generadora de vapor. • Son muy utilizados en el campo. • Son fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro. • Son baratos. • Seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo.
Extracción por arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none"> • La extracción por arrastre de vapor es un proceso de extracción muy limpio que asegura un producto de buena calidad. • Se requiere de instalaciones básicas de herrería para la construcción y mantenimiento del equipo. • Método industrial y de laboratorio. • Buenos rendimientos en aceite extraído. • Obtención del aceite puro, libre de solvente. • Bajo costo. • Tecnología no sofisticada. • Aplicación de principios de Ingeniería Química.

Fuente: (Véliz-Jaime et al., 2019).

Tabla 8. Desventajas de los métodos de extracción de los aceites esenciales

Métodos de extracción	Desventajas
Enfleurage	<ul style="list-style-type: none">• Es un método antiguo que ya no se emplea.• Es un método muy laborioso.• Requiere mucha mano de obra.• Está ampliamente superado técnicamente por otros métodos alternativos.
Extracción con solventes	<ul style="list-style-type: none">• Costoso.• Contaminante del ambiente.• Riesgo de incendio y explosión.• Difícil de separar completamente el solvente sin alterar la composición del aceite.• Co-extracción de ácidos grasos, ceras y pigmentos.
Extracción por prensado	<ul style="list-style-type: none">• Cuando el aceite sale de la prensada todavía tiene muchas impurezas que deben ser eliminadas.• La mezcla detritos-agua-aceite se centrifuga a 5000 rpm durante 40 min y el aceite esencial recuperado se coloca en una nevera al 3 °C durante 4 h, para solidificar gomas y ceras que se localizan en la superficie.• El aceite esencial se debe guardar en recipientes oscuros a 12 °C.• Ácidos grasos, pigmentos y ceras también pueden ser extraídos junto con el aceite esencial.• Alta inversión inicial.
Hidrodestilación	<ul style="list-style-type: none">• Los aceites producidos son más coloreados.• Tienden a presentar un cierto olor a quemado.• Siempre van a requerir una etapa posterior de refinación.
Extracción por arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none">• Su principal inconveniente es la alta temperatura de operación, que lo hace inapropiado para aquellos aceites esenciales con componentes sensibles al calor.

Fuente: (Véliz-Jaime et al., 2019).

Algunos métodos utilizados para la extracción de aceites esenciales generan daños al medio ambiente, por lo cual hoy en día se ha dado un impulso a la extracción verde de productos naturales.

1.5. Extracción verde de productos naturales.

Los extractos naturales obtenidos de un importante número de plantas permiten contar con proteínas, grasas, fibra dietética, azúcares, antioxidantes, colorantes y en particular aceites esenciales. Estos productos pueden ser empleados en la industria de

los alimentos o la farmacéutica, ya sea para la preservación, incorporar sabor o aromatizar, entre otros. Regularmente, los extractos se obtienen mediante una extracción sólido-líquido, considerando ésta como una operación unitaria. Este proceso incluye varias etapas preparativas como pretratamiento de material de planta (secado, molienda, etc.), así como tratamientos posteriores de concentración y purificación (Chemat F. et al., 2019).

Por otra parte, existe un concepto que en los últimos años ha adquirido una connotación importante y es el que se refiere a la “Extracción Verde”, misma que se basa en el descubrimiento y diseño de procesos de extracción que reducirá el consumo de energía, permitirá el uso de disolventes alternativos y productos naturales renovables, y garantizará un extracto de alta calidad. Estas técnicas permiten reducir el tiempo de los procesos, disminuye el consumo de disolventes, se obtiene mayor pureza de productos, elimina los post-tratamientos de agua residual y utiliza menos energía (Chemat F. et al., 2019).

A continuación, se presenta una breve descripción de los seis principios que nos presentan Farid Chemat y colaboradores: en el artículo “*Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges*” y que son ejes fundamentales de dicho artículo (Chemat F. et al., 2019).

Principio 1: Innovación de variedades de selección y uso de fuentes de planta renovables. Ante el incremento en la demanda de extractos y productos naturales es necesario que se consideren factores relacionados con el respeto a la salud humana y el medio ambiente, lo cual implica el evitar entre otras cosas la extinción de plantas, debida a una sobre explotación o la cosecha desmedida de una especie en perjuicio de las otras. Se requiere la preservación de la biodiversidad sobre todo pensando en las futuras generaciones, y conservar los recursos renovables, empleando procesos biotecnológicos para evitar sobre todo la extinción de especies endémicas.

Principio 2: Usos de solventes alternativos principalmente agua o agro-solventes.

Es conveniente reemplazar los solventes inorgánicos y orgánicos en la extracción y separación de procesos por los efectos tóxicos que éstos tienen en los humanos y el medio ambiente y reemplazarlos por alternativas verdes. Gran parte de los solventes orgánicos se caracterizan por ser tóxicos, volátiles, contribuyen a riesgos de fuego y explosiones. Y en el medio ambiente estos solventes volátiles al ser esparcidos en la atmósfera contribuyen al calentamiento global, además de ser potenciales precursores de ozono en la atmósfera baja. La selección de un solvente es fundamental en la gestión de la extracción verde, sobre todo en la durabilidad de los procesos. Algunas de las alternativas que se mencionan en el artículo son:

- **Extracción libre de solvente:** Reduce costos y los riesgos de tener grandes volúmenes de solventes, aumenta la pureza del extracto, mejora la seguridad al reducir riesgos de sobrepresión y explosión. Este método reduce la extracción de horas a minutos y la cantidad de agua desperdiciada y solo consume una fracción de energía. Diferentes técnicas, como el empleo de microondas por hidrodifusión y gravedad (MHG), controlan el cambio de presión y el campo eléctrico. Estos se han usado exitosamente en la extracción de productos naturales como aceites esenciales, aromas, aceites comestibles, antioxidantes y otros compuestos orgánicos.
- **Agua, vapor y agua sub-crítica:** Son considerados como los solventes menos tóxicos y corrosivos, además de no flamables, abundantes en la naturaleza y de bajo costo. Aunque presentan algunos inconvenientes como la alta polaridad para solubilizar compuestos lipofílicos y el consumo alto de energía requerido para concentrar el producto. El agua en estado supercrítico maneja condiciones drásticas como una temperatura arriba de los 647 K (374 °C) y una presión superior a los 2.21×10^7 Pa (221 bar) lo que lo vuelve económicamente inviable. En el intervalo de temperatura de 373.15 K (100 °C) y la temperatura crítica 647 K (374 °C), el agua se le conoce como sub-crítica. Esta presenta varias ventajas como la eficiencia de extracción y selectividad, así como la disminución en la viscosidad y

tensión superficial, complementado con un aumento en la penetrabilidad y la difusividad al incrementar la temperatura.

- **CO₂ supercrítico:** Es considerado un fluido ideal gracias a su baja constante crítica [$T_c = 304.1 \text{ K}$ (31.1 °C), $P_c = 7.38 \text{ MPa}$] y su naturaleza inerte. Éste es no-tóxico, no-explosivo, barato, fácil de obtener, sencillo de remover del producto final y tiene una buena capacidad de extracción debido a su mayor poder de penetración. El CO₂ supercrítico es un solvente apolar y por lo tanto puede ser utilizado para la extracción de compuestos débilmente polares, con bajo peso molecular como los carotenoides, triglicéridos, ácidos grasos, entre otros. Sin embargo, su baja polaridad complica la extracción de productos farmacéuticos y nutricionales demasiado hidrofílicos. La extracción supercrítica de CO₂ (SCE) tiene diversos usos a escala industrial; por ejemplo, se emplea para descafeinar café o té, entre otros.
- **Glicerol:** Es considerado un solvente verde por sus propiedades de alta polaridad, su habilidad de formar fuertes puentes de hidrógeno, de disolver gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos y por tener excelentes propiedades físicas, como presión de vapor despreciable y condiciones estables de almacenamiento. Además, es biodegradable, no flamable y no tóxico. Sin embargo, tiene como desventaja su alta viscosidad, la cual se puede reducir elevando su temperatura a más de 333 K (60 °C) o agregando otros cosolventes.
- **Limoneno:** Es un monoterpeno cíclico que resulta ser el compuesto más abundante que se obtiene de los aceites esenciales de cítricos (CEO). Existen dos isómeros ópticos del CEO, el dextrógiro (D) y el levógiro (L). El D-limoneno conforma el 90% total del CEO. Se considera que éste puede ser un sustituto para la extracción natural de compuestos reemplazando los solventes a base de petróleo como lo es el n-hexano y el tolueno.

Principio 3: Reducción de consumo de energía por recuperación de ésta y usando tecnología innovadora. El consumo de energía representa una gran preocupación para la sociedad y la industria, ya que de no hacerlo puede ocasionar problemas ambientales e incrementar los costos de producción. Entre las industrias que requieren una alta cantidad de energía, se encuentran las del sector dedicado a la fabricación de productos químicos, plásticos y la de procesamiento de alimentos.

Existen alternativas que permiten reducir el consumo de energía y que son las siguientes: 1) Optimizar los procesos actuales, 2) recuperación de la energía liberada durante los procesos, 3) utilizar tecnologías innovadoras. Dentro de las alternativas, la extracción líquida presurizada (PLE) hoy se considera como un enfoque eficiente y sostenible, ya que reduce el tiempo de extracción y el consumo de disolventes; y como resultado se logra una reducción del consumo de energía y costos.

Principio 4: Producción de co-productos en lugar de residuos hacia conceptos de bio-refinería. La economía circular avanza hacia procesos sostenibles en lugar de producción lineal, lo que lleva a utilizar recursos de recuperación y renovación, otorgando mayor valor añadido a los procesos. Entre las directrices de las buenas prácticas en la gestión de los residuos de extracción se pueden plantear dos objetivos fundamentales:

- El desarrollo de vías de valorización para un mejor aprovechamiento de materias primas y explotación completa de subproductos.
- La reducción de efluentes y residuos en términos de cantidad y sus efectos nocivos.

Principio 5: Reducción del número de operaciones unitarias y desarrollo de procesos seguros, robustos y controlados. Se deben desarrollar procesos eficientes en términos de extracción, rendimiento, limpieza del medio ambiente, seguridad de los operadores y uso de espacio, lo que se denomina intensificación de procesos. La intensificación permite aumentar el rendimiento de extracción, la pureza y la calidad del producto extraído, a la vez que disminuye el tiempo de extracción el número de operaciones

unitarias, la energía consumida, el impacto ambiental, los costos, así como disolventes y residuos totales. Generalmente el proceso de extracción tiene los siguientes pasos:

- Pre-tratamiento de materiales vegetales: la materia prima debe secarse previamente y molerse para aumentar la superficie de contacto y nivel de penetración del disolvente.
- Extracción sólido-líquido con disolvente apropiado.
- Separación sólido-líquido por filtración o centrifugación.
- Eliminación de disolventes y reciclaje al vacío.

Principio 6: Dirigido a un extracto verde con valores verdes y extracto no-desnaturalizado y biodegradable sin contaminantes. Una sustancia natural la podemos considerar como aquella que no ha sufrido transformación o ha sido transformada sólo por procesos manuales, mecánicos o gravitacionales, por disolución en agua, por flotación, por extracción con agua y por destilación con vapor de agua; lo que quiere decir que la sustancia no puede ser modificada químicamente, es decir que su estructura molecular debe permanecer sin cambios. Lo anterior puede ser controvertido, ya que en algunos casos la extracción con disolvente es considerada como un proceso físico y el extracto generado es considerado como “natural”, siempre que el disolvente se elimine al final del proceso.

Direcciones a futuro y desafíos de la extracción verde. La extracción verde de productos naturales se basa en el diseño de los procesos de extracción donde se reducen o eliminan el consumo de energía y los solventes derivados del petróleo, lo que nos lleva a que algunos de los desafíos para el siglo XXI sean proteger el medio ambiente y a los consumidores, lo que resulta como tema prioritario para los gobiernos y la industria a nivel mundial. Es importante aprovechar todos los materiales residuales para lograr rendimientos económicos y propiciar la realización de procesos tecnológicos eficaces y rentables. El extracto verde debe ser resultado de una cadena de valores en dos sentidos: económico y de responsabilidad, iniciando a partir de la producción y cosecha de las

plantas, seguida de la extracción de procesos de transformación y separación con la formulación de mercadeo (Chemat F. et al., 2019).

1.6. Métodos de extracción verde.

Existen diferentes técnicas englobadas dentro de la “Extracción Verde”, las cuales son descritas en el artículo publicado en la revista Green Chemistry por Chemat, F., Vian, M., & Fabiano-Tixier, en el año 2020 titulado: “A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products” (Chemat F. et al., 2020) y que por ser utilizadas en el trabajo de investigación, se describen brevemente:

1.6.1. Tecnología mecano-química.

El principio básico de la mecano-química es la disrupción celular y la extracción de compuestos de interés. El grado de molido influye en la magnitud de la liberación de moléculas internas. En esencia esta técnica consiste en obtener partículas de tamaño reducido, destruyendo la pared, descomponiendo la celulosa y acelerando la disolución cinética que pueda aumentar la eficiencia de la extracción (Chemat F. et al., 2020).

1.6.2. Energía solar para destilación (hidro o por arrastre por vapor).

La tecnología basada en la energía solar es una de las más sostenibles, en particular, para la generación de calor y electricidad. Para la calefacción a partir de energía solar se debe tomar en cuenta: 1) Las propiedades físicas de la radiación. 2) La relación geométrica entre el Sol y la Tierra. 3) La incidencia de radiación, y 4) Las características de las superficies irradiadas. Esta tecnología es de bajo costo para obtener aceites esenciales con un enfoque innovador y ecológico (Chemat F. et al., 2020).

Los componentes principales son un colector solar, un medio para transferencia de calor, un almacenamiento y una caldera. Esta técnica es empleada para procesos de pasteurización, concentración y secado (Chemat F. et al., 2020).

Las técnicas de hidrodestilación o arrastre de vapor ocupan varios minutos o hasta horas de calentamiento, ocasionando la degradación de varios compuestos termolábiles, incluyendo los de interés, mismos que se encuentran presentes en el material vegetal. (Périno-Issartier et al., 2013). En algunos experimentos, para la obtención de aceite esencial a partir de naranja, la obtención rondaba en 1 g por cada 100 g de cáscara de naranja, pero este método se puede combinar con otros métodos de extracción, obteniendo mayores rendimientos y disminuyendo el tiempo (Chemat F. et al., 2020).

1.6.3. Cavitación acústica (ultrasonido).

El método de extracción de aceites esenciales por ultrasonido está catalogado como un procedimiento verde, que favorece la separación del aceite de la materia prima y del medio en que se encuentra, lo cual se logra dentro de ciertos límites; en él se destaca mayor rendimiento en la obtención del aceite y la reducción en riesgos físicos, químicos o ambientales. Otro factor destacable es que requiere menor temperatura, con una reducción en los gradientes de esta variable. También se tiene un mejor mezclado, una mayor rapidez en la transferencia de energía y masa, una disminución en las dimensiones, una alta selectividad, menor consumo de energía y la utilización de menos equipos (Xu, et al., 2015).

El determinar el tiempo óptimo de sometimiento a los efectos del ultrasonido, para obtener la mayor cantidad de producto dentro de ciertas especificaciones de calidad y costo, es una de las principales limitantes que se deben de tomar en cuenta para decidir las condiciones del proceso, porque se ha podido observar que en la medida que aumenta el tiempo de sometimiento a este tratamiento, el rendimiento aumenta hasta llegar a un máximo que después declina hasta hacer contraproducente continuar aplicándolo (Xu, et al., 2015).

Existen varios factores por los cuales la extracción del aceite esencial puede verse afectada durante la sonicación, destacando: el tiempo de extracción, la potencia ejercida

del equipo hacia la muestra experimental, la relación del medio líquido con la materia prima y el número de extracciones aplicadas (Chen, et al., 2012).

El tiempo de extracción necesario para obtener la mayor cantidad de producto, así como su rendimiento, es determinante para conocer en qué momento debe de concluir el proceso para que el aceite esencial no empiece a degradarse por el fenómeno de la cavitación. Aunque dicho fenómeno mejora la transferencia de masa y el acceso de la fase líquida a la fibra de la materia celular, este fenómeno genera que las burbujas se expandan y colapsen cerca de la pared celular. También, la vibración turbulenta entre la fase líquida y la fase sólida permiten una disrupción celular. La extracción de materia se incrementa con el ultrasonido en tiempos de extracción cortos, pero si se extiende el tiempo más allá de lo necesario, existirá una pérdida de producto y rendimiento. La potencia del ultrasonido influye, pues en zonas donde es mayor la potencia se crea mayor vibración, lo que aumenta el número de burbujas obtenidas a través de la cavitación y acrecienta su transferencia de masa, mejorando su capacidad de extracción. Es de gran relevancia no elevar de manera desmedida la potencia del equipo, porque puede haber pérdidas de producto (Chen, et al., 2012).

Una mayor proporción del medio líquido con respecto de la materia prima indica un aumento en la diferencia de concentración entre las células vegetales y el medio líquido ubicado en el exterior, provocando que la difusión sea más rápida y eficaz. Sin embargo, si la proporción es incrementada notablemente se volatilizará el medio líquido, generando mayores costos de energía y pérdidas de producto. En consecuencia, para una extracción eficiente, el líquido debe difundirse al interior de la materia prima, acarreado el producto sin dañar la matriz. El número de extracciones permite conocer en qué tiempo se extrae la mayor cantidad de producto (aceite esencial) sin que haya un gran consumo de energía, pérdidas del medio en que se encuentra la materia (fase líquida), tiempo consumido y generación de costos (Chen, et al., 2012).

La extracción asistida con ultrasonido está basada en tres diferentes métodos: una aplicación directa hacia la materia; otra con acoplamiento al equipo y la tercera, el

sumergido con un baño ultrasónico (Chemat, et al., 2011). Existen diversas aplicaciones con las que cuenta un equipo de ultrasonido. Chemat & cols., describen algunas de ellas. A continuación, se presenta un breve resumen de las aplicaciones involucradas en este trabajo:

- **Filtración:** Se combina el método de la filtración con el del ultrasonido con el objeto de mejorar el flujo a través de los sólidos presentes y, por lo tanto, no bloquear el filtro integrado al equipo de ultrasonido.
- **Desgasificación:** Un líquido en condiciones de mezclado contiene gases, por ejemplo, el oxígeno disuelto en el agua. Existen dos métodos que sirven para desgasificar los cuales son a) ebullición del líquido mientras este se encuentra a baja presión, y b) aplicar ultrasonido que tiene la ventaja de realizar el proceso cuando se presentan pequeños cambios de temperatura. El fenómeno de la desgasificación se llega a producir cuando la rapidez de la vibración provoca que las burbujas de los gases se junten por las ondas acústicas y aumente de tamaño hasta que logren llegar a la superficie por diferencia de densidades. El ultrasonido junto con la desgasificación es rápido en sistemas acuosos, pero en líquidos viscosos es más complicado.
- **Despolimerización:** Este proceso involucra la degradación química del polímero por los efectos de las moléculas de los radicales de hidróxido con alta energía, a partir del fenómeno de la cavitación.
- **Descongelación:** Cuando ocurre el descongelamiento intrínsecamente se realiza de manera lenta y pueden ocurrir consecuencias serias durante su procesamiento. Actualmente, el trabajo del mecanismo de relajación demostró que puede absorberse más energía en alimentos fríos y que la descongelación a una frecuencia de relajación fue más rápida que cuando se utiliza solamente calor (Chemat, et al., 2011).

1.6.4. Enzimas.

Otro método empleado para la obtención de aceites esenciales es el que se lleva a cabo a partir de enzimas, el cual también es considerado un método de extracción verde.

Las enzimas son proteínas que tienen diversas funciones “in vivo”, pero sin perder de vista que son catalizadores biológicos que disminuyen la energía de activación de la reacción, resultando en que ésta sea más rápida. Las enzimas tienen un amplio número de aplicaciones en distintas áreas, como la síntesis de fármacos, producción de alimentos y bebidas, por mencionar algunos. La Biotecnología ha desarrollado productos de gran utilidad a partir de enzimas. Un ejemplo son las pruebas rápidas de azúcar en sangre o de embarazo, en donde la enzima llamada peroxidasa acoplada a la enzima glucosa oxidasa o a un anticuerpo producen un cambio colorido al estar presente el analito que es visible al ojo humano (Ramírez-Ramírez & Ayala-Aceves, 2014).

1.6.4.1. Tipos de enzimas.

Las enzimas se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- 1. Oxidoreductasas:** Catalizadores sujetos a las reacciones de óxido-reducción. Dentro de estos tipos de enzimas se localizan a las peroxidasas, oxigenasas, oxidasas y deshidrogenasas. Por lo general, intervienen en los procesos de oxidación de alimentos y degradación de vitaminas.
- 2. Transferasas:** Participan en la catálisis de las reacciones de transferencia de grupos funcionales entre las moléculas el amino, el glicosil, el carboxil, entre otros. Como objetivos tienen la fabricación de alimentos para beneficio a la salud y la producción de prebióticos.
- 3. Hidrolasas:** Actúan en las reacciones por hidrólisis. Estas enzimas rompen los enlaces covalentes por la inserción de una molécula de agua. Son ejemplos las lipasas, amilasas, proteasas, glicosidasas, nucleasas y las esterases.

4. **Liasas:** Rompen los enlaces de las moléculas sin la adición de agua y construyen dobles enlaces por adición o eliminación de grupos químicos. En esta clasificación se ubican las aldosas, deshidratasas, pectín liasas, descorboxilasas, entre otras.
5. **Isomerasas:** Este tipo de enzima cataliza las reacciones de isomerización: Entre ellas se hallan las racemasas, mutasas y epimerasas, que se utilizan en la elaboración de jarabes.
6. **Ligasas:** Intervienen al catalizar la unión de dos moléculas empleando la energía conseguida a través de la degradación del adenosín trifosfato (ATP). Dos ejemplos son las peptosintetasas y las carboxilasas (García-Ulloa & Cely, 2020).

Para llevar a cabo la extracción de aceites esenciales vía enzimática se emplean las siguientes enzimas, que en su mayoría pertenecen al grupo 3 de las hidrolasas.

1.6.4.2. Pectinasas.

Las pectinasas son enzimas producidas por microorganismos como son el caso de las bacterias (*Bacillus licheniformis* y *Lactobacillus*), hongos (*Aspergillus niger*), levaduras (*Saccharomyces*) y protozoos, entre otros. Estas enzimas son un grupo heterogéneo capaz de hidrolizar las sustancias pécticas (pectina) de naturaleza polimérica, las cuales se encuentran en los vegetales. Como funciones se encuentran el crecimiento de la célula y la maduración del fruto. Son empleadas a gran escala en la industria de alimentos para la elaboración de jugos, pulpas, ates, mermeladas, vino y cerveza (García-Ulloa & Cely, 2020).

1.6.4.3. Clasificación de las pectinasas por su mecanismo de acción.

- **Poligalacturonasas (PG) y Polimetilgalacturonasas (PMG).** Enzimas del tipo hidrolasas encargadas de la despolimerización, porque reconocen el ácido galacturónico presente en la pectina, para descomponer los enlaces α -1,4.
- **Pectinesterasas (PE).** Son las responsables de la desesterificación, ya que remueven de la pectina los grupos metoxilo para formar ácido poligalacturónico.

- **Poligalacturonato liasa (PGL) y Polimetilgalacturonato liasa (PMGL).** Son catalizadores que participan en la reacción de trans-eliminación para producir galacturonatos de metilo y galacturonatos insaturados, debido al rompimiento de un enlace α -1,4-glucósido entre el ácido péptico y la pectina.

Las pectinasas también pueden clasificarse en ácidas o alcalofílicas; las ácidas sirven para extraer y clarificar jugos procedentes de frutas, y las alcalofílicas para el tratamiento de agua y desgomado de fibras. (García-Ulloa & Cely, 2020).

En la Figura 7 se presentan el esquema del modo de acción de tres tipos de pectinasas.

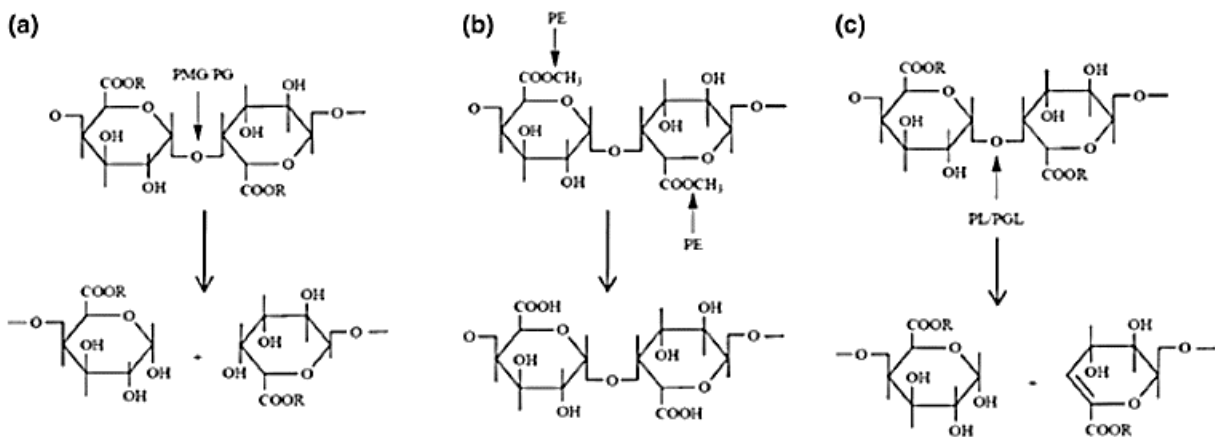


Figura 7. Modo de acción de las pectinasas. a) $R = H$ para PG (poligalacturonasas) y CH_3 para PMG (polimetilgalacturonasas), b) PE (pectina esterasa), c) $R = H$ para PGL (poligalacturonato liasa) y $-CH_3$ para PL (pectina liasa).

Fuente: (García-Ulloa & Cely, 2020).

En la Figura 8 podemos observar la estructura básica de la pectina.

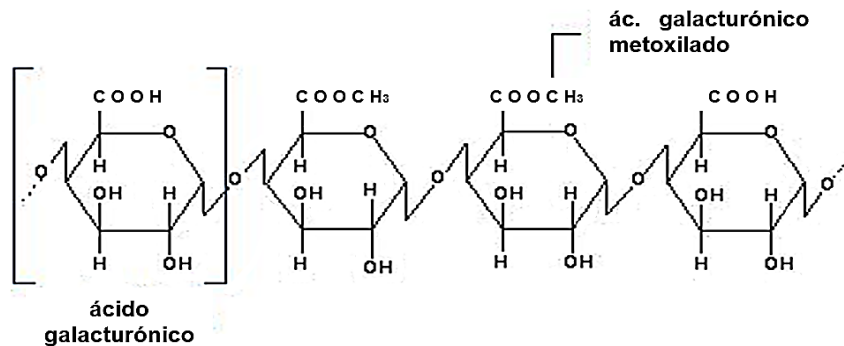


Figura 8. Estructura de la pectina.

Fuente:

<https://www.ecured.cu/Pectina>

1.6.4.4. Condiciones de estabilidad y actividad de la pectinasa.

El medio en donde se sintetiza por vía microbiana la pectinasa es de gran importancia, ya que diversos factores fisicoquímicos pueden perjudicar su estabilidad y producción. Estos factores son la agitación, el pH, la temperatura y la concentración del sustrato. La temperatura óptima de la pectinasa se encuentra en rangos de (30 a 76 °C), sin embargo, depende de la fuente de la cual se obtuvo la enzima, como es el caso para el *Bacillus*, el cual se inactiva completamente al llegar a temperaturas entre 65 y 90 °C en un tiempo entre 1 a 5 minutos (García-Ulloa & Cely, 2020).

Los intervalos de pH entre los que se encuentran las pectinasas a nivel comercial están entre 4 y 7, pero como las enzimas pécticas son diversas es difícil generalizar un pH óptimo. La mayoría de las pectinasas provenientes de bacterias o vegetales presentan rangos de pH alcalinos, mientras, que las de origen fúngico tienen rangos de pH ácidos. (García-Ulloa & Cely, 2020).

1.6.4.5. Celulasa.

Las celulasas son enzimas con la capacidad de romper los enlaces β -1,4-glucosídicos de glucano con la finalidad de obtener glucosa por hidrólisis de la celulosa (polisacárido que constituye entre el 35 y el 50% de la masa seca de las plantas). Las enzimas provenientes del reino fungi como es el caso de la celulasa, tienen un impacto favorable en la biorrefinería y los biocombustibles debido a la capacidad de los hongos para producir estas enzimas en cantidades elevadas, pudiendo también ser usadas en la biorremediación de compuestos tóxicos (Alejandro-Santillán & Camposano-Rodríguez, 2021).

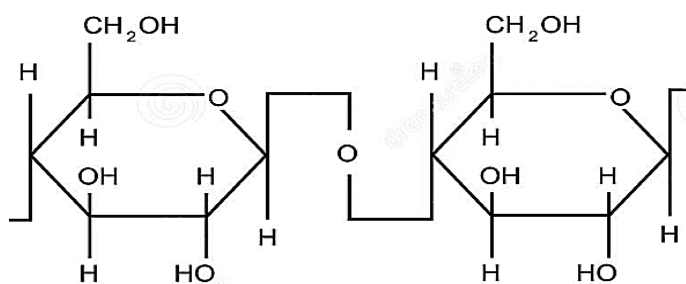


Figura 9. Estructura de la celulosa.

Fuente:

<https://es.dreamstime.com/estructura-qu%C3%ADmica-de-la-celulosa-es-un-polisac%C3%A1rido-compuesto-por-una-cadena-lineal-unidades-glucosa-enlazadas-beta-con-grado-image197811748>

1.6.4.6. Condiciones de estabilidad y actividad de la celulasa.

La celulasa puede verse afectada por diversos factores fisicoquímicos, los cuales pueden llegar a alterar la estabilidad y, por ende, su actividad enzimática. Pero aquellos que ostentan ser los más significativos son la temperatura, la cual se recomienda sea de dentro del intervalo de 45 °C a 50 °C y el pH se encuentre dentro del rango de 5 a 5.5, establecidos en la hoja de aplicación de celulasa con la cual se trabajó en el laboratorio (Cellic® CTec2 de la empresa novozymes) (Novozymes Corp., 2023A). También existen otros factores que intervienen como la concentración del sustrato, la concentración de la

enzima, el tiempo de incubación, su rapidez de agitación, entre otros. Las condiciones óptimas para obtener un mayor rendimiento en la celulasa son casi semejantes al de otras enzimas fúngicas (Alejandro-Santillán & Camposano-Rodríguez, 2021).

1.6.5. Otros métodos de extracción.

Existen otros métodos de extracción como: Fluidos Supercríticos, Calefacción Dieléctrica (Extracción Asistida por Microondas), Descompresión Instantánea Controlada, Tecnología de Gas Licuado, Tecnología de Extrusión, Campo de Pulso Eléctrico y Descarga Eléctrica de Alto Voltaje, Óhmico, Calor Infrarrojo y Ultravioleta, y Procesamiento de Alta Presión, mismos en los que no profundizaremos al no ser considerados para la realización de este trabajo.

1.7. Legislación de aceites esenciales.

Nuestro país cuenta con un amplio marco normativo en el área de la salud, del cual se desprende la Ley General de Salud, misma que da fundamento a diversos Reglamentos, Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Normas Mexicanas (NMX) y a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. En el *Artículo 195* de la Ley General de Salud se menciona que la Secretaría de Salud emitirá las Normas Oficiales Mexicanas a que deberá sujetarse el proceso y las especificaciones de los productos, así mismo nos señala que los medicamentos y demás insumos para la salud estarán normados por la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, en la cual, dentro de la *Farmacopea Herbolaria*, se ubican los aceites esenciales (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

En cuanto a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y Normas Mexicanas (NMX) son varias las publicaciones de interés para este trabajo, las cuales enunciamos a continuación, mismas que se pueden encontrar en el Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad (SINEC) de la Secretaría de Economía.

- Norma Oficial Mexicana NOM-K-146-S-1979, Citral natural.
- Norma Oficial Mexicana NOM-K-463-S-1979, Aceites esenciales y productos aromáticos. - Determinación de ésteres.
- Norma Oficial Mexicana NOM-F-366-S-1980, Aceite Esencial de Zacate Limón.
- Norma Oficial Mexicana NOM-F-354-S-1980, Aceites Esenciales y Productos Aromáticos - Determinación de Metales Pesados.
- Fe de Erratas a la Norma Oficial Mexicana NOM-K-459-S-1979, Aceites esenciales - Determinación de plomo - Método de la Ditizona, publicada el 31 de agosto de 1979.
- Norma Mexicana NMX-K-129-1976. Determinación del índice de refracción en aceites esenciales y productos aromáticos. Method of test for refractive index of essential oils and aromatic substances. Normas Mexicanas.

Los aceites esenciales son descritos en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) en la sección introductoria correspondiente a los aceites. Se presenta la definición de aceite esencial, sus tipos y los procesos de destilación a los que puede ser sometido. A continuación, se transcribe el texto en referencia que ha sido publicado en la FHEUM (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

Productos volátiles de composición compleja, obtenidos por destilación con arrastre de vapor de agua, destilación seca o por un proceso mecánico apropiado, sin calentar a partir de una materia prima vegetal botánicamente definida. Los aceites esenciales pueden separarse de la fase acuosa por un procedimiento físico, sin que se produzcan cambios significativos en su composición.

En este documento se hace referencia a cinco tipos de aceites esenciales a partir de cítricos, mismos que se mencionan a continuación:

- ***Limón Mexicano, Aceite Esencial Centrifugado Tipo A: Aceite esencial producido por centrifugación de la emulsión jugo-aceite obtenida por expresión en***

prensa de tomillo de los frutos enteros de "limón mexicano" *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae.

- **Limón Mexicano, Aceite Esencial Centrifugado Tipo B:** Aceite esencial producido por centrifugación de la emulsión agua-aceite obtenida con un extractor provisto de puntas que pinchen o raspen bajo una aspersion de agua la superficie del fruto de "limón mexicano" *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae.
- **Limón Mexicano, Aceite Esencial Destilado:** Aceite esencial obtenido del pericarpio fresco e inmaduro de *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae
- **Limón Mexicano, Aceite Esencial Destilado y Desterpenado:** Aceite esencial obtenido por destilación del aceite de *Citrus aurantifolia* Swingle. Familia Rutaceae. Procesado en un equipo de alta eficiencia de fraccionamiento al vacío, en condiciones de baja temperatura, posterior extracción de los terpenos volátiles y concentración de los componentes oxigenados y sesquiterpenos.
- **Naranja Aceite Esencial:** Aceite esencial obtenido por expresión de la cáscara fresca del fruto maduro del *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (*Citrus aurantium* L. var. *dulcis* L.) Familia Rutaceae. Puede contener un antioxidante adecuado.

Usando el procedimiento de normalización establecido en la FHEUM (Cromatografía de gases MGA 0241) se determinaron diversos compuestos para los dos cítricos (Limón y Naranja).

En el Tabla 9, se puede observar la variación en porcentaje de diversos compuestos publicados en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Tabla 9. Variación en por ciento de diversos compuestos identificados en cinco cítricos por el procesamiento de normalización.

Componentes	Limón Mexicano, Aceite Esencial Centrifugado Tipo "A"	Limón Mexicano, Aceite Esencial Centrifugado Tipo "B"	Limón Mexicano, Aceite Esencial Destilado*	Limón Mexicano, Aceite Esencial Destilado y Desterpenado*	Naranja Aceite Esencial (Resinificados)**
α -Pinoeno	2.24 y 2.55 %	1.59 y 2.53 %	0.98 y 1.40 %	0.00 y 0.04 %	0.4 y 0.6 %
Sabineno	2.53 y 3.65 %	2.79 y 3.59 %			0.2 y 1.1 %
β -Pinoeno	19.0 y 21.10 %	16.72 y 21.69 %	1.18 y 2.65 %	0.00 y 0.04 %	0.02 y 0.3 %
Mirceno	1.25 y 1.46 %	1.11 y 1.35 %	1.29 y 1.41 %		
β -mirceno					1.7 y 2.5 %
1,4-Cineol			1.67 y 2.55 %	0.00 y 0.04 %	
α -Terpineno			2.18 y 3.04 %		
Limonoeno					92.0 y 97.0 %
D-Limonoeno	46.53 y 49.06 %	45.08 y 49.82 %	45.44 y 47.23 %	0.27 y 1.05 %	
γ -Terpineno	6.71 y 9.50 %	7.55 y 9.40 %	10.10 y 11.79 %	0.32 y 0.65 %	
Tepinoloeno			6.90 y 8.52 %	0.75 y 1.30 %	
Linalool	0.16 y 0.24 %	0.11 y 0.29 %	0.12 y 8.52 %	0.35 y 0.75 %	0.2 y 0.7 %
α -Fenchol			0.75 y 0.93 %	0.95 y 2.66 %	
Terpien-1-ol			0.72 y 1.15 %	2.46 y 4.83 %	
β -Terpineol			0.56 y 0.78 %	2.99 y 3.71 %	
Borneol			0.43 y 0.57 %	2.10 y 3.14 %	
Terpinen-4-ol			0.76 y 1.06 %	4.11 y 5.55 %	
α -Terpineol	0.18 y 0.34 %	0.22 y 0.48 %	6.20 y 7.20 %	34.43 y 38.69 %	
γ -Terpineol			0.80 y 1.19 %	5.07 y 6.77 %	
Neral	1.06 y 1.84 %	1.57 y 2.30 %			0.02 y 0.10 %
Geranial	1.68 y 2.29 %	2.35 y 3.79 %	0.01 y 0.08 %	0.13 y 0.32 %	0.03 y 0.20 %
Trans- α -bergamoteno				3.55 y 4.92 %	
Trans, trans- α -farneseno	1.11 y 1.63 %	1.43 y 1.90 %	0.71 y 1.19 %	3.88 y 6.45 %	
β -Bisaboleno	1.64 y 2.02 %	1.52 y 2.22 %	1.05 y 1.64 %	5.20 y 8.48 %	
Germacreno B	0.23 y 0.36 %	-			
Octanal					0.1 y 0.4 %
Decanal					0.1 y 0.4 %
Valenceno					0.02 y 0.5 %

*Condiciones de equipo. Gas de arrastre helio, velocidad frontal del gas acarreador 34 cm/min, detector de ionización de flama; columna de sílice fundido de 30 m x 0.32 mm, recubierta con fenilmetilsiloxano (1.0 μ m). Temperatura de la columna a 75 °C durante 8 min, aumentar la temperatura en incrementos de 4 °C/min hasta 200 °C, mantener la temperatura durante 255 min; temperatura del detector y del inyector a 270 °C.

**Condiciones del equipo. Gas de arrastre: helio, velocidad de flujo 1 mL/min; detector de ionización de flama; columna de sílice fundido, de 30 m x 0.53 mm, recubierta con macrogol 20000 (1 μ m), con proporción de división de flujo.

Las Normas ISO (International Organization for Standardization), son un conjunto de estándares que tienen reconocimiento a nivel internacional y que han sido instituidas con el objetivo de ayudar a establecer niveles de homogeneidad en relación con la gestión, prestación de servicios y desarrollo de productos en la industria. Una de estas ISO es la Norma Internacional ISO 3053:2004, la cual especifica ciertas características del aceite de pomelo (*Citrus x Paradisi Macfad*), obtenido a partir del método por expresión, descrito en la ISO 7609 “Analysis by gas chromatography on capillary columns -General method”.

Entre otras características presentes en la ISO 3053:2004 en la Tabla 10 aparecen los resultados del análisis del aceite esencial por medio de cromatografía de gases.

Tabla 10. Perfiles cromatográficos de aceite de pomelo (*Citrus Paradisi*), obtenido por expresión.

Componente	Mínimo %	Máximo %
α -pineno	0,2	0,6
Sabineno	0,1	0,6
β -pineno	0,05	0,2
Mirceno	1,5	2,5
Limoneno	92	96
<i>n</i> -Octanal	0,2	0,8
<i>n</i> -Nonanal	0,04	0,1
<i>n</i> -Decanal	0,1	0,6
Neral	0,02	0,04
β -cariofileno	0,2	0,5
Nootkatona	0,01	0,8

Fuente: ISO 3053:2004.

Las Normas ISO pueden ser obligatorias para el comercio internacional, pero no lo son en México, a menos que los interesados se sujeten a ellas.

2. Justificación.

Los aceites esenciales han adquirido una gran importancia a nivel mundial y en el caso de México no es la excepción, ya que cada día se ha visto un incremento en la oferta y demanda de estos productos, prueba de ello es el crecimiento de los laboratorios que los fabrican y los establecimientos que los ofrecen.

Una fuente importante para obtener aceites esenciales son los cítricos siendo México un importante productor particularmente de naranja, limón y toronja, teniendo este último una producción de cerca de medio millón de toneladas al año ocupando el cuarto lugar en la escala mundial (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Dado que la toronja ha sido estudiada por el grupo de trabajo en un extrusor de doble tornillo situado en el laboratorio de Ingeniería Agroindustrial (Trujillo-Juárez et al., 2017A), resulta pertinente evaluar otros métodos de la Química Verde que expandan las posibilidades de producción el aceite esencial. El presente estudio se centró en dos métodos: extracción asistida por ultrasonido y extracción por enzimas, seguido de una separación basada en la conocida técnica de hidrodestilación.

3. Objetivos.

Valorar los residuos de cáscara de toronja como fuente de aceite esencial, a través de dos metodologías de extracción verdes e innovadoras, así como determinar el rendimiento y la calidad del producto final para fines comparativos con otras metodologías reportadas en la literatura.

Objetivos particulares sobre la utilización de ultrasonido.

Realizar el proceso de obtención de aceite esencial utilizando dos equipos de ultrasonido para comparar los rendimientos.

Establecer el tiempo óptimo de operación para la extracción de aceite esencial a una misma temperatura inicial en dos tipos de ultrasonidos.

Objetivos particulares sobre la utilización de enzimas.

Conocer los rendimientos del aceite esencial a partir de la utilización de enzimas.

Establecer el tiempo óptimo de incubación para la extracción de aceite esencial a una temperatura constante.

4. Hipótesis.

Los métodos de extracción asistida con ultrasonido y por enzimas cumplen los Principios de la Química Verde y son apropiados para la obtención de aceite esencial.

Los métodos de extracción de aceites esenciales que tengan mejores rendimientos y menores costos, en la actualidad, tendrá una mayor atención a nivel industrial.

5. Equipos y materiales.

A continuación, se enlista el equipo, materiales y sustancias que fueron empleados en la parte experimental de este trabajo tanto en el laboratorio L-314 del edificio E de la Facultad de Química como en el Laboratorio Agroindustrial del Depto. de Ingeniería Química.

Equipos:

- Ultrasonido de Inmersión VEVOR.
- Ultrasonido: homogeneizador de tejidos marca Cole-Palmer, USA, modelo: CV334.
- Procesador ultrasónico marca: Cole-Parmer, USA, modelo: CP505.
- Incubadora marca New Brunswick, modelo Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker.
- Mantilla de calentamiento marca: Prolab, tipo nido, con potencia de 450 W para matraz redondo de 2 L.
- Cromatógrafo de gases marca Ellutia GmbH & Co., Alemania, modelo 200, con detector de ionización de flama y columna integrada marca Phenomenex, USA, modelo ZB-5.
- Balanza analítica marca: OHAUS.
- Congelador marca: UTECH para condiciones de temperatura de -10 °C.
- Congelador marca: Revco para condiciones de temperatura de -70 °C.
- Procesador de alimentos-Picadora PLUS, marca Moulinex con diferencia de potencial de 127 V, de frecuencia de 60 Hz y potencia de 460 W.
- Licuadora marca: Osterizer.

Materiales y Sustancias

- Cáscaras de toronja.
- Acetato de sodio.

- Ácido acético.
- Solución de pectinasa (Pectinex® 3X L con concentración $\geq 3,000 \frac{\text{unidades}}{\text{mL}}$, densidad aproximada de $1.2 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$) cuyo origen de obtención es el *Aspergillus niger*.
- Solución de celulasa (Cellic® CTec2 con concentración $\geq 1,000 \frac{\text{unidades}}{\text{g}}$, densidad aproximada de $1.15 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$) cuyo origen de obtención es el *Trichoderma reesei*.
- Cloroformo.
- Metanol.
- Matraz de bola de 2 L.
- Receptáculo para destilado con 500 mL de capacidad y 2 válvulas para adición y retiro de producto, con junta esmerilada de 24/40.
- Condensador de vidrio tipo rosario con junta 24/40.
- Micropipeta de 1000 microlitros con puntas.
- Micropipeta de 200 microlitros con puntas.
- Microjeringa para cromatografía con capacidad de 10 microlitros.

6. Desarrollo experimental.

6.1. Procedimientos previos a la extracción del aceite esencial.

A continuación, se describen las técnicas previas requeridas para la extracción del aceite esencial de toronja a partir de los tratamientos basados en ultrasonido y la vía enzimática.

6.1.1. Selección y adquisición de la toronja.

Para la selección y adquisición de la toronja se acudió a la Central de Abasto de la Ciudad de México a principio del mes de marzo, tomando en cuenta que en este periodo se da la mayor producción y se encuentra el cítrico de mejor calidad. La toronja corresponde a un mismo lote de venta.

6.1.2. Procesamiento para la extracción de la cáscara y conservación.

La técnica adecuada en el cortado y obtención de la cáscara fue realizando los siguientes pasos:

a) Lavar la toronja con el objeto de que no estén presentes otros compuestos o residuos que afecten el resultado de la obtención de los aceites esenciales.

b) Realizar dos cortes en 360° solamente en la superficie, con la finalidad de separar en cuatro fracciones la cáscara de la toronja (Figura 10).



Figura 10. Cortes externos de cáscara en cuatro secciones.

c) Realizar varios cortes a cada una de las fracciones obtenidas para obtener secciones de aproximadamente un centímetro de ancho por el largo de cada cáscara (Figura 11).



Figura 11. Corte en tira de la cáscara de toronja.

d) Una vez que se obtienen las tiras, cortar cada una de ellas en pedazos más pequeños aproximadamente de un centímetro cuadrado.

e) Guardar el material en bolsas de plástico (Ziploc) y almacenar en un ultracongelador a -70°C hasta su uso.

6.1.3. Determinación de la humedad en la cáscara de la toronja.

En primera instancia se determinó el nivel de humedad y por lo tanto de la proporción de la base seca de la cáscara de toronja. El procedimiento seguido consistió en pesar 5.8 g de cáscara en la termobalanza, procediendo a calentarla a una temperatura de 106 °C, registrando su peso en períodos de un minuto, hasta llegar a un peso relativamente constante, el cual resultó de 1.9 g a los 67 minutos. Como resultado se obtuvo que aproximadamente 33 % del peso de la materia prima corresponde a la base seca.

6.2. Extracción del aceite esencial.

El trabajo experimental para la extracción del aceite esencial se desarrolló en el laboratorio L-314 del edificio E de la Facultad de Química bajo la supervisión de la Dra. Carmina Montiel Pacheco y en el Laboratorio de Ingeniería Química del área Agroindustrial a cargo del Dr. Óscar Hernández Meléndez.

Se han considerado en este trabajo tres opciones para la obtención de aceite esencial de toronja. La primera consistió en utilizar un ultrasonido de inmersión para romper los tejidos de cáscara de la fruta. El segundo procedimiento fue usar otro tipo de ultrasonido empleado para homogeneizar tejidos diversos. El tercer procedimiento consistió en la extracción por medio de enzimas, y específicamente de preparados comerciales de pectinasas y celulasas.

6.2.1. Procedimiento con ultrasonido de inmersión.

Se empleó un aparato conocido como Ultrasonido de Inmersión (Marca: VEVOR) (Figura 12), del cual el fabricante señala las siguientes características: Capacidad 3.2 L, Suministro de Poder AC 100-120 V, 60 Hz, Frecuencia Ultrasónica 40 kHz, Potencia Ultrasónica 120 W y Potencia Calorífica 100 W.

Una vez obtenida la cáscara, como se describe previamente, el siguiente paso fue disminuir el tamaño de partícula, en un procesador de alimentos de la marca Moulinex. Posteriormente, se colocaron 300 g de la cáscara molida, con su humedad natural, dentro de bolsas de polietileno. A cada bolsa (lote) con la cáscara molida se le agregaron 750 mL de agua destilada, se agitó para uniformar un poco la mezcla y se les aplicaron distintos tiempos de permanencia en el ultrasonido, seleccionando lapsos de 20, 40 y 60 minutos.

La temperatura inicial de operación fue de 30 °C y se elevó paulatinamente de acuerdo con el tiempo de residencia en el equipo, debiéndose registrar los cambios cada 5 minutos.



Figura 12. Ultrasonido de Inmersión. Marca (VEVOR).

Al equipo de ultrasonido se le colocó aproximadamente 800 mL de agua destilada y luego se depositó en el recipiente del ultrasonido una bolsa cerrada con la cáscara molida y la cantidad de agua elegida, haciéndolo operar el equipo por los tiempos dados a cada lote.

Con el producto de cada bolsa, después de efectuado el proceso de sonicación, se llevó a cabo la hidrodestilación (Figura 13), la cual inicia por transvasar el contenido de

la bolsa a un matraz de bola con una capacidad de dos litros, mismo que se coloca dentro de una mantilla de calentamiento tipo nido y se cubre en la parte superior con una franela para evitar pérdidas de calor. Se hizo la instalación para conducir los destilados que se depositaron en un recipiente de vidrio, haciéndolos pasar por un condensador tipo rosario, que cuenta con un flujo de refrigeración paralelo al del condensado.



Figura 13. Equipo de hidrodestilación, empleando una mantilla de calentamiento tipo nido (marca: Prolab) con potencia de 450 W para matraz redondo de 2 L.

El producto final de cada hidrodestilación mostró dos fases líquidas, siendo colocada la mezcla en una probeta inmersa en agua fría y separadas posteriormente con ayuda de dos micropipetas para recuperar el aceite esencial obtenido de la fase superior.

Cada lote de aceite esencial se pesó por medio de una balanza analítica y se tomó una muestra de 100 μL a la cual se le agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó suavemente y se inyectaron 2 μL al cromatógrafo de gases para obtener su composición.

Previamente a efectuar el procedimiento hasta aquí descrito y con objeto de comparar los resultados con distintos procedimientos de molienda, el contenido de una de las bolsas con 300 gramos de cáscara pelada se molió empleando una licuadora de cocina común (2° tipo de molienda) y se le agregaron 250 mL adicionales de agua, tanto la materia prima como el medio líquido se depositaron de manera directa al ultrasonido de inmersión, pero en lo demás se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Este experimento se realizó con un tiempo de permanencia de 60 minutos.

6.2.2. Procedimiento con ultrasonido para la homogeneización de tejidos.

El equipo empleado para realizar la extracción del aceite esencial se localiza en el Laboratorio L-314 del Edificio E. Un homogeneizador de tejidos conectado a un procesador ultrasónico (Figura 14) el cual presenta las siguientes características: Suministro de Poder AC 120 V ~ AC 50/60 Hz 10 A MAX, Frecuencia Ultrasónica 20 kHz y Potencia Ultrasónica 500 W.

En el homogeneizador de tejidos se programó un 40 % de amplitud, 30 s de pulsos y 20 s de paro. Al igual que en el ultrasonido de inmersión, cada lote (300 g de cáscara molida con su humedad nativa en contacto con 750 mL de agua destilada) se trató con diferentes tiempos de sonicación (20, 40 y 60 minutos), con objeto de poder determinar los resultados de separación del aceite esencial a los distintos tiempos y también comparar los resultados con el método de sonicación por inmersión. Uno de los fines que se persiguen con este procedimiento es maximizar el rompimiento de los flavedos y albedos, en los cuales se encuentra el aceite esencial.

Igual que en el procedimiento de ultrasonido de inmersión, con el producto de cada muestra, después de efectuado el proceso de sonicación, se llevó a cabo la hidrodestilación, el pesado del producto y la determinación de la composición de esta previamente descrito.



Figura 14. Ultrasonido: homogeneizador de tejidos (modelo: CV334, marca: Cole-Palmer, USA) y un procesador ultrasónico (modelo: CP505, marca: Cole-Parmer, USA).

6.2.3. Extracción por uso de enzimas.

Este procedimiento se realizó con la combinación de dos diferentes soluciones de enzimas, una pectinasa (Pectinex[®] 3X L) con una concentración ($\geq 3,000 \frac{\text{unidades}}{\text{mL}}$) (Novozymes Corp., 2023B) y la celulasa (Cellic[®] CTec2) con una concentración ($\geq 1,150 \frac{\text{unidades}}{\text{mL}}$) (Novozymes Corp., 2023C), ambas de la empresa Novozymes.

Lo primero fue preparar una solución amortiguadora de acetatos con una concentración de 0.5 M, pH de 5 y un volumen de 500 mL. Los cálculos se presentan en el Anexo B. Con esta solución amortiguadora (Buffer), se procedió a realizar una dilución, con 75 mL de la solución Buffer (constituido de acetato de sodio y ácido acético) y 675 mL de agua para alcanzar una concentración 0.05 M.

Posteriormente se tomaron 300 g de materia prima húmeda y molida para cada matraz Erlenmeyer, se les agregó la solución Buffer y 6.5 mL de la solución de cada enzima para dar inicio a las reacciones enzimáticas. Los matraces se incubaron con agitación en una incubadora (New Brunswick Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker) a 180 rpm y 50 °C a diferentes tiempos; 6, 12, 24 y 40 horas (Figuras 15 y 16).



Figura 15. Incubadora. Marca: New Brunswick, Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker.

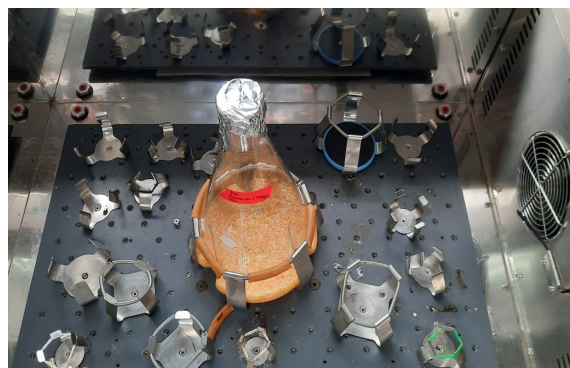


Figura 16. Muestra antes de realizada la reacción enzimática.

Igual que en el procedimiento de ultrasonido, con el producto de cada muestra, se llevó a cabo la hidrodestilación, el pesado del producto y la determinación de la composición por cromatografía de gases según se describió previamente.

6.3. Análisis del aceite esencial mediante cromatografía de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (modelo 200, marca Ellutia GmbH & Co., Alemania) (Figura 17) y una columna ZB-5, marca Phenomenex, (USA). Como fase estacionaria se empleó poli (5 % difenil/ 95 % dimetil siloxano), con gas helio como acarreador. El procedimiento consistió en diluir 100 μL de muestra con 200 μL de cloroformo (disolvente). Luego, se inyectaron dos μL con una microjeringa de 10 μL y se inició el programa de adquisición de datos (Ellution V5). En este programa se estableció una temperatura de 75 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguido de una primera rampa de 75 $^{\circ}\text{C}$ a 100 $^{\circ}\text{C}$, con una rapidez de calentamiento de 5 $\frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$. Después, se programó una segunda rampa de 100 $^{\circ}\text{C}$ a 220 $^{\circ}\text{C}$, con una rapidez de calentamiento de 6 $\frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ para terminar con una temperatura isotérmica de 220 $^{\circ}\text{C}$ por 8.5 minutos, como se encuentra reportada en la norma (International ISO-3053, 2004).



Figura 17. Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (modelo 200, marca Ellutia GmbH & Co., Alemania) y una columna (modelo ZB-5, marca Phenomenex, USA).

7. Resultados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las diferentes etapas experimentales.

7.1. Determinación de la humedad en la cáscara de la toronja.

En el trabajo presentado por Trujillo & cols.(2017A) reportan los comportamientos en el secado de la cáscara de toronja mismo que se aprecia en la Figura 18. La línea punteada muestra el cambio de pendiente del comportamiento de la curva, precisamente donde se da la humedad crítica.

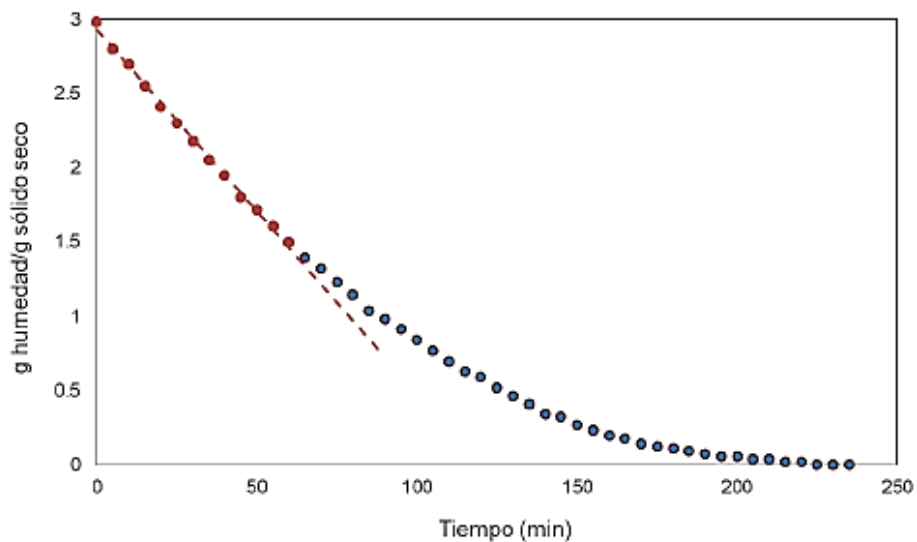


Figura 18. Curva de secado para cáscara de toronja.

Fuente: (Trujillo-Juárez et al., 2017A).

De la Figura 18 se puede desprender que el cambio drástico en la pendiente de la gráfica se da aproximadamente a los 60 minutos, cuando la relación de gramos de humedad entre gramos de sólido seco es cercana a 1.75. Se puede obtener que la humedad crítica ocurrió cercanamente al 58.3 % de humedad sobre humedad inicial.

En el trabajo realizado en el laboratorio para la elaboración de esta tesis, se programó la termobalanza a una temperatura constante de 106 °C y se registraron los valores (Tabla 11) con los cuales se construyó la curva de secado (Figura 19).

Tabla 11. Masa de la cáscara de toronja durante el proceso de secado.

t (min)	m (g)	t (min)	m (g)	t (min)	m (g)	t (min)	m (g)
0	5.816	16	3.946	34	2.826	51	2.152
1	5.712	17	3.872	35	2.776	52	2.124
2	5.53	18	3.798	36	2.726	53	2.098
3	5.35	19	3.726	37	2.68	54	2.074
4	5.194	20	3.654	38	2.632	55	2.052
5	5.048	21	3.588	39	2.588	56	2.032
6	4.916	22	3.52	40	2.544	57	2.012
7	4.792	23	3.454	41	2.504	58	1.994
8	4.676	24	3.392	42	2.462	59	1.98
9	4.568	25	3.33	43	2.422	60	1.966
10	4.466	26	3.268	44	2.384	61	1.954
11	4.37	27	3.208	45	2.348	62	1.942
12	4.28	28	3.15	46	2.312	63	1.932
13	4.192	29	3.092	47	2.276	64	1.924
14	4.108	30	3.038	48	2.244	65	1.916
15	4.026	32	2.928	49	2.21	66	1.91
31	2.982	33	2.876	50	2.18	66.8	1.904

Se puede observar que a partir del minuto 0 la masa inicial empezó a perder su humedad hasta que llega a una masa constante alrededor del minuto 67.

Comparando la Figura 18, con los resultados del presente trabajo y que se muestran en la Figura 19, se puede constatar que la humedad crítica ocurrió alrededor de los 10 minutos cuando la relación de gramos de humedad entre gramos de sólido seco es cercana a 1.25. Utilizando estos datos y sabiendo que la masa de materia prima base húmeda que se utilizó en ese experimento era 5.82 g, se puede obtener que la humedad crítica ocurrió cercanamente al 62.5 % de humedad sobre humedad inicial y la cantidad de agua total desplazada fue 3.9 g. En la Figura 19, la línea roja hace evidente el periodo de secado antecrítico y la línea verde se asocia con el periodo de secado postcrítico.

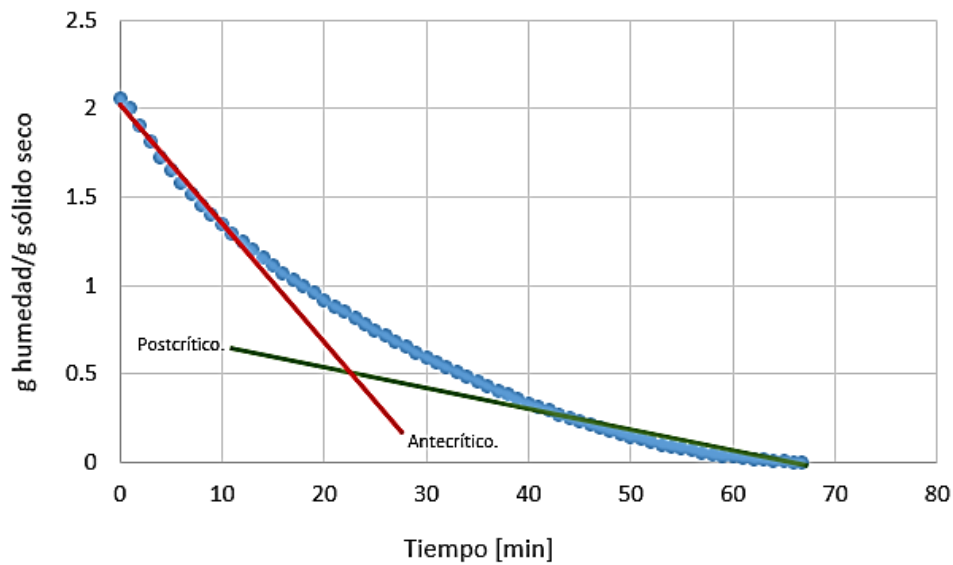


Figura 19. Curva de secado de la cáscara de toronja.

En ambos casos se observa que el secado tiene su máxima rapidez al inicio del proceso, manteniéndose en los momentos iniciales como constante hasta alcanzar la humedad crítica (período de secado antecrítico), después de la cual la pendiente empieza a ser horizontal paulatinamente (periodo de secado postcrítico). En ambos experimentos no se puede decir que esta rapidez llega a ser cero, pero si cercana a ese valor, debido a que en la medida que disminuye la humedad, también lo hace la rapidez, haciendo que el proceso sea muy dilatado (Treybal, 2000).

La humedad libre ubicada en el periodo de secado antecrítico, es la que se encuentra contenida por una sustancia en exceso de la humedad en el equilibrio y la humedad ligada que se encuentra dentro del periodo de secado postcrítico, es la contenida en una sustancia que ejerce una presión de vapor en el equilibrio menor que la del líquido puro a la misma temperatura (Treybal, 2000).

7.2. Extracción asistida por ultrasonido de inmersión.

El ultrasonido de inmersión, al no contar con un control de temperatura se programó inicialmente a una temperatura de 30 °C y esta se registró cada 5 minutos hasta que se

alcanzaron los tiempos de 20, 40 y 60 minutos de operación. Los resultados se muestran en la Tabla 12:

Tabla 12. Temperaturas en el ultrasonido de inmersión.

Experimento a 20 minutos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	0	30
	5	37
	10	39
	15	42
	20	43

Experimento a 40 minutos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	0	30
	5	36
	10	40
	15	42
	20	43
	25	45
	30	47
	35	49
	40	50

Experimento a 60 minutos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	0	30
	5	37
	10	39
	15	42
	20	44
	25	45
	30	47
	35	48
	40	49
	45	52
	50	53
	55	55
	60	57

En la Tabla 13 se presentan las masas y los rendimientos obtenidos de aceite esencial, primero sin el empleo del ultrasonido de inmersión y después utilizándolo por 20, 40 y 60 minutos de gestión del equipo.

Tabla 13. Rendimientos de la producción en el ultrasonido de inmersión a distintos tiempos.

Experimento	Tiempo (min)	Masa (g)	Rendimiento (g AE/g MPH)*	Rendimiento (g AE/g MPS)**
Control	No aplica	0.8898	2.97×10^{-3}	8.99×10^{-3}
1	20	1.3609	4.54×10^{-3}	13.75×10^{-3}
2	40	1.1018	3.67×10^{-3}	11.13×10^{-3}
3	60	0.9233	3.08×10^{-3}	9.33×10^{-3}

* (g AE/g MPH) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima húmeda.

** (g AE/g MPS) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima seca.

En la Figura 20, se muestra el comportamiento del producto obtenido con respecto a los tiempos de operación en el ultrasonido de inmersión.

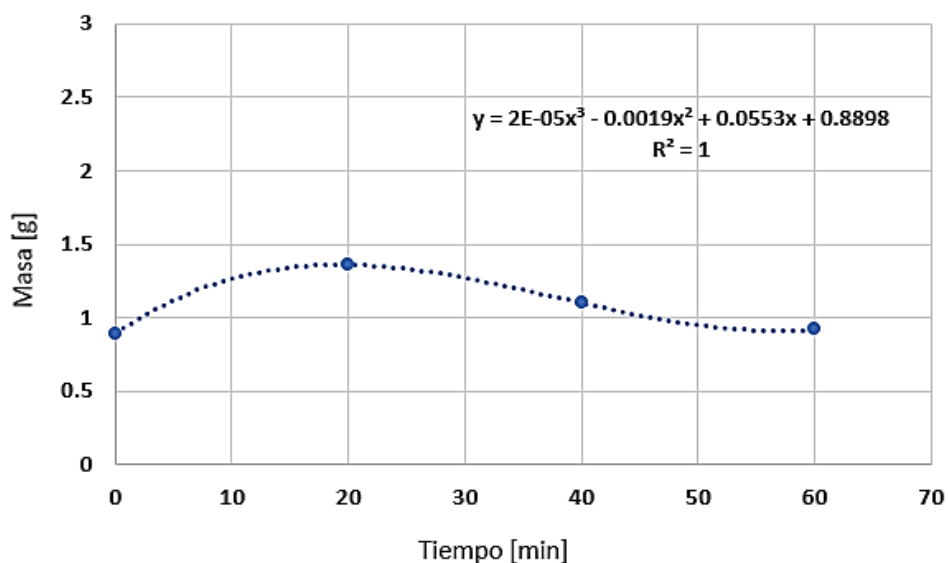


Figura 20. Masa del aceite esencial recuperado con respecto al tiempo de inmersión.

Los resultados del experimento con reducción de tamaño de partícula utilizando una licuadora, empleando un ultrasonido de inmersión por un tiempo de 60 minutos de tratamiento, con adición de agua, se presentan en la Tabla 14, donde se pueden observar los valores de la masa y los rendimientos obtenidos de aceite esencial.

Tabla 14. Rendimiento de la producción en el ultrasonido de inmersión durante 60 minutos, con 2° tipo de molienda y adición de agua.

Experimento	Tiempo (min)	Masa (g)	Rendimiento (g AE/g MPH)*	Rendimiento (g AE/g MPS)**
Control	No aplica	0.8898	2.97×10^{-3}	8.99×10^{-3}
	60	3.6139	18.07×10^{-3}	54.76×10^{-3}

* (g AE/g MPH) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima húmeda.

** (g AE/g MPS) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima seca.

7.3. Extracción asistida por homogeneizador de tejidos.

En la Tabla 15 se presentan las masas y los rendimientos obtenidos de aceite esencial, primero sin el empleo del homogeneizador de tejidos y después utilizándolo por 20, 40 y 60 minutos de operación del equipo.

Tabla 15. Rendimientos de la producción en el homogeneizador de tejidos a distintos tiempos.

Experimento	Tiempo (min)	Masa (g)	Rendimiento (g AE/g MPH)*	Rendimiento (g AE/g MPS)**
Control	No aplica	0.8898	2.97×10^{-3}	8.99×10^{-3}
1	20	2.05555	6.85×10^{-3}	20.76×10^{-3}
2	40	2.5479	8.49×10^{-3}	25.74×10^{-3}
3	60	2.0931	6.98×10^{-3}	21.14×10^{-3}

* (g AE/g MPH) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima húmeda.

** (g AE/g MPS) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima seca.

En la Figura 21, se muestra la función matemática de la masa con respecto a distintos tiempos de operación del homogeneizador de tejidos.

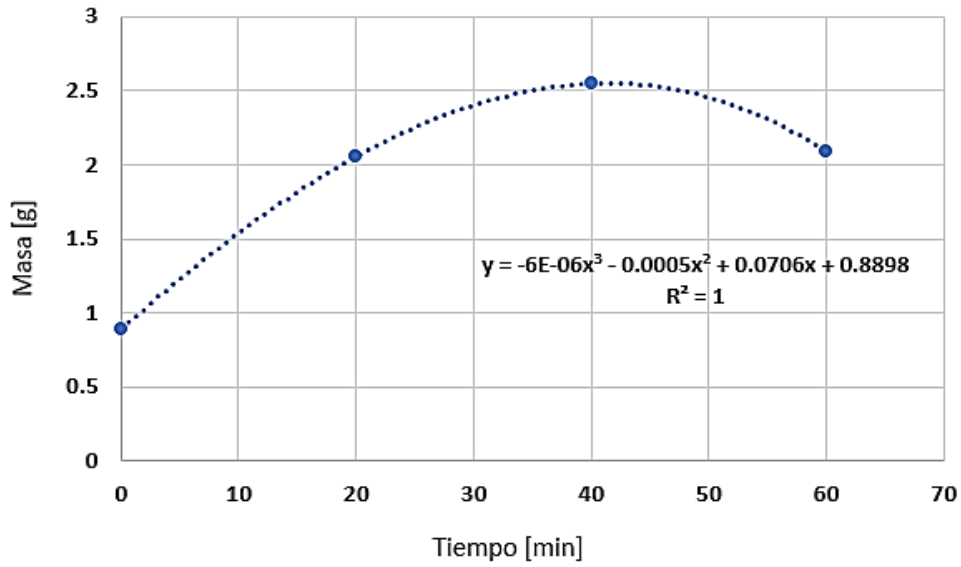


Figura 21. Masa del aceite esencial recuperado con respecto al tiempo de la homogeneización de tejidos.

Se compararon los resultados de los tres experimentos realizados en ambos sonicadores y se obtuvo la Figura 22.

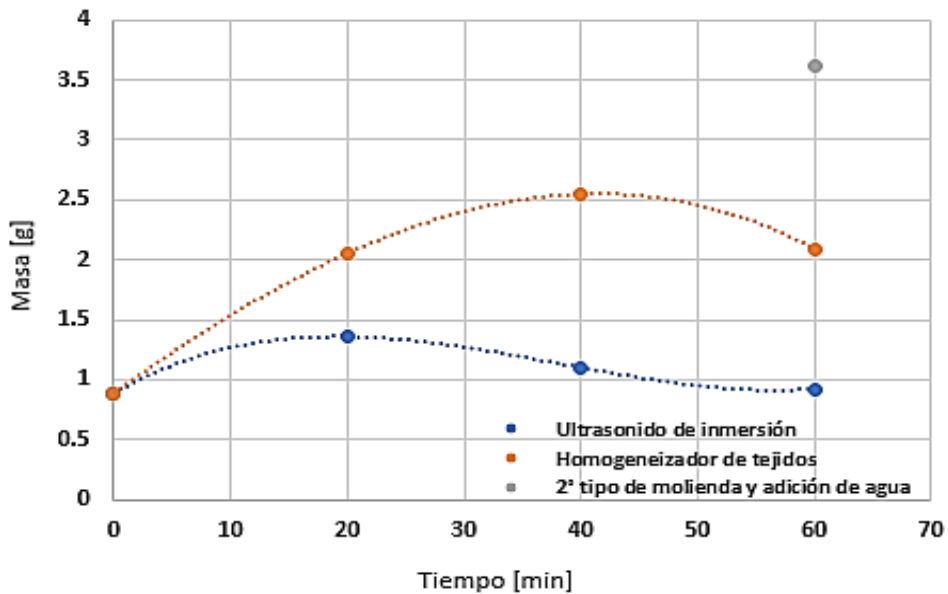


Figura 22. Perfiles comparados en dos equipos de ultrasonido para tres experimentos.

7.4. Extracción vía enzimática.

En la Tabla 16 se presentan las masas y los rendimientos obtenidos de aceite esencial por extracción vía enzimática a los 6, 12, 24 y 48 minutos.

Tabla 16. Rendimientos de la producción en la extracción vía enzimática a distintos tiempos.

Experimento	Tiempo (h)	Masa (g)	Rendimiento (g AE/g MPH)*	Rendimiento (g AE/g MPS)**
Control	No aplica	0.8898	2.97×10^{-3}	8.99×10^{-3}
1	6	2.8748	9.58×10^{-3}	29.04×10^{-3}
2	12	3.9703	13.23×10^{-3}	40.10×10^{-3}
3	24	4.7336	15.78×10^{-3}	47.81×10^{-3}
4	48	4.7975	15.99×10^{-3}	48.46×10^{-3}

* (g AE/g MPH) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima húmeda.

** (g AE/g MPS) gramos de aceite esencial entre gramos de materia prima seca.

En la Figura 23 se muestra el comportamiento de la extracción vía enzimática y la correlación de la masa obtenida a distintos tiempos de operación de la incubadora.

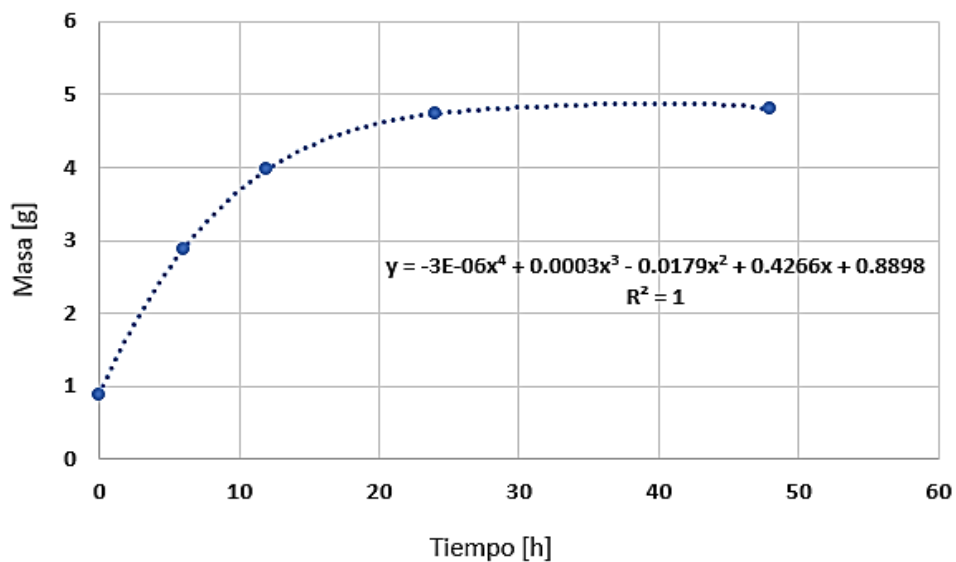


Figura 23. Masa del aceite esencial recuperado con respecto al tiempo de la reacción enzimática pectinasa-celulasa.

En la Figura 23, es notorio el comportamiento asintótico que sigue la reacción enzimática, dejando ver la desaparición de cambio en la masa en la medida que aumenta el tiempo, pudiendo detectarse con facilidad el agotamiento de la reacción.

7.5. Cromatografía de gases.

En la Figura 24 se presenta el cromatograma con los diferentes compuestos obtenidos en un estudio previo para aceite esencial grado reactivo, el cual sirve de referencia para identificar los compuestos presentes en el aceite esencial de toronja.

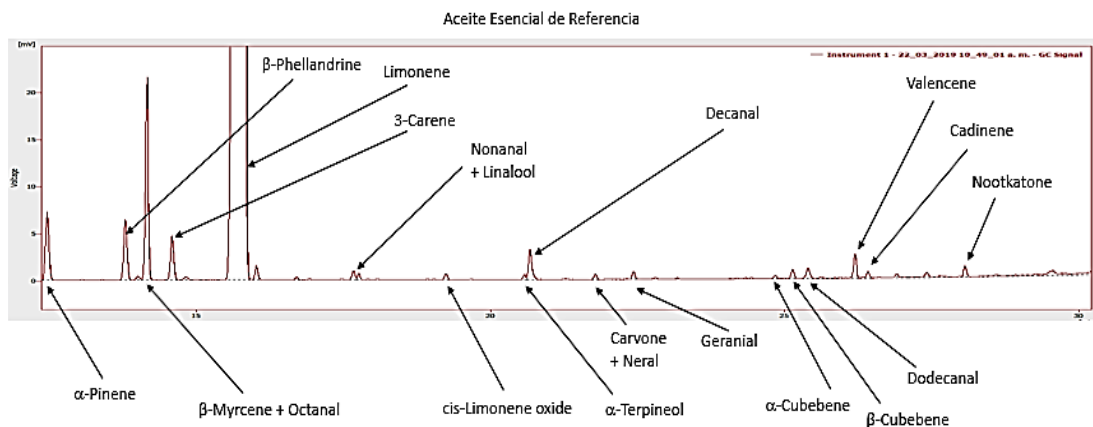


Figura 24. Cromatograma indicativo de compuestos de aceite esencial de toronja extraído previamente por extrusión en el grupo de trabajo y empleado como referencia.

7.5.1. Cromatogramas obtenidos.

En la Figura 25, se presenta el cromatograma de una experimentación de aceite esencial de toronja sin la extracción asistida de ultrasonido o la extracción asistida de enzimas, realizado en el Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial, empleando únicamente el método de la hidrodestilación, con el objeto de comparar los resultados obtenidos por la extracción de ambos métodos.

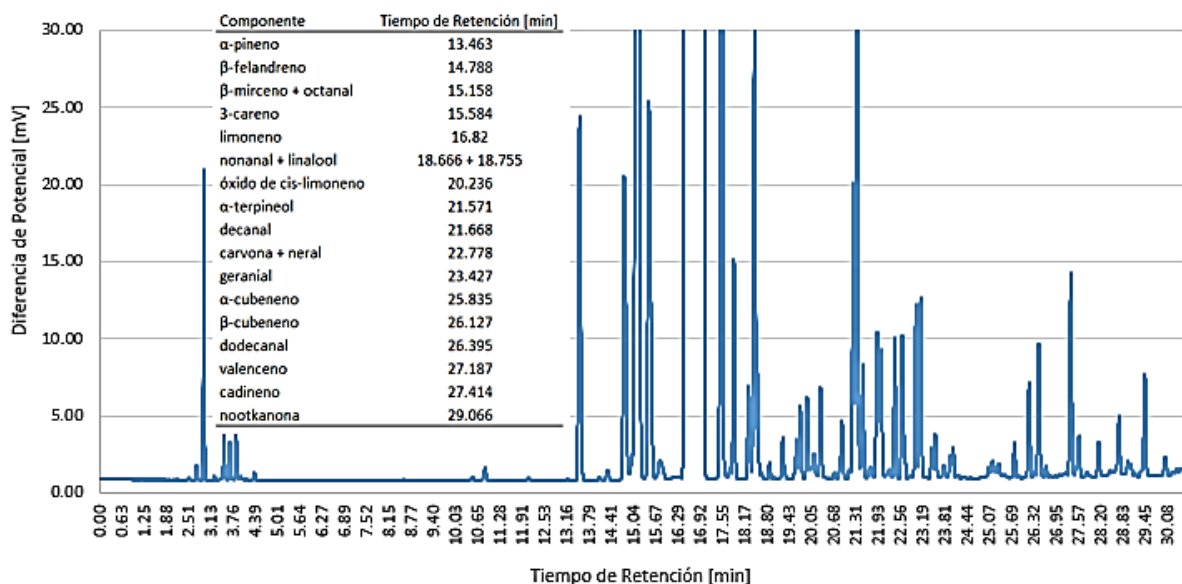


Figura 25. Cromatograma de aceite esencial de toronja sin extracción asistida de ultrasonido ni extracción asistida de enzimas.

Fuente: (Guzmán-Castillo, 2017).

A continuación, se presentan los cromatogramas de la extracción asistida con ultrasonido especificando el tipo de equipo empleado y el tiempo de tratamiento (Figura 26 a la Figura 32).

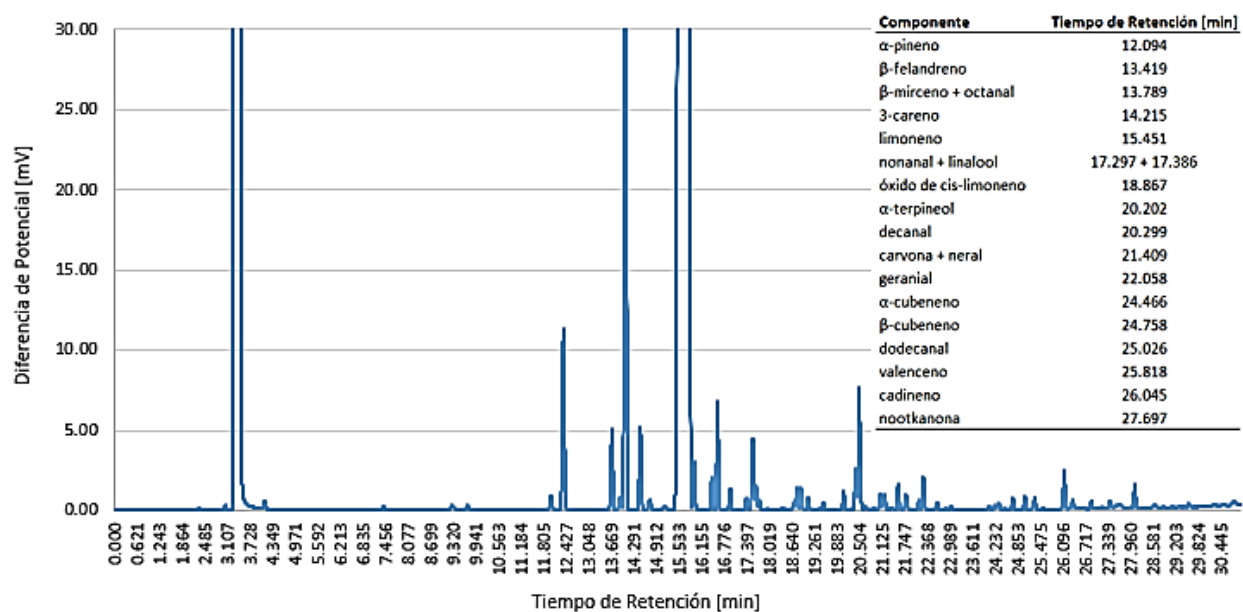


Figura 26. Cromatograma del producto con ultrasonido de inmersión por 20 minutos.

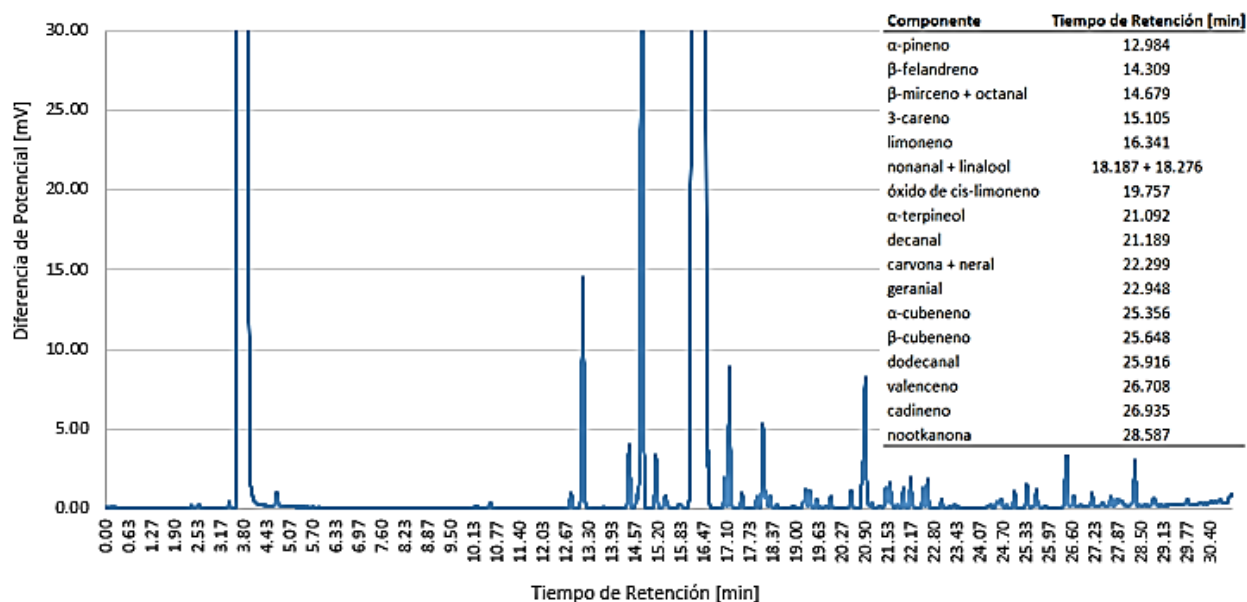


Figura 27. Cromatograma del producto con ultrasonido de inmersión por 40 minutos.

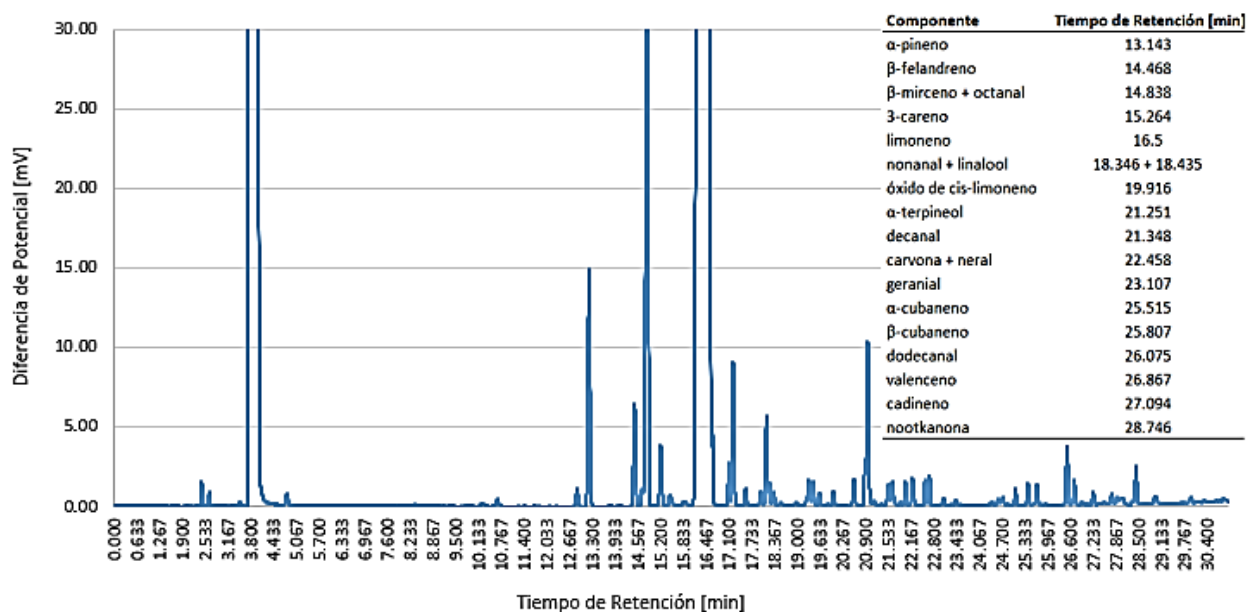


Figura 28. Cromatograma del producto con ultrasonido de inmersión por 60 minutos.

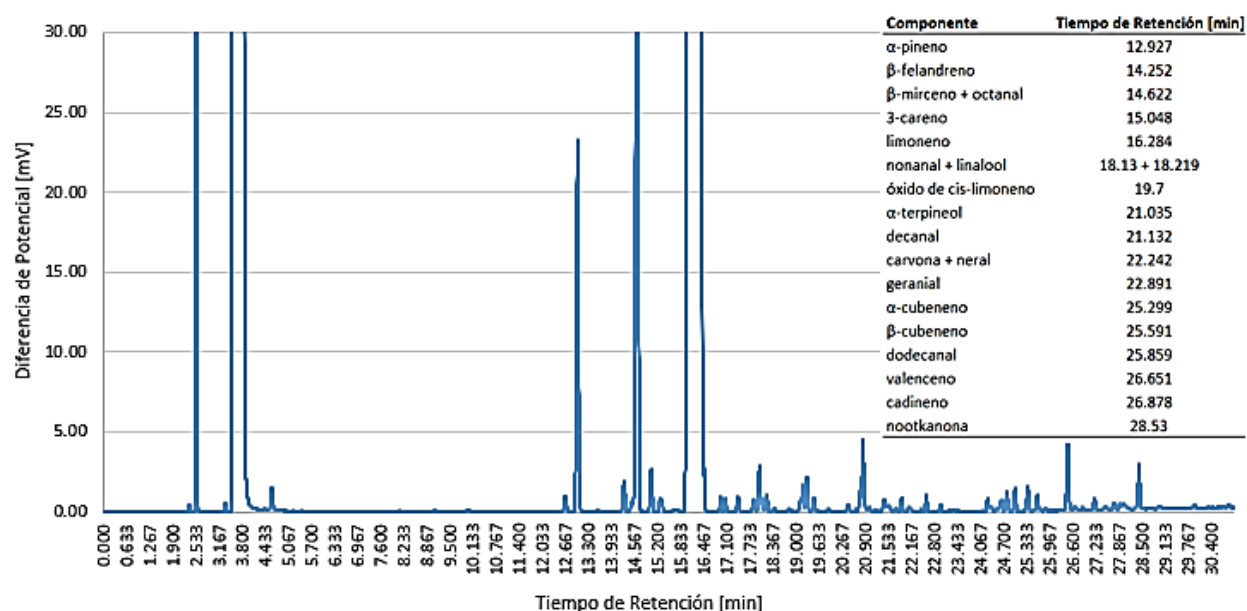


Figura 29. Cromatograma del producto con ultrasonido de inmersión por 60 minutos (proceso con 2° tipo de molienda y adición de agua).

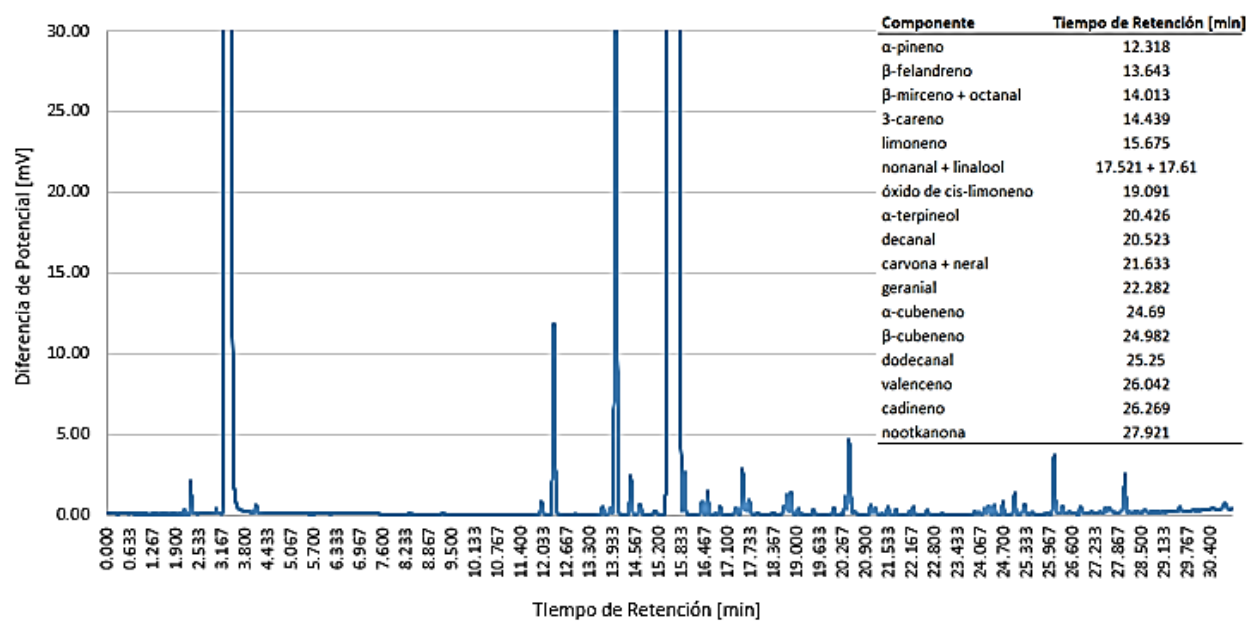


Figura 30. Cromatograma del producto con homogeneizador de tejidos por 20 minutos.

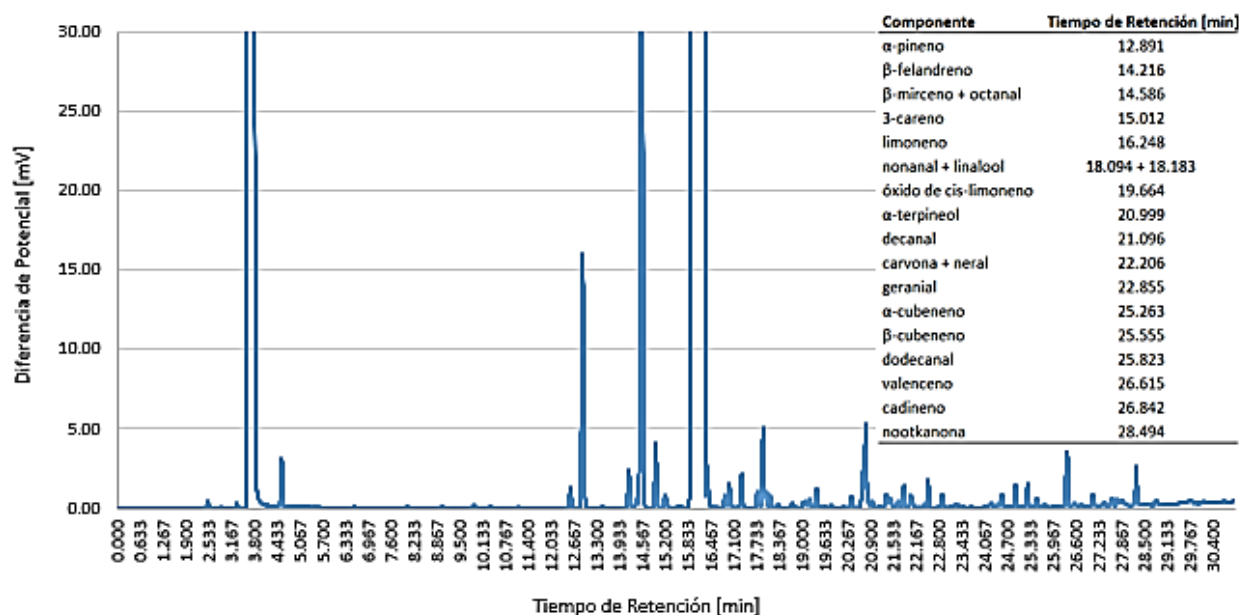


Figura 31. Cromatograma del producto con homogeneizador de tejidos por 40 minutos.

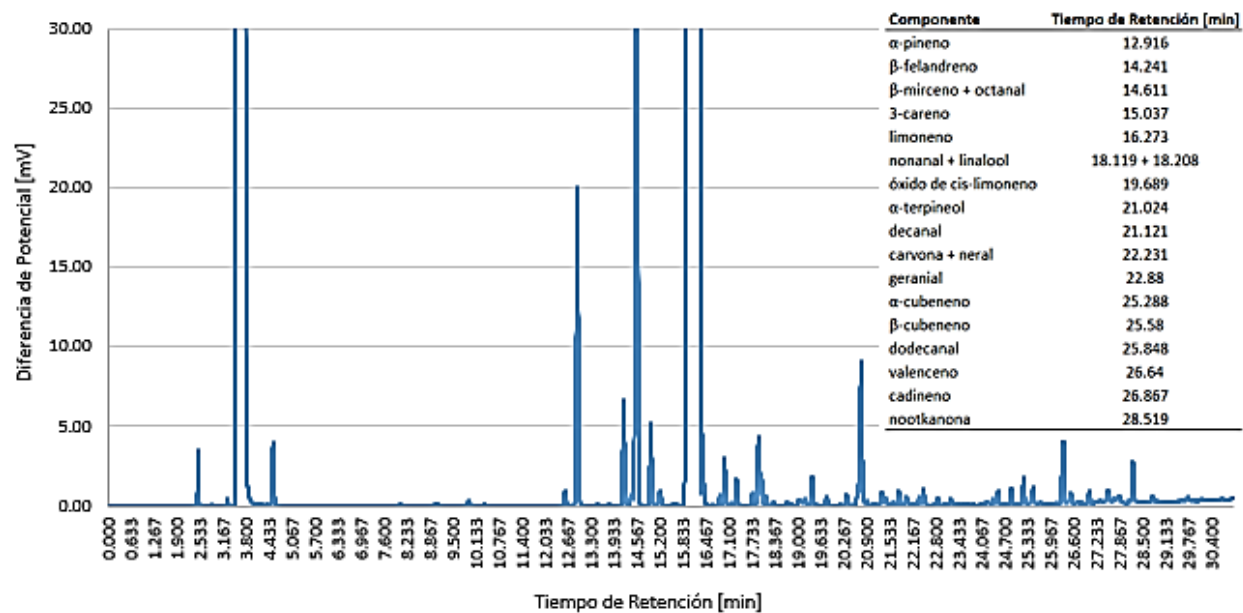


Figura 32. Cromatograma del producto con homogeneizador de tejidos por 60 minutos.

Los siguientes cromatogramas (Figura 33 a la Figura 36) corresponden a los obtenidos a partir de la extracción con enzimas.

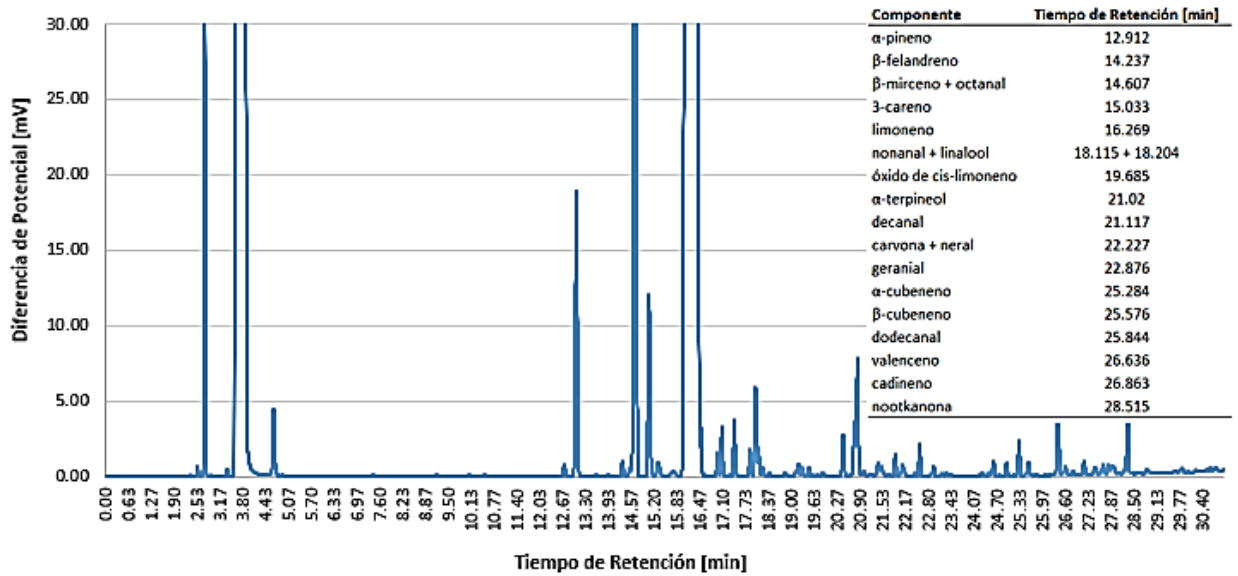


Figura 33. Cromatograma del producto con combinación de pectinasa-celulasa por 6 horas.

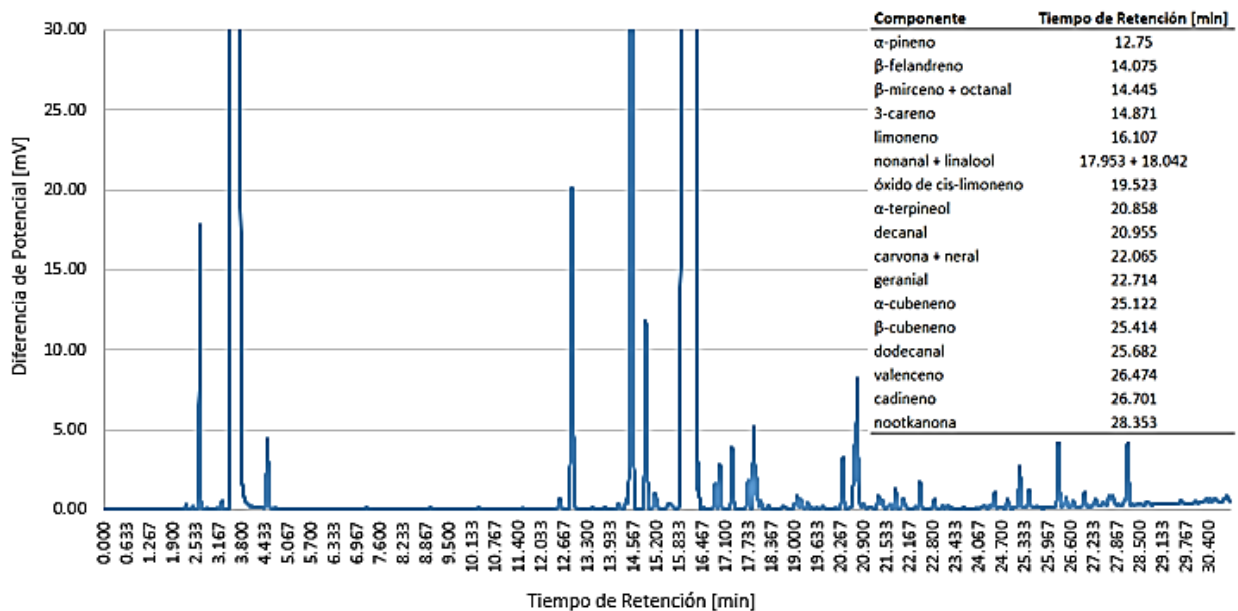


Figura 34. Cromatograma del producto con combinación de pectinasa-celulasa por 12 horas.

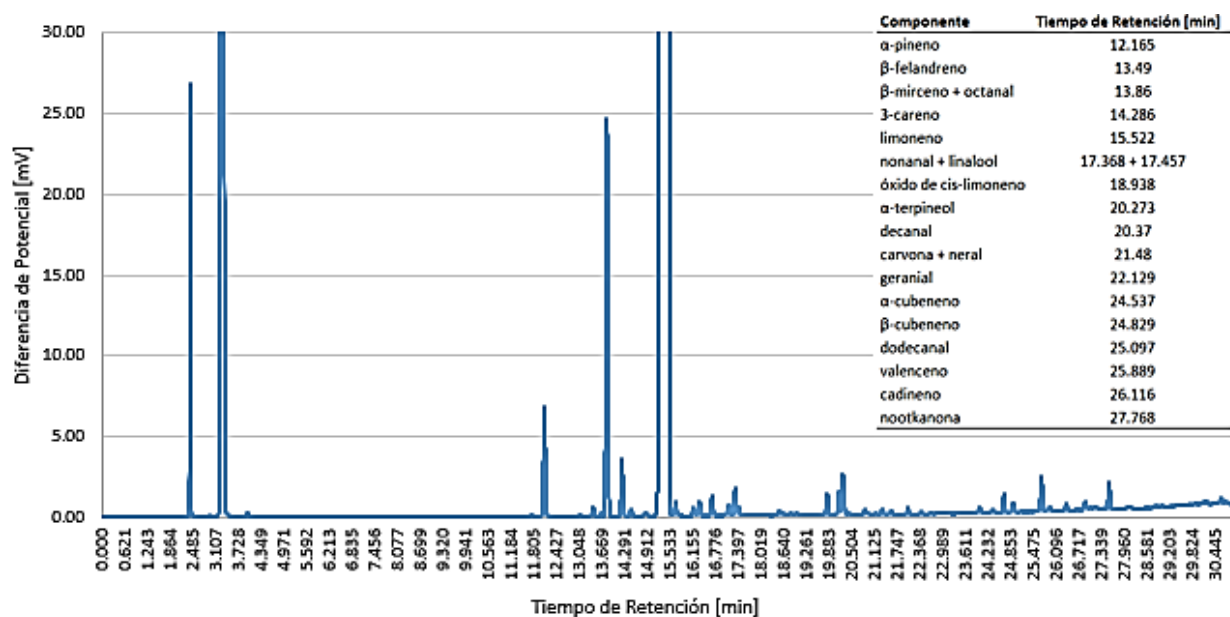


Figura 35. Cromatograma del producto con combinación de pectinasa-celulasa por 24 horas.

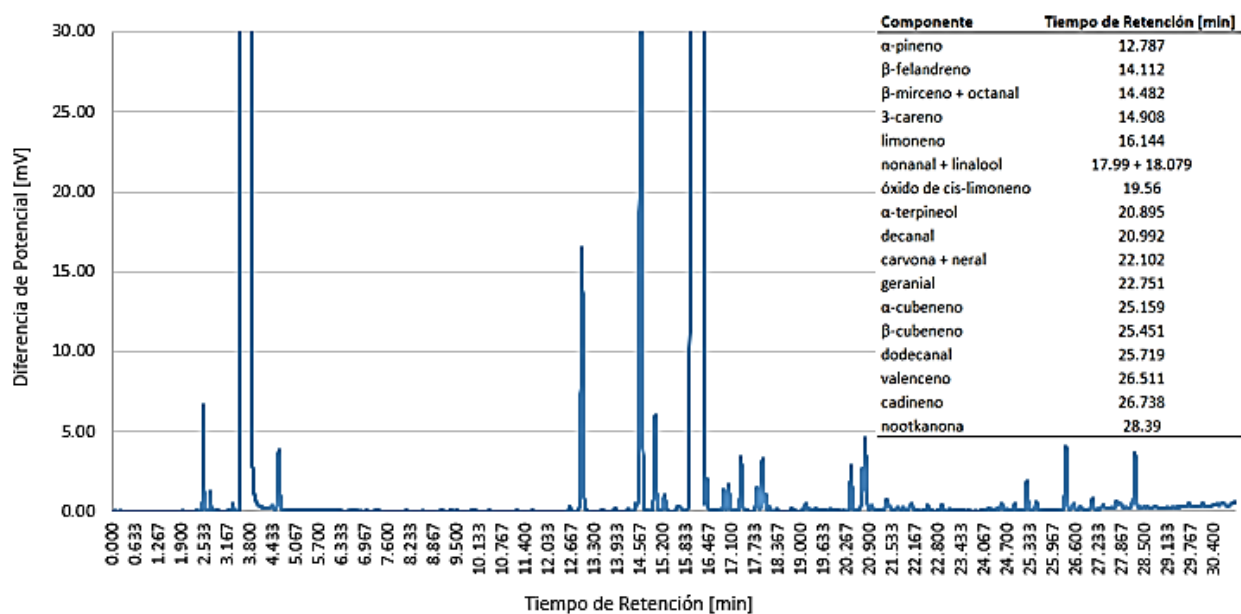


Figura 36. Cromatograma del producto con combinación de pectinasa-celulasa por 48 horas.

Es de hacerse notar que existen desfases en las lecturas de tiempo para las diferentes sustancias, generando un corrimiento en la escala de las abscisas, ocasionado por la activación manual de los botones de encendido del programa del horno y la activación del sistema de adquisición de datos. Para el limoneno una medida de estos corrimientos nos lo da la desviación estándar que es de 0.401 min con una media aritmética de 16.14 min, con lo cual se obtiene un coeficiente de variación de 0.0249. Estas diferencias en los resultados no tienen una causa claramente identificable y si se le puede atribuir a la incertidumbre usual en los datos experimentales.

En la Tabla 17. Se presenta el valor máximo de diferencia de potencial del D-limoneno (mV) y el porcentaje del D-limoneno en aceite esencial de cada uno de los cromatogramas obtenidos y que corresponden a las Figuras de la 25 a la 36.

Tabla 17. Resultados de la composición del aceite esencial.

Métodos de Obtención	Tiempo de Retención del D-limoneno (min)	Valor Máximo de Diferencia de Potencial del D-limoneno (mV)	Porcentaje del D-limoneno en Aceite Esencial (%)
Hidrodestilación	16.82	1249.00	83.15
Ultrasonido de Inmersión 20 minutos	15.45	681.43	91.65
Ultrasonido de Inmersión 40 minutos	16.34	779.44	92.24
Ultrasonido de Inmersión 60 minutos	16.50	762.87	91.95
Ultrasonido de Inmersión con 2° tipo de molienda y adición de agua 60 minutos	16.28	868.28	92.94
Ultrasonido Homogeneizador de Tejidos 20 minutos	15.68	752.24	92.93
Ultrasonido Homogeneizador de Tejidos 40 minutos	16.12	908.46	92.77
Ultrasonido Homogeneizador de Tejidos 60 minutos	16.17	956.12	92.15
Enzimas: Pectinasa-Celulasa 6 horas	16.27	946.77	91.77
Enzimas: Pectinasa-Celulasa 12 horas	16.11	1011.74	92.04
Enzimas: Pectinasa-Celulasa 24 horas	15.52	540.42	83.27
Enzimas: Pectinasa-Celulasa 48 horas	16.14	855.53	92.26

8. Discusión de resultados.

En el caso de obtención de aceite esencial utilizando los procedimientos con equipo de ultrasonido y para conocer las mejores condiciones en la extracción de aceite a partir de la cáscara de toronja, se deben considerar entre otros factores: el tiempo, la potencia, la relación de materia prima con el medio en el que se encuentra y el número de extracciones realizadas durante el proceso.

El rendimiento para el aceite esencial que se obtuvo en los experimentos de ultrasonido de inmersión se detectó como máximo cuando se tenían lecturas cercanas en los 20 minutos ($13.75 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$). Se observa que 20 minutos después se había reducido la cantidad producida en 19.04 %; en los siguientes 20 minutos la reducción alcanzó el 32.16 %.

Los tiempos de extracción generaron, para el proceso en donde se utilizó un homogeneizador de tejidos, el mayor rendimiento alrededor de los 40 minutos con $25.74 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$, mientras que 20 minutos después este valor se había reducido en un 17.85 %.

Como los experimentos llevados a cabo no se hicieron para periodos más pequeños, sólo se puede intuir que para el caso del ultrasonido de inmersión el tiempo óptimo se encuentra entre 0 y 30 minutos y probablemente cercano a 20 (Figura 20). Para el caso del homogeneizador de tejidos el tiempo óptimo de proceso se detectó entre 20 y 60 minutos, posiblemente cercano a 40 (Figura 21).

La detección más precisa del tiempo de proceso requiere de mayores datos, considerando intervalos más cortos de tratamiento con ultrasonido.

En el caso del primer factor se evaluaron 4 tiempos: 0, 20, 40 y 60 minutos a una temperatura inicial de 30 °C. Cabe señalar, que en la aplicación con tiempo de cero

minutos (control), no se utilizó la extracción asistida con ultrasonido, razón por la cual se señaló anteriormente como “No aplica”. En la Figura 20, se muestra que aparentemente desde el control hasta los 20 minutos ocurrió un incremento en materia recolectada y, luego, fue disminuyendo la razón de cambio conforme avanzaba el tiempo hasta alcanzar un rendimiento final de $9.33 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$. Tal percepción, sólo puede comprobarse definitivamente obteniendo lecturas en periodos más cortos, pues puede ocurrir que el máximo se encuentre al lado derecho o izquierdo del dato correspondiente al que sí se obtuvo. El experimento realizado a los 20 minutos fue donde se extrajo la mayor cantidad de aceite esencial con un peso de 1.36 g y con un rendimiento respecto a la base seca de $13.75 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$. El mismo fenómeno ocurrió al experimentar con el homogeneizador de tejidos, solamente que a los 20 minutos se extrajo 2.06 g de producto con un rendimiento respecto a la base seca de $20.76 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$. Sin embargo, es necesario remarcar que a los 40 minutos fue donde se obtuvieron los mejores resultados entre los diferentes tiempos propuestos con un peso de 2.55 g de aceite esencial y un rendimiento con base seca que ronda los $25.74 \times 10^{-3} \frac{g AE}{g MPS}$ (Figura 21).

Esta diferencia en la productividad con los distintos tiempos de aplicación de ultrasonido se presume que es debido al fenómeno de la cavitación, el cual después de determinado tiempo empieza a disminuir el contenido de aceite esencial, ocurriendo una degradación del material. El fenómeno de cavitación ocurre en aquellas zonas sometidas a presiones de alta amplitud que varían de manera rápida, dando como resultado burbujas que implosionan de manera tan abrasiva y poderosa que logran romper los tejidos celulares de la materia prima, pero si se sobrepasa un límite de tiempo estas burbujas también destruyen el aceite esencial que se encuentra en el medio líquido (Robles-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012).

En el ultrasonido de inmersión se mantuvo una frecuencia de 40 kHz y en el homogeneizador de tejidos una frecuencia de 20 kHz con 4 A. En ambos equipos la potencia se mantuvo constante, por lo cual no se puede en este trabajo deducir si tiene

influencia en los resultados. Sería materia de una ampliación de trabajo determinar los rendimientos variando las potencias.

Dos de las modificaciones que se introdujeron en parte de la experimentación consistieron en realizar la molienda de la cáscara de toronja (300 g) con una licuadora de cocina que produjo un menor tamaño de partícula y se suspendieron 250 mL de agua adicionales, con lo cual se obtuvo mayor cantidad de aceite esencial que en los otros casos. La información obtenida aparece anteriormente en este trabajo.

La molienda que produce un menor tamaño de partícula en realidad genera mayor superficie de contacto, lo cual favorece la extracción. Aquí sería aplicable la Ley de Fick, que considera que la transferencia de masa es proporcional al área en que se lleva a cabo.

También influye el que se obtengan mayores cantidades de producto, el paso del aceite esencial a la otra fase líquida, cuando esta última ha capturado una menor proporción de aceite, es decir, que al tenerse mayor cantidad de agua la concentración de aceite en la mezcla heterogénea es menor y el gradiente de concentraciones es mayor lo que favorece el paso del aceite esencial a la fase líquida.

Por exceder a los fines del trabajo, no se hicieron los experimentos enfocados a determinar si existe interacción (efecto sinérgico) entre el tamaño de partícula y el volumen de la segunda fase líquida, para lo cual se requeriría contar con mayores datos y realizar un análisis factorial.

El producto que se obtuvo del ultrasonido de inmersión y del homogeneizador de tejidos se sometió a un proceso de hidrodestilación durante una hora. Aunque los rendimientos variaban dependiendo del equipo y del tiempo de ultrasonido si se puede observar que alrededor de los 30 minutos de hidrodestilación se obtenía una cantidad de aceite que no aumentaba, con lo cual se consideró sensiblemente agotada la extracción.

Para el caso de obtención de aceite esencial con la utilización de enzimas se consideraron: el tiempo, la temperatura y el pH del medio, así como la intensidad de agitación.

En este trabajo se utilizó una solución de enzima pectinasa y de celulasa, que para prepararla se utilizó una proporción de uno a uno mililitros para cada una. Las soluciones de estas enzimas ya vienen preparadas de forma que cada mililitro de solución de pectinasa equivale cuando menos a 3,000 unidades de actividad enzimática y en la solución de celulasa cada mililitro equivale a 1,150 unidades de actividad enzimática.

En la Figura 23, se hace una presentación de las distintas masas producidas en función del tiempo de incubación. En ella se puede apreciar que la rapidez de generación de aceite esencial es mayor al inicio de la reacción y que paulatinamente va decreciendo de forma lineal hasta que alrededor de las 25 horas se presenta una pendiente cercana a cero.

La hidrodestilación del producto con la reacción con enzimas se mantuvo hasta que pudo apreciarse que no aportaba sensiblemente mayor producto, lo que ocurrió alrededor de las 2 horas. Es de hacerse notar que como la reacción con enzimas dio mucho mayor producto, es lógico que se requiera mayor tiempo de hidrodestilación. En el caso del proceso de obtención con ultrasonido de inmersión se obtuvo alrededor de un gramo de aceite esencial; en el caso que se utilizó el homogeneizador de tejidos el producto fue de 2.5 gramos aproximadamente, mientras que para la reacción con enzimas se obtuvieron cerca de 4.8 gramos de aceite. Para el procedimiento en el cual se redujo en la licuadora el tamaño de las partículas de cáscara de toronja, el producto fue de 3.6 gramos.

Con respecto a las purzas de los productos se puede decir que, en lo general se obtienen purzas cercanas al 92.0 % de D-limoneno, a excepción de los casos de la hidrodestilación sin ningún pretratamiento en el cual se obtiene 83.15%, y del proceso de utilización de enzimas a 24 horas en el cual aparece una composición de 83.27 %.

En la primera de las excepciones resulta lógico el porcentaje obtenido, dado que no se utilizó técnica alguna dirigida en enriquecer el producto, lo que si se intentó en los otros procedimientos. Respecto a la segunda excepción, la única explicación que se puede argumentar es que existe un error experimental, dado que no es lógico que a las 12 horas exista una concentración, que a las 24 horas disminuya y que a las 48 horas se recupere de los niveles tenidos a las 12 horas.

9. Conclusiones y recomendaciones.

Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos con ultrasonido o con enzimas hidrolíticas incrementan claramente los rendimientos de extracción de aceite esencial en relación a controles sin tratamiento. Debe sin embargo en un posterior trabajo optimizarse la determinación del tamaño de partícula que se debe de obtener de la molienda para buscar los mejores resultados en la obtención de aceite esencial.

El trabajo no exploró los resultados a distintas amplitudes en el homogeneizador de tejidos con lo cual también se podían obtener resultados para la optimización del proceso.

Aparentemente la producción de aceite esencial de toronja presenta mejores resultados de producción para cuando el proceso se lleva a cabo con soluciones de enzimas, pero como en la determinación de los procesos que son viables económicamente se deben de estudiar los costos, se deja la determinación del mejor proceso a un posterior estudio, haciendo la aclaración de que en el supuesto mejor proceso se tiene un inconveniente muy importante en que las enzimas tienen costos elevados a razón de aproximadamente \$ 670 MXP por mililitro.

De lo que se informa en el trabajo se deduce que los resultados no se puedan considerar concluyentes porque faltaría realizar las réplicas de los experimentos necesarios para disminuir la probabilidad de error y darles mayor validez estadística a los resultados.

También se deja para un trabajo posterior el aumentar las particiones en los intervalos de tiempo de duración del proceso para hacer una determinación más precisa del tiempo en el que se obtiene el rendimiento óptimo.

Una continuación lógica del trabajo sería realizar una estimación de los costos de producción a nivel industrial porque todo está regido por normas económicas que pueden hacer útil o desechable el proceso. A fin de cuentas, lo que se investiga en relación con estos temas tiene una clarísima implicación económica que es la que determina si un método es viable a nivel industrial.

10. Referencias.

- Alejandro-Santillán, J., & Camposano-Rodríguez, Y. (2021). *Efecto de pH, temperatura y celulosa en la obtención de glucosa por hidrólisis enzimática de residuos sólidos orgánicos pretratados*. Facultad de Ingeniería Química. Huancayo, Perú: Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Banco de México. (Enero de 2022). *Sistema de Información Económica*. Obtenido de <https://www.banxico.org.mx/SieInternet/consultarDirectorioInternetAction.do?accion=consultarCuadro&idCuadro=CE37§or=1&locale=es>
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *Trends in Analytical Chemistry*, 248-263.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Nutrizio, M., Jambrak, A., Munekata, P., . . . Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 2325-2349.
- Chemat, F., Huma, Z.-e., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*., 813-835.
- Chen, R., Li, Y., Dong, H., Liu, Z., Li, S., Yang, S., & Li, X. (2012). Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum Caudatum* Ait and evaluation of its biological activities. *Ultrasonics Sonochemistry*., 1160-1168.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud. (2021). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 3.0*. Ciudad de México, México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- Corzo, A. (Mayo de 2019). Técnicas de análisis en Química Orgánica Cromatografía. *Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero*, 1-53.
- García-Ulloa, N., & Cely, N. (2020). *Evaluación de la Actividad Enzimática de Pectinasa obtenida de la Pulpa de Guanábana (Annona Muricata L.) y Chirimoya (Annona cherimola L.) y su Aplicación en la Extracción de Jugo*. Escuela de Ciencias

- Básicas, Tecnología e Ingeniería. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Guzmán-Castillo, A. (2017). *Identificación de Parámetros Operacionales para la Obtención de Aceites Esenciales a partir de la Destilación por Arrastre de Vapor de Residuos Cítricos en un Reactor por Lotes*. México: Tesis; Facultad de Química, UNAM.
- International ISO-3053. (2004). Oil of grapefruit (*Citrus x paradise Macfad*), obtained by expression. *Second edition*.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A., Georgiev, E., & Damianova, S. (2005). Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds from Bulgaria that had been stored for up to 36 years. *International Journal of Food Science & Technology*., 305-310.
- Martínez, A. (Febrero de 2003). Aceites Esenciales. *Facultad Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia*, 1-34.
- Martínez-Alcántara, B., Tadeo, F., Mesejo, C., Martínez-Cuenca, M., Ruiz, M., Reig, C., . . . Primo-Millo, E. (2015). *Anatomía de los Cítricos*. (E. Primo-Millo, & M. Agustí, Edits.) Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Martínez-Martínez, R., Ortega-Cerrilla, M., Herrera-Haro, J., Kawas-Garza, J., Zárate-Ramos, J., & Soriano-Robles, R. (11 de Noviembre de 2015). Uso de Aceites Esenciales en Animales de Granja. *Interciencia*, 40(11), 744-750.
- Mathers, R., McMahon, K., Damodaran, K., Retarides, C., & Kelley, D. (1 de Diciembre de 2006). Ring-Opening Metathesis Polymerizations ind-Limonene: A Renewable Polymerization Solvent and Chain Transfer Agent for the Synthesis of Alkene Macromonomers. *Macromolecules*, 8982-8986.
- Novozymes Corp. (7 de Febrero de 2023A). *APPLICATION SHEET*. Obtenido de Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf>
- Novozymes Corp. (27 de Febrero de 2023B). *Sigma-Aldrich Company*. Obtenido de Merck Group: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/specification-sheet/SIGMA/P2736>

- Novozymes Corp. (27 de Febrero de 2023C). *Sigma-Aldrich Company*. Obtenido de Merck Group: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/sae0020>
- Pérez-Faggiani, E., Lombardo, P., Umpiérrez, N., Minteguiaga, M., Alves, P., Blanco, O., . . . Dellacassa, E. (Marzo de 2015). Fungicidas Botánicos Aceites esenciales de plantas nativas que controlan enfermedades de poscosecha de los cítricos. (Á. Roel, Ed.) *Revista INIA Uruguay*, 52-56.
- Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., & Chemat, F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, 41-47.
- Ramírez-Ramírez, J., & Ayala-Aceves, M. (1 de Diciembre de 2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*, XV(12), 1-13.
- Robles-Ozuna, L., & Ochoa-Martínez, L. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Rojas, J., Perea, A., & Stashenko, E. (2009). Obtención de Aceites Esenciales y Pectinas a Partir de Subproductos de Jugos Cítricos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16, 110-115.
- Secretaría de Economía. (2022). *SIAMI 5.0*. Obtenido de <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). *Panorama Agroalimentario 2021*. Ciudad de México, México: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Stashenko, E. (2018). Del laboratorio al campo: el desarrollo y perspectivas de la industria de aceites esenciales en Colombia. *Research Center for Biomolecules*, 1-15.
- Treybal, R. (2000). *Operaciones de Transferencia de Masa*. (Segunda ed.). Ciudad de México, México: McGraw-Hill.
- Trujillo-Juárez, L., Hernández-Meléndez, Ó., & Bárzana-García, E. (2017A). *Proceso novedoso para la extracción de aceites esenciales de cítricos por extrusión en equipo de doble tornillo*. Ciudad de México: Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM.

- Trujillo-Juárez, L., Hernández-Meléndez, Ó., & Bárzana-García, E. (2017B). Rendimiento de extracción de aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi*) en un reactor termomecano-químico, en función del tiempo de cosecha. *Presentación oral QPNT-P2-O. 52° Congreso Mexicano de Química*.
- Véliz-Jaime, M., González-Díaz, Y., & Martínez-Despaigne, Y. (2019). Evaluación técnica y económica del proyecto de obtención de aceites esenciales. *Tecnología Química*, 208-220.
- VEVAV3X S.L. (27 de 02 de 2023). *Citrus & Life*. Obtenido de <https://citrusandlife.com/es/content/10-las-partes-de-los-citricos>
- Xu, Y., Zhang, L., Yang, Y., Song, X., & Yu, Z. (2015). Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant. *Carbohydrate Polymers.* , 895-902.

Anexo A.

Métodos cromatográficos.

La cromatografía, es una técnica o método físico de separación versátil ampliamente utilizado en un importante número de investigaciones para realizar la separación, identificación y cuantificación de diversos compuestos químicos o la caracterización de mezclas complejas. Se puede utilizar asociado a otras técnicas instrumentales de análisis (Corzo, 2019).

La separación llevada a cabo en la cromatografía se da por la influencia de efectos contrapuestos de retención y desplazamiento. El primero es producido sobre los componentes de la mezcla de una fase estacionaria, y que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido. El desplazamiento es ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico (Corzo, 2019).

Al fenómeno de migración de los componentes de una muestra impulsados por la fase móvil, a lo largo de la fase estacionaria, se le conoce como elución. La muestra se distribuye de manera diferente entre la fase móvil y la estacionaria. Los componentes que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria se desplazan lentamente con el flujo de la fase móvil y, por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se desplazan con rapidez junto con la fase móvil. Lo anterior da como consecuencia que los componentes se separan en bandas o manchas que pueden dar resultados cuantitativos o cualitativos (Corzo, 2019).

Tanto la fase estacionaria como la móvil presentan diferentes condiciones: la primera puede estar dispuesta sobre una superficie plana, o ser colocada en el interior de un tubo cilíndrico de vidrio o de acero inoxidable y la segunda puede ser un gas, un líquido o un fluido “supercrítico” (Corzo, 2019).

Tomando como referencia lo dicho anteriormente las técnicas cromatográficas se clasifican en: Cromatografía de gases, Cromatografía líquida y Cromatografía supercrítica. Según el estado físico de ambas fases y el mecanismo que rige la separación, se clasifican en: Cromatografía Líquido-Sólido, Cromatografía Líquido-Líquido, Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, y Cromatografía de gases, que a su vez se divide en Cromatografía Gas-Líquido y Cromatografía Gas-Sólido (Corzo, 2019).

En la cromatografía de gases, que es el método empleado en este trabajo, podemos observar que la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido (cromatografía gas-líquido). En la primera de estas, el proceso de separación se realiza por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que entre otros puede ser alúmina, sílice gel y carbón. *En la cromatografía gas- líquido*, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílice, vidrio, etc. y el gas que transporta al soluto (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

Parte del proceso es que cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, esta se volatiliza por la elevada temperatura y es así como de esta manera es movida por el gas transportador a lo largo de la columna, en la cual se distribuye entre las fases sólida y líquida. Este proceso de partición o reparto entre ambas fases está definido por factor de capacidad (k'), De acuerdo con la necesidad y característica del análisis es que se selecciona el gas (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaría de Salud, 2021).

Anexo B.

Cálculos realizados para la preparación de la solución amortiguadora.

$$C_t = 0.5 M$$

$$pH = 5$$

Ecuación 1:

$$pH = pK_a + \log \frac{|A^-|}{|HA|}$$

$$5 = 4.75 + \log \frac{|A^-|}{|HA|}$$

$$\log \frac{|A^-|}{|HA|} = 5 - 4.75$$

$$\log \frac{|A^-|}{|HA|} = 0.25$$

$$\frac{|A^-|}{|HA|} = 10^{0.25}$$

$$|A^-| = |HA|10^{0.25}$$

Ecuación 2:

$$|HA| + |A^-| = 0.5 M$$

$$|HA| = 0.5 M - |A^-|$$

Sustituimos la ecuación 2 en la ecuación 1:

$$|A^-| = (0.5 - |A^-|)10^{0.25}$$

$$|A^-| = 10^{0.25}(0.5 M) - |A^-|10^{0.25}$$

$$|A^-| + |A^-|10^{0.25} = 10^{0.25}(0.5 M)$$

$$2.7783|A^-| = 0.8891 M$$

$$|A^-| = \frac{0.8891 M}{2.7783}$$

$$|A^-| = 0.32 M$$

$$|HA| = 0.5 M - 0.32 M$$

$$|HA| = 0.18 M$$