

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**«APLICACIÓN DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN POR
HIDRODESTILACIÓN Y MICROONDAS DE ACEITE ESENCIAL
DE CÁSCARA DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia*)»**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

MILAGROS JANETH GUILLÉN CAÑAVI

LIMA – PERÚ

2022

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**«APLICACIÓN DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN POR
HIDRODESTILACIÓN Y MICROONDAS DE ACEITE ESENCIAL
DE CÁSCARA DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia*)»**

Presentado por:

MILAGROS JANETH GUILLÉN CAÑAVI

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Dr. Edwin O. Baldeón Chamorro
PRESIDENTE

Mg.Sc.Mirtha P. Martinez Tapia
MIEMBRO

Dr. Christian R. Encina Zelada
MIEMBRO

Mg.Sc.Beatriz A. Hatta Sakoda
ASESORA

Ing. Nataly Y. Sanchez Torres
CO - ASESORA

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A Dios, quien guía mi camino día a día y me da la fortaleza para seguir adelante.

A mis padres, por ser mi apoyo e impulsarme para cumplir mis metas.

A mis hermanas por estar siempre presentes, acompañándome a lo largo de esta etapa.

A Mateo, el pequeño de la casa quien nos da alegría.

AGRADECIMIENTO

- A Dios, mis padres y mis hermanas, quienes formaron parte importante en la realización de este proyecto.
- A mi Asesora, por su apoyo y guía para la realización de la presente tesis.
- A la Ing. Nataly Sánchez, por su constante apoyo, motivación y paciencia en cada etapa de esta investigación.
- Al profesor Oscar Crisóstomo por su disposición, apoyo incondicional y orientación en el uso del software.
- A mis mejores amigas de la Universidad: Solange, Cynthia, Luz, Pamela, Shessira, Kelly y Amanda por estar presentes, por su amistad y por sus palabras de ánimo cuando lo necesitaba.
- A mi alma mater UNALM, por darme la dicha de ejercer esta carrera tan bonita.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 GENERALIDADES SOBRE LOS CÍTRICOS.....	3
2.1.1 ASPECTOS GENERALES	3
2.1.2 LIMÓN.....	4
2.1.3 LIMÓN SUTIL.....	4
2.1.4 PRODUCCIÓN NACIONAL DEL LIMÓN SUTIL EN EL PERÚ.....	7
2.1.5. EXPORTACIÓN DEL LIMÓN SUTIL.....	13
2.1.6. PROCESAMIENTO DEL LIMÓN Y DESECHOS QUE SE GENERAN	14
2.2. ACEITE ESENCIAL.....	14
2.2.1. ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN	15
2.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN	15
2.2.3. PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	16
2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	19
2.3.1. MÉTODOS CONVENCIONALES DE EXTRACCIÓN	19
2.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN NO CONVENCIONALES	21
2.4. SONICACIÓN	23
2.5. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	24
2.6. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	25
2.6.1. DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS:	25
III. METODOLOGÍA	27
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	27
3.2. MATERIA PRIMA.....	27
3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	27
3.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO	27

3.3.3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS	28
3.4. MÉTODOS.....	28
3.4.1. ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS.....	28
3.4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30
3.4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZANDO LA METODOLOGA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	32
3.4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DEL PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO EN EL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN.....	34
4.1.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	40
4.1.2 EFECTO DEL TIEMPO	40
4.1.3 EFECTO DE LA INTERACCIÓN TEMPERATURA Y TIEMPO.....	41
4.2 MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO	41
4.3 COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN (<i>Citrus aurantifolia</i>)	43
4.4 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO SOBRE LAS CARACTERISTICAS FISICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL.....	45
4.5 EFECTO DEL PRETRAMIENTO ULTRASÓNICO SOBRE EL PRINCIPAL COMPONENTE QUÍMICO (D-LIMONENO) DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN .	48
V. CONCLUSIONES	52
VI. RECOMENDACIONES.....	54
VII. BIBLIOGRAFÍA	55
VIII. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valor nutricional en 100g de sustancia comestible de limón.....	7
Tabla 2: Contenido de sustancias nutritivas en 100 gramos de limón.....	8
Tabla 3: Producción nacional de limón de los principales centros de producción: Lambayeque, Piura y Tumbes (2017 – 2018)	12
Tabla 4: Exportación del limón Sutil.....	13
Tabla 5: Factores y niveles para el método de superficie de respuesta	32
Tabla 6: Arreglo factorial de tratamientos por el método de superficie de respuesta	33
Tabla 7: Resultados del rendimiento de la extracción de aceite esencial de cáscara de limón aplicando un pretratamiento ultrasónico.....	35
Tabla 8: Cuadro de restricciones para la Maximización, obtenido por la metodología de superficie de respuesta (RSM).....	42
Tabla 9: Comparación del rendimiento de aceite esencial respecto al método tradicional de extracción (clevenger)	43
Tabla 10: Características físicoquímicas del aceite esencial de cáscara de limón	45
Tabla 11: Contenido de D-Limoneno en el aceite esencial de limón sutil extraído por microondas más ultrasonido.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arbusto del Limón Sutil (<i>Citrus aurantifolia</i>) mostrando, las hojas, ramas y frutos	5
Figura 2. Producción nacional del limón (1997 – 2016).....	8
Figura 3. Superficie cosechada y rendimiento del limón (1997 – 2016).....	9
Figura 4. Producción de limón en Lambayeque (2017-2018).....	11
Figura 5. Producción de limón en Piura (2017-2018).....	11
Figura 6. Producción de limón en Tumbes (2017-2018).....	12
Figura 7. Esquema de un sistema de CG-EM capilar típico.....	26
Figura 8. Flujo de operaciones para la extracción de aceite esencial de cáscara de limón por el método de extracción asistida por microondas	30
Figura 9. Rendimiento de extracción experimental frente al rendimiento de extracción previsto en condiciones de extracción óptima.....	37
Figura 10. Representación gráfica del rendimiento de aceite esencial mediante la superficie de respuesta 3D y 2D.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) – RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN POR TRATAMIENTO.....	65
ANEXO 2: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO POLINOMIAL DETERMINADO A PARTIR DE DCC PARA LOS RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN.....	66
ANEXO 3: MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO.....	67
ANEXO 4: RESUMEN ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA T-STUDENT PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS (STATGRAPHICS)	68
ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	69
ANEXO 6: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS CON UN PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO.....	71
ANEXO 7: CROMATOGRAMA GC – MS PARA EL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS CON UN PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO.....	72
ANEXO 8: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS	73
ANEXO 9: PORCENTAJE DE LIMONENO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS .	74
ANEXO 10: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN (CLEVENGER).....	75
ANEXO 11: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN (CLEVENGER).....	76
ANEXO 12: FIGURA CROMATOGRÁFICA GC – MS PARA EL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÈTOD0 CLEVenger.....	77
ANEXO 13: FOTOGRAFÍAS	78

RESUMEN

El presente trabajo se centró en la aplicación del ultrasonido como tratamiento previo a la extracción asistida por microondas del aceite esencial de cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*). Se determinó los parámetros de temperatura y tiempo de ultrasonido que maximizaron el rendimiento en la extracción del aceite esencial de limón aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) mediante el Software Design Expert® DX7Trial/dX7 con un Diseño Central Compuesto. Los rangos de las variables independientes examinadas (factores), fueron identificados por pruebas preliminares y por especificaciones técnicas del equipo ultrasónico; el tiempo de ultrasonido evaluado fue de 1 min a 35 min y la temperatura de ultrasonido fue de 22 °C a 43 °C. Seguido al pretratamiento se extrajo el aceite esencial con el equipo Mycroware Gravity Station a una potencia de 720 W por un tiempo de 15 minutos. Mediante la metodología de superficie de respuesta se obtuvo 11 tratamientos (tres repeticiones del punto central), los cuales se ajustaron a una ecuación polinómica de tercer orden, los resultados mostraron que el tiempo y temperatura de ultrasonido tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en el rendimiento del aceite esencial. Se determinó que a una temperatura de 25 °C y un tiempo de 22 minutos de ultrasonido se obtuvo el mayor rendimiento de aceite esencial que fue de 2.56 por ciento (base seca). El rendimiento, así como las propiedades fisicoquímicas se compararon con un patrón (extracción solo por microondas sin ningún pretratamiento) (1.83 por ciento), y la extracción por el método convencional de hidrodestilación (1.92 por ciento). La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) se utilizó para identificar los compuestos del aceite esencial obtenido por microondas con pretratamiento de ultrasonido. Se obtuvo 51.82 por ciento de limoneno, compuesto más abundante en el aceite esencial de cítricos.

Palabras Claves: Limón Sutil, aceite esencial, ultrasonido, extracción asistida por microondas.

ABSTRACT

The present work focused on the application of ultrasound as a treatment prior to the microwave-assisted extraction of the essential oil of lemon peel (*Citrus aurantifolia*). The ultrasound temperature and time parameters that maximized the performance in the extraction of lemon essential oil were determined by applying the Response Surface Methodology (RSM) using the Design Expert® DX7Trial / dX7 Software with a Composite Central Design. The ranges of the independent variables examined (factors) were identified by preliminary tests and by technical specifications of the ultrasonic equipment; the evaluated ultrasound time was from 1 min to 35 min and the ultrasound temperature was from 22°C to 43°C. Following the pretreatment, the essential oil was extracted with the Mycroware Gravity Station equipment at a power of 720 W for a period of 15 minutes. Through the response surface methodology, 11 treatments were obtained (three repetitions of the central point), which were adjusted to a third order polynomial equation, the results showed that the ultrasound time and temperature had a significant effect ($p < 0.05$) in essential oil yield. It was determined that at a temperature of 25 ° C and a time of 22 minutes of ultrasound, the highest yield of essential oil was obtained, which was 2.56 percent (dry basis). The yield, as well as the physicochemical properties were compared with a standard (extraction only by microwaves without any pretreatment) (1.83 percent), and extraction by the conventional hydrodistillation method (1.92 percent). Gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) was used to identify the essential oil compounds obtained by microwaves with ultrasound pretreatment. 51.82 percent of limonene was obtained, the most abundant compound in citrus essential oil.

Key words: Sutil lemon, essential oil, ultrasound, Microwave assisted extraction

I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos en todo su contexto constituyen un género de plantas rico en contenido de fenoles y flavonoides, metabolitos secundarios que debido a su efecto antioxidante y baja toxicidad, han recibido en los últimos años mucha atención como potenciales fármacos (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

El limón es el fruto en baya del limonero, árbol de hoja perenne y espinoso de la familia de las rutáceas. Del limón no sólo se aprovechan los jugos, también se puede obtener aceites esenciales de la cáscara, los cuales son considerados uno de los ingredientes básicos en la industria de la perfumería, de los alimentos, la agronomía y la farmacéutica (Cerutti y Neumayer, 2004).

El procesamiento del limón sutil en productos tales como jugos y conservas genera grandes cantidades de desechos en el Perú (20 por ciento de la producción), siendo un aproximado de 18 mil toneladas al año (León, 2016). Siendo este un gran potencial para el aprovechamiento en la extracción de aceite esencial, generando de esta manera un valor agregado a un producto de desecho.

Existen diferentes tecnologías para extraer aceites esenciales, sin embargo, los métodos convencionales han demostrado inconvenientes, incluyendo el tiempo largo de extracción, la degradación de los componentes térmicamente sensibles, el potencial de pérdida de los componentes volátiles y el alto consumo de energía. Por lo tanto, hay una necesidad de investigar técnicas alternativas para evitar los problemas antes mencionados con las técnicas convencionales (Damyeh *et al.*, 2016).

Asimismo, diversas investigaciones demuestran que la composición de los aceites esenciales puede variar de acuerdo con el método de extracción utilizado, de ahí la importancia de investigar métodos nuevos y/o alternativos para la obtención de aceites esenciales. Una tecnología nueva para la extracción de aceites esenciales es la extracción asistida por microondas que permite una extracción eficiente y rápida (Peredo – Luna *et al.*, 2009).

Por otro lado, el ultrasonido es una tecnología emergente que recientemente ha sido estudiada para propósitos de inactivación microbiana y enzimática, pero que durante años ha sido objeto de investigación en la industria de alimentos, especialmente, en el tema de control de calidad. Se considera una tecnología promisoría como pretratamiento para la obtención de aceite esencial disminuyendo el consumo de disolvente, acortando el tiempo de extracción y mejorando la calidad del aceite esencial (Robles y Ochoa, 2012).

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto del ultrasonido como pretratamiento en el rendimiento y en las características fisicoquímicas del aceite esencial de cáscara de limón extraído por el método de extracción asistida por microondas.

Para ello se tuvo como objetivos específicos:

- Determinar el tiempo de ultrasonido que maximiza el rendimiento de aceite esencial de cáscara de limón extraído por microondas.
- Determinar la Temperatura de ultrasonido que maximiza el rendimiento del aceite esencial de cáscara de limón extraído por microondas.
- Comparar el rendimiento, características fisicoquímicas y porcentaje de limoneno del aceite esencial extraído por microondas con un pretratamiento de ultrasonido con el aceite esencial extraído por el método convencional (clevenger).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE LOS CÍTRICOS

2.1.1 ASPECTOS GENERALES

Según Domínguez (2014) citado por Lihua (2018), la palabra cítricos se designa habitualmente a los árboles frutales que producen frutos ácidos, como el naranjo, el limón, el mandarino, el pomelo y otros. De las 124 especies de cítricos pertenecientes a la Familia Rutáceas, tan sólo 16 son las que forman el género Citrus, que junto con las 4 del género Fortunella (Kumquats) son las especies de cítricos cultivados de interés comercial.

Hace más de 4000 años se cultivan los cítricos, sus frutos al parecer atrajeron la atención de los pobladores primitivos, quienes se encargaron de cultivarlos mucho tiempo antes de que aparecieran en los países europeos a donde fueron llevados por los primeros viajeros gracias a la cautivante apariencia de su fruta y sus flores. Las numerosas especies del género Citrus provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia (incluyendo el este de Arabia, este de Filipinas y desde el Himalaya al sur hasta Indonesia) y del archipiélago Malayo (Guerrero *et al.*, 2012).

Los cítricos desempeñan un papel destacado en la alimentación de muchas personas en el mundo entero. Una característica del género es la presencia, en todos los órganos de la planta de un aceite esencial que le da su olor característico. Las especies que engloba este grupo proporcionan notables cantidades de vitamina C, y minerales (calcio y fósforo) (OEIDRUS, 2010).

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase dicotiledónea, a la orden rutae, a la familia rutaceae y al género citrus, cuentan con más de 145 especies, entre las que se destacan naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limón*), lima

(*Citrus aurantifolia*), y toronja (*Citrus paradisi*) (OEIDRUS, 2010).

2.1.2 LIMÓN

El limón es un árbol frutal perteneciente al género de los cítricos, para ser más exactos pertenece a la familia de las rutáceas y es una especie híbrida. El árbol del limón de 5 metros de altura, y tronco habitualmente torcido, se ramifica densamente desde abajo, produciendo diversas variedades de limones en el mundo. El color de sus frutos, la forma, acidez y los periodos de madurez son los que diferencian a cada especie (Martínez, 2013).

Según su tamaño, los limones se pueden clasificar en: pequeños, medianos y grandes; y por su color en verdes y amarillos (Martínez, 2013).

En el Perú el cultivo del limón es permanente, el cual se siembra y cosecha todo el año, principalmente en la zona norte del país. Las variedades que se producen son el limón Sutil y el limón Tahití, destacando el primero por su mayor volumen de producción (MINAGRI, 2017).

León (2016), menciona que aparte del limón sutil existe 2 variedades más que podrían tener oportunidad en el Mercado Americano y Europeo, las cuales son: Tahití y Eureka que se desarrollan en el norte y la costa central del Perú y existen alrededor de 60 hectáreas de plantaciones de cada uno.

2.1.3 LIMÓN SUTIL

El limón sutil es conocido por diferentes nombres como: lima ácida, lima gallega, limón ceutí, limón mexicano, limón peruano, limón criollo o limón de pica. Su nombre científico es "*Citrus aurantifolia*" (Guerrero *et al.*, 2012).

El limón sutil fue introducido en América desde los primeros viajes de Colón. Se caracteriza por ser un árbol pequeño o arbusto de 4 a 5 m de altura, con tronco a menudo torcido y ramas con espinas axilares cortas, hojas oblongo-ovales o elíptico-ovales de 2.5 a 9 cm de longitud y 1.5 a 5.5 cm de ancho. Base redondeada y ápice ligeramente recortado. Márgenes ligeramente crenulados. Pecíolos notablemente alados, flores blancas de 1.5 a 2.5 cm de

diámetro, fragantes, que se disponen en inflorescencias axilares de 1 a 7 flores. Frutos ovales o globosos con un ápice ligeramente deprimido, de color verde oscuro al principio pasando a verde amarillento o amarillo en la madurez (Figura 1). Mide 3.5 a 5 cm de diámetro o más. Su piel es delgada y se rompe fácilmente. La pulpa es verdosa, jugosa, muy ácida. Sus semillas son pequeñas, ovales y altamente poliembriónicas (producen dos o más plantas por semilla). (Sánchez, 2004 citado por Puente, 2006).



Figura 1. Arbusto del Limón Sutil (*Citrus aurantifolia*) mostrando, las hojas, ramas y frutos

FUENTE: Puente (2006)

a. CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICAS

A continuación, se muestra la descripción botánica descrito por Puente (2006).

Reino:	Vegetal
Clase:	Angiospermae
Subclase:	Dicotiledónea
Orden:	Rutae
Familia:	Rutaceae
Género:	Citrus
Subgénero:	Eucitrus

Especie: *Citrus aurantifolia*

Nombres comunes: Limón criollo, lima mexicana, lima ácida, lima chica, lima boba, limón chiquito, limón corriente, limón agria.

b. PARTES DEL LIMÓN

El limón está compuesto de 3 partes: flavedo o exocarpio, albedo o mesocarpio y endocarpio (Grünauer, 2009).

El flavedo o exocarpio, es una capa delgada que posee los pigmentos que cambian de color durante la maduración de verde a amarillo, los aceites esenciales que se encuentran en esta parte del limón son los responsables de su aroma, debido a que contienen compuestos terpénicos.

El albedo es la parte blanca que contiene pectinas que le confieren firmeza a la corteza. El albedo tiende a degradarse por acción enzimática a medida que el fruto va madurando, por ello los cítricos se cosechan en estado inmaduro (verde) para obtener el mayor rendimiento y calidad de pectina.

El endocarpio está formado por la pulpa que contiene las vesículas con el jugo y se encuentra dividido por el séptum formando de 10-14 gajos y en ellos se encuentran las semillas, ubicadas alrededor del eje central y son 10 aproximadamente.

c. VALOR NUTRICIONAL

Los cítricos poseen un alto contenido de agua y bajo contenido de carbohidratos, de proteínas y de lípidos, pero son en general una buena fuente de vitaminas, azúcares y sales, especialmente la vitamina C, la cual se halla en la pulpa y en el zumo (Puente, 2006).

En la tabla 1 se detalla el valor nutricional y en la tabla 2 el contenido de sustancias nutritivas en 100 gramos de limón.

Tabla 1: Valor nutricional en 100g de sustancia comestible de limón

Sustancia	Contenido
Agua (g)	90.1
Proteínas (g)	1.1
Lípidos (g)	0.03
Carbohidratos (g)	8.2
Calorías (Kcal)	27
Vitamina A (U.I.)	20
Vitamina B1 (mg)	0.04
Vitamina B2 (mg)	0.02
Vitamina B6 (mg)	0.06
Ácido nicotínico (mg)	0.1
Ácido pantoténico (mg)	0.2

FUENTE: InfoAgro (2016)

2.1.4 PRODUCCIÓN NACIONAL DEL LIMÓN SUTIL EN EL PERÚ

Según el Informe Nacional de Limón del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2017), la producción nacional de limón en el Perú desde el año 1997 hasta el 2016 varía como se muestra en la Figura 2.

Como se puede observar, la producción del limón creció a un ritmo de 1.3 por ciento anual entre 1997 y 2016. Es así como, en 1997 se produjeron 327 mil toneladas (la mayor producción de los últimos 20 años) hasta que en el 2016 se alcanzó 270 mil toneladas. En estos 20 años en promedio se produjeron 231 mil toneladas anuales, a excepción del año 1997 (como se explicó anteriormente). Así también se observa que, en 1998, la producción disminuyó hasta alcanzar las 208 mil toneladas, como consecuencia del Fenómeno del Niño 1997-1998, el cual provocó la pérdida de tierras agrícolas. De igual modo los Fenómenos del Niño de 2004-2005 y del 2009-2010 afectaron la producción la cual llegó solamente hasta los 202 mil toneladas y 197 mil toneladas respectivamente (MINAGRI, 2017).

Tabla 2: Contenido de sustancias nutritivas en 100 gramos de limón

Sustancia	Contenido
Proteínas	0.9 gramos
Hidratos de Carbono	8.7 gramos
Calorías	44 gramos
Ácido Cítrico	7.50 gramos
Ácido Málico	0.60 gramos
Sacarosa	0.50 gramos
Azúcar Invertido	0.80 gramos
Citrato Cálculo	1.00 gramos
Hierro	Vestigios
Vitamina A	0 U.I.
Vitamina B1	0.4 mg.
Vitamina B2	Trazas
Vitamina B6	0.1 mg.
Vitamina C	45.0 mg

FUENTE: Puente (2006)

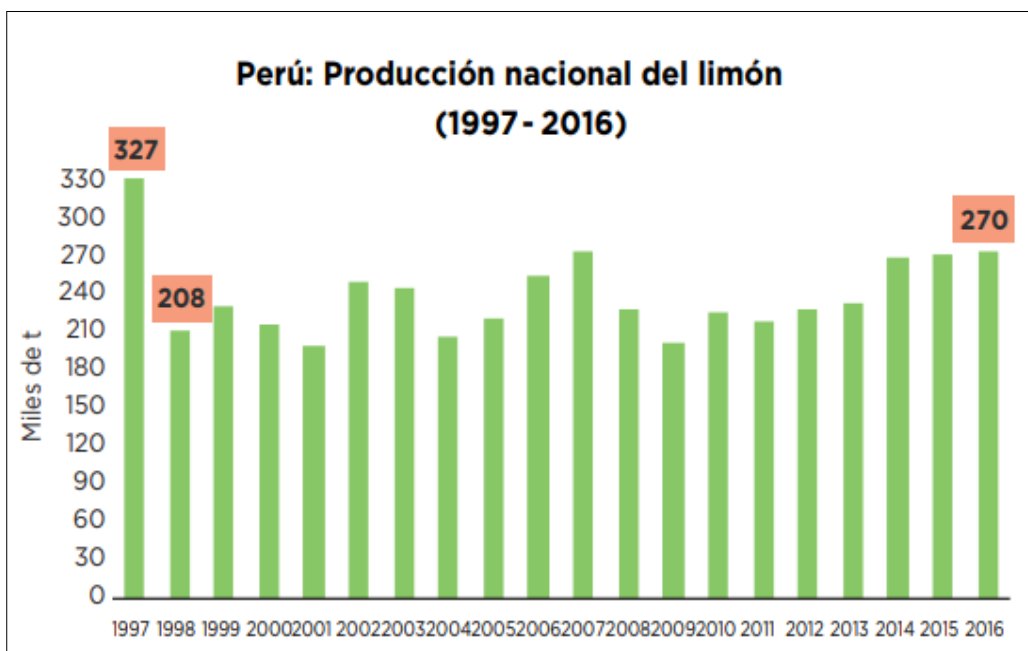


Figura 2. Producción nacional del limón (1997 – 2016)

FUENTE: MINAGRI (2017)

En el 2016 la producción nacional de limón ascendió a 270 308 toneladas, volumen mayor en 2 mil toneladas respecto a lo que se produjo en el 2015 (268 mil toneladas). Dicha producción representó una de las mayores producciones en los últimos años (MINAGRI, 2017).

a. SUPERFICIE COSECHADA Y RENDIMIENTO

Entre 1997 hasta el 2016, se cosechó en promedio 20,2 mil hectáreas por año, los periodos en donde se alcanzaron las mayores superficies de cosecha fueron: 1998, 2012 y 2013 (22.5 mil Ha, 22.7 mil Ha y 23.7 mil Ha respectivamente) (MINAGRI, 2017).

En relación al rendimiento, como se observa en la Figura 3, este mostró su nivel más bajo en el año 1998, como consecuencia del Fenómeno del Niño 1997/98, llegando solamente a 9.2 t/Ha. Así también, los menores rendimientos, a nivel nacional, se alcanzaron en los años 2008 (10.4 t/ Ha), 2009 (10.5 t/Ha), 2012 (9.8 t /Ha) y 2013 (9.6 t/ Ha) debido a los bajos rendimientos en la principal zona productora del Perú (Piura). Por otro lado, en los años 1997, 2007 y 2014 se lograron los más altos rendimientos de los últimos veinte años, destacando la zona productora de Piura con rendimientos entre 13.1 t/Ha y 14.5 t/Ha (MINAGRI, 2017).

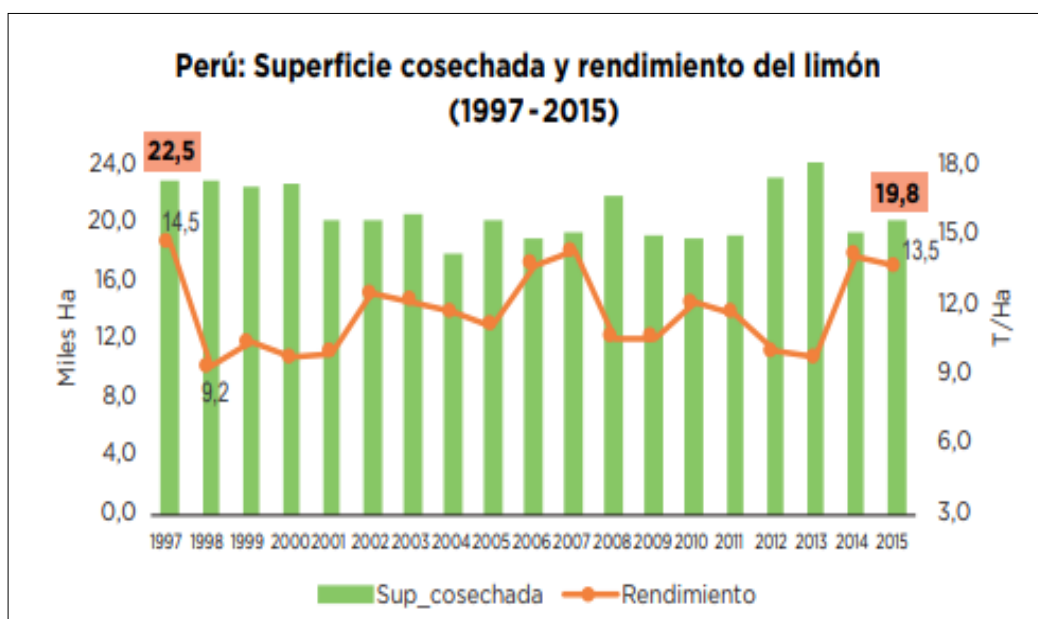


Figura 3. Superficie cosechada y rendimiento del limón (1997 – 2016)

FUENTE: MINAGRI (2017)

b. PRINCIPALES REGIONES PRODUCTORAS

Entre los años 1997 hasta el 2016, las zonas donde se obtuvieron mayores cosechas fueron los departamentos de Lambayeque (19 por ciento) y de Piura (57.3 por ciento de la cosecha total) (MINAGRI, 2017).

En Piura destacan las provincias de Sullana y Piura, las cuales participan en 48.3 y 45.7 por ciento respectivamente del área cosechada en el departamento. En Lambayeque destaca la provincia de Lambayeque, la cual participa en 99.9 por ciento de la cosecha en el departamento. Según, el calendario de siembras y cosechas, al ser el limón un cultivo permanente, éste se cosecha todo el año, pero entre enero y junio se acumula el 60.4 por ciento de la producción nacional (MINAGRI, 2017).

En el 2016, la principal región productora de limón fue Piura con 54.8 por ciento de participación, a ello le siguieron las regiones de Lambayeque (19.1 por ciento), Tumbes (11 por ciento), Loreto (4 por ciento) y Ucayali (3.3 por ciento) (MINAGRI, 2017).

Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI, 2017), al culminar el año 2017 la producción del limón se contrajo en -38.08 por ciento, es decir disminuyó en 102.9 mil toneladas en referencia al año 2016, dando un total de 167 374 toneladas, debido a menores áreas sembradas y temperaturas máximas altas que afectaron al crecimiento y desarrollo del cultivo. Los principales centros productores fueron Piura, Lambayeque, Tumbes, Amazonas y San Martín.

Respecto al 2018, se observa un incremento notable en los principales centros productores: Lambayeque, Piura y tumbes a lo largo del año. En las siguientes Figuras (4,5 y 6) se observa el comportamiento de la producción del 2018 en comparación a la producción del 2017.

Como se puede observar en las Figuras 4, 5 y 6, el crecimiento en la mayoría de los meses del año 2018 es notoria en comparación al 2017, excepto en algunos meses que se justifica por la baja floración del cultivo en dicha temporada. En el departamento de Lambayeque la producción de limón creció un 35.5 por ciento, en Piura creció 120.8 por ciento y en Tumbes un 18.1 por ciento, los valores mencionados son respecto a lo obtenido en el año 2017. El

INEI (2019), menciona que el crecimiento se dio gracias a las buenas condiciones climáticas (temperatura máxima normal) registrados en los departamentos.

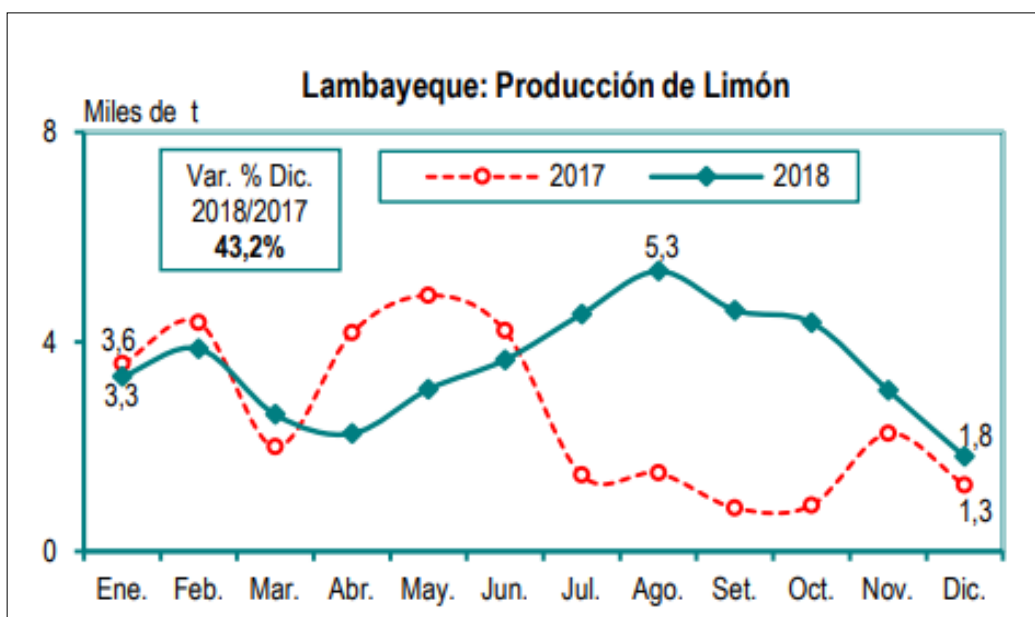


Figura 4. Producción de limón en Lambayeque (2017-2018)

FUENTE: INEI (2019)

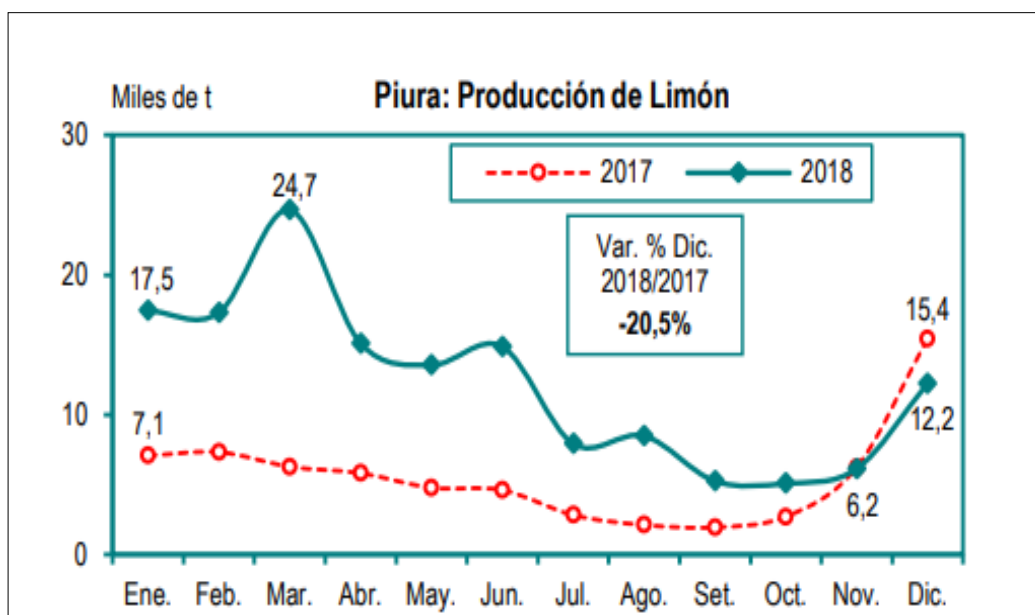


Figura 5. Producción de limón en Piura (2017-2018)

FUENTE: INEI (2019)

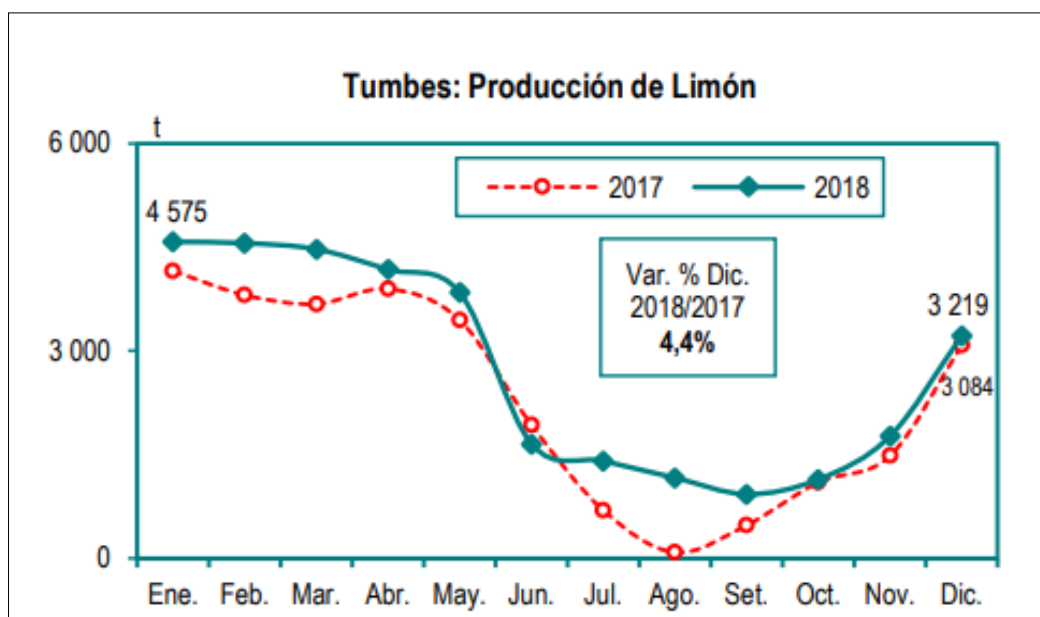


Figura 6. Producción de limón en Tumbes (2017-2018)

FUENTE: INEI (2019)

En resumen, la suma de la producción de los tres principales centros de producción: Lambayeque, Piura y Tumbes en el 2018 fue de 224,197 toneladas y del año 2017 fue de 126,784 toneladas, teniendo un crecimiento de 76.83 por ciento más que el año anterior. La comparación se puede observar en el Tabla 3.

Tabla 3: Producción nacional de limón de los principales centros de producción: Lambayeque, Piura y Tumbes (2017 – 2018)

MES	2017	2018
Enero	14,810 TN	25,370 TN
Febrero	15,494 TN	25,735 TN
Marzo	12,359 TN	31,729 TN
Abril	13,886 TN	21,537 TN
Mayo	13,114 TN	21,306 TN
Junio	10,751 TN	19,913 TN
Julio	4,984 TN	13,880 TN
Agosto	3,707 TN	15,024 TN
Septiembre	3,268 TN	10,808 TN

<<Continuación>>

Octubre	4,688 TN	10,619 TN
Noviembre	9,963 TN	11,000 TN
Diciembre	19,760 TN	17,276 TN
TOTAL	126,784 TN	224,197 TN

FUENTE: INEI (2019)

2.1.5. EXPORTACIÓN DEL LIMÓN SUTIL

En la siguiente Tabla 4 se detalla la cantidad en toneladas que se exportó a lo largo de los últimos años, como se observa el último año tuvo un crecimiento del 45 por ciento en comparación del año anterior. Chile y Panamá son los países que importan la mayor cantidad del limón sutil (AGRODATA, 2018).

Tabla 4: Exportación del limón Sutil

AÑO	CANTIDAD
2014	2,087 TN
2015	3,313 TN
2016	3,031 TN
2017	3,218 TN
2018	4,675 TN

FUENTE: AGRODATA (2018)

En los últimos años el porcentaje de exportación fue aproximadamente de dos por ciento de la producción total, lo que significa que un 98 por ciento de la producción nacional se destina para la comercialización e industrialización en el Perú (AGRODATA, 2018).

2.1.6. PROCESAMIENTO DEL LIMÓN Y DESECHOS QUE SE GENERAN

El procesamiento del limón sutil en productos tales como jugos y conservas genera grandes cantidades de desechos (20 por ciento de la producción), siendo un aproximado de 18 mil toneladas al año (León, 2016). Siendo este un gran potencial para el aprovechamiento en la extracción de aceite esencial, generando de esta manera un valor agregado a un producto de desecho.

La empresa Municipal de Mercados (2018) registró un promedio de 150 mil toneladas de ingreso de limón al mercado mayorista considerando que todo lo ingresado va dirigido al consumo en fresco, restando los 3.2 mil toneladas que en promedio se exporta, quedaría 80 mil toneladas aproximadamente que se usa para la industria de elaboración de jugos, teniendo como desecho de cáscara de limón alrededor de 16 mil toneladas, ya que según Puente (2006) el porcentaje de cáscara respecto al limón entero es un 20 por ciento. Por consiguiente, sigue siendo un gran atractivo de mercado para la producción de aceite esencial.

2.2. ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, constituidas principalmente de terpenoides. Tienen la propiedad común de generar diversos aromas agradables. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos, hasta ser transparentes en algunos casos (Contreras y Ruíz, 2012).

Es una mezcla de componentes, producto del metabolismo secundario de las plantas, en cuya composición intervienen fracciones volátiles, como son: terpenos (C_5H_8), compuestos oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos) y compuestos fenólicos, todos estos son los que transmiten a los aceites el aroma que los caracteriza (León y Robles, 2009).

Masango (2005), define a los aceites esenciales como una mezcla compleja de compuestos naturales, compuestos polares como apolares.

Gutiérrez (2008), menciona que los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por la planta, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Son intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Los aceites esenciales se oxidan por exposición al aire.

2.2.1. ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

El principal producto derivado de la cáscara del limón es el aceite esencial, el cual tiene diferentes usos en las industrias como: la refresquera, farmacéutica, cosméticos, alimentaria, y de limpieza de uso doméstico (como de jabones y detergente). En la actualidad el aceite esencial de limón se ha convertido en un producto de gran interés para su exportación, ya que un alto porcentaje de la producción se destina a ello (Martínez, 2013).

El aceite esencial de limón puede ayudar a estimular el sistema inmunológico. También auxilia a los sistemas digestivo, glandular y circulatorio. Este aceite tiene usos diversos: refrescante, desodorante, germicida, anti-espasmolítico, y mejora la atención y el poder de concentración. Adicionalmente, se utiliza en la fabricación de bebidas no alcohólicas, gaseosas, y aquellos aceites con un contenido de citral y de terpeno más elevado, se utilizan en la industria farmacéutica y de cosméticos. El aceite esencial de limón es fototóxico, por esto, no debe aplicarse sobre la piel que se expondrá directamente a la luz solar (Puente, 2006).

2.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

Hay más de 130 volátiles identificados en el aceite de limón, siendo la mayoría insaturados, como los terpenos, que pueden modificarse fácilmente, causando pérdidas en el sabor y el aroma del aceite esencial (Van *et al.*, 1983 citado por Gamarra *et al.*, 2006).

El aceite esencial de limón son mezclas complejas de compuestos químicos como limoneno, Y-terpineno, citral, linalool y β -cariofileno entre otros, que pueden representarse por tres clases principales, a saber, terpenos, compuestos oxigenados y sesquiterpenos. El compuesto

de sabor más importante es citral, mientras que linalool posee características organolépticas altamente distintivas. Además, el limoneno, el mircenol, el octanol y el γ terpeno, entre otros, contribuyen con el aroma del aceite de limón de alto (Benvenuti *et al.*, 2001).

El componente principal del aceite esencial de cáscara de limón es el D-limoneno, un monoterpeno no oxigenado formado a partir de la combinación de dos unidades de isopreno, constituyendo el 75 por ciento en el aceite, asimismo comprenden una mezcla de compuestos volátiles tales como terpenos y derivados oxigenados tales como aldehídos (citral), alcoholes y ésteres (López *et al.*, 2010).

- **D – LIMONENO:**

El D-limoneno juega un papel importante en el campo del sabor y las fragancias debido a sus propiedades fisicoquímicas. Tales propiedades explican su uso en una gran variedad de productos de consumo, además de sus propiedades de sabor y fragancia (López *et al.*, 2010). Según lo demostrado por Virost *et al.* (2008) citado por Bustamante *et al.* (2016) también se puede usar como un solvente no tóxico en las industrias oleoquímicas, ceras, resinas, pinturas y pegamentos y como un bio-solvente renovable valioso, una alternativa a los solventes peligrosos del petróleo. Otra aplicación importante del D-limoneno es como un agente de limpieza que reemplaza a los agentes de limpieza perjudiciales para el medio ambiente como el tolueno, el hexano y los solventes orgánicos clorados, uno de los factores más importantes para el creciente interés en este compuesto.

2.2.3 PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se conoce aceites esenciales que actúan como aditivos naturales, debido a que tiene propiedades como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Tongnuanchan y Soottawat, 2014). Sus actividades varían con la fuente del material, composición química, método de extracción y así sucesivamente. Debido al olor único asociado con los volátiles, esto puede limitar el uso de aceite esencial en algunos alimentos, ya que puede alterar el olor típico / de sabor de los alimentos.

a. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Carvacol entre los distintos componentes químicos de muchos aceites esenciales destaca por su actividad antimicrobiana (Veldhuizen *et al.*, 2006). Es el principal componente del aceite esencial de orégano (60 por ciento a 74 por ciento de carvacrol) y tomillo (45 por ciento de carvacrol). Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra la mayoría de las bacterias gram-positivas y gram-negativas. Carvacrol actúa desintegrando la membrana externa de las bacterias gram-negativas, la liberación de lipopolisacáridos y el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplásmica a ATP. Para las bacterias gram-positivas, es capaz de interactuar con las membranas de las bacterias y alterar la permeabilidad para cationes tales como H^+ y K^+ (Friedman *et al.*, 2002 y Burt, 2004 citados por Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

La composición, los grupos funcionales y las interacciones sinérgicas entre los componentes del aceite esencial definen su actividad antimicrobiana. El grupo hidroxilo presente en la estructura de los compuestos fenólicos confiere actividad antimicrobiana y su posición relativa es muy crucial para la eficacia de estos componentes naturales; esto puede explicar la actividad antimicrobiana superior del carvacrol, en comparación con otros compuestos fenólicos vegetales (Veldhuizen *et al.*, 2006).

Por lo tanto, los aceites esenciales de las plantas seleccionadas se pueden usar como agentes antimicrobianos para aplicaciones en alimentos, así como otros fines; Sin embargo, su actividad depende de los tipos de aceite esencial utilizado (Veldhuizen *et al.*, 2006).

b. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El timol y el carvacrol con los principales compuestos que poseen una alta actividad antioxidante en el aceite esencial. Los aceites esenciales tienen varios modos de acción como antioxidante, tales como la prevención de la iniciación de la cadena, eliminadores de radicales libres, agentes reductores, la terminación de peróxidos, la prevención de la continuación de abstracción de hidrógeno, así como desactivadores de la formación de oxígeno singlete y la unión de catalizadores de iones de metal de transición. Con estas funciones, los aceites esenciales pueden servir como los potenciales antioxidantes naturales,

que pueden ser utilizados para evitar la oxidación de los lípidos en sistemas alimentarios (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

Los fenólicos son compuestos orgánicos que tiene un grupo hidroxilo (-OH) unido directamente a un átomo de carbono que es una parte del anillo aromático. El átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo puede ser donado a los radicales libres, evitando de este modo otros compuestos a oxidar (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

Teixeira *et al.* (2013) reportaron que la actividad de barrido más alta de radicales DPPH en los aceites esenciales de clavo y orégano con el CE 50 valores de 35.7. Estos también mostraron el alto poder reductor férrico. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como donantes de hidrógeno, agentes reductores, oxígeno singlete inactivadores así como quelantes de metales.

La actividad antioxidante está generalmente relacionada con los principales compuestos activos en aceites esenciales como el eugenol en el clavo y carvacrol en el orégano (Bounatirou *et al.*, 2007)

Los compuestos fenólicos son directamente relacionados con la actividad antioxidante del aceite esencial. La concentración de los principales componentes también lo determina el periodo de cosecha de la planta (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

c. DESARROLLO DE ENVASES ACTIVOS

Hoy en día, los envases inteligentes han ganado cada vez más atención, por ejemplo, envases antimicrobianos, que se puede aplicar para extender la vida útil de los alimentos y los productos (Tongnuanchan y Soottawat, 2014). Para mejorar la propiedad de los envases, los compuestos antimicrobianos o extractos con la bioactividad seleccionado se incorporan. De este modo, se han introducido varios enfoques, no sólo para aumentar la bioactividad sino también modificando la propiedad de los biomateriales utilizados en el embalaje. Entre los biomateriales, las proteínas han ganado la atención, debido a su variedad en las composiciones, propiedades, así como el valor nutritivo. Sin embargo, el material a base de

proteínas para el empaquetado todavía está encontrando la mala propiedad, especialmente pobre propiedad de barrera hacia el vapor de agua.

Turina *et al.* (2006) mencionan que al ser el aceite esencial hidrofóbica podría aumentar la hidrofobicidad de las películas, reduciendo así la migración de vapor de agua a través de la película. Los aceites esenciales de baja densidad se separan y se localizan en la superficie superior del film, formando de este modo la microestructura bicapa. En general, no hubo exudados de aceite en la película incorporado con baja concentración (25 por ciento) de aceite esencial; Sin embargo, a alta concentración de aceite esencial (100 por ciento), algunos exudados fueron encontrados en la superficie de las películas. La microestructura bicapa-morfológica podría contribuir a bajar WVP de aceite esencial incorporado.

2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

2.3.1. MÉTODOS CONVENCIONALES DE EXTRACCIÓN

Un procedimiento inadecuado en la extracción del aceite esencial puede conducir al daño o alterar la acción de su función química, esto se traduce en la pérdida de la bioactividad y características naturales (decoloración, mal olor, mal sabor, así como el cambio físico tal como el aumento de la viscosidad), por ello el método de extracción es uno de los factores primordiales que determinará la calidad del aceite esencial (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

A continuación, se describirá los métodos de extracción más importantes:

a. DESTILACIÓN A VAPOR

La destilación a vapor es el método más utilizado para la extracción de aceite esencial de la planta. El sistema consta de un lecho empaquetado de los materiales vegetales, que se encuentra por encima de la fuente de vapor. Sólo vapor pasa a través de ella y el agua hirviendo no se mezcla con material vegetal. Por lo tanto, el proceso requiere la cantidad mínima de vapor en el proceso y la cantidad de agua en el destilado se reduce. Asimismo, los compuestos solubles en agua se disuelven en la fracción acuosa del condensado en una medida inferior (Masango, 2005).

Yildirim *et al.* (2004) informaron que la capacidad antioxidante, medida por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidracilo) es mayor en los aceites esenciales extraídos por arrastre por vapor en comparación de los aceites extraídos por el método de Hidrodestilación (HD).

b. HIDRODESTILACIÓN

La Hidrodestilación (HD) es el método estándar de extracción de aceite esencial de material vegetal, que a menudo se utiliza para aislar productos naturales no solubles con alto punto de ebullición. El proceso implica la inmersión completa de los materiales de plantas en agua, seguido por ebullición. El vapor que lleva al aceite esencial se condensa a una fracción acuosa. En cierto grado, este método protege a los aceites esenciales ya que el agua actúa circundante como una barrera para evitar el sobrecalentamiento. La ventaja de esta técnica es que el material requerido se puede destilar a una temperatura por debajo de 100 ° C (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

c. HIDRODIFUSIÓN

La diferencia entre la extracción por hidrodifusión y la extracción por destilación de vapor, se da en la entrada de vapor de agua en el recipiente. Para el método de destilación de vapor el vapor se aplica desde la parte inferior del material de la planta, mientras que para la hidrodifusión el vapor se aplica desde la parte superior. El proceso también puede ser operado a baja presión o vacío y reduce la temperatura de ebullición del agua por debajo de 100°C. El menor tiempo de extracción y el mayor rendimiento con menos vapor utilizado lo tiene la hidrodifusión, por lo que se le considera superior en comparación a la destilación de vapor (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

Este método se utiliza cuando el material vegetal se ha secado y no se daña a altas temperaturas (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

d. EXTRACCIÓN POR SOLVENTE

Extracción con disolvente convencional ha sido implementada para materiales que no son tolerantes al calor de la destilación de vapor. Diferentes disolventes como la acetona, hexano, éter de petróleo, metanol, o etanol pueden ser utilizados para la extracción. El disolvente se

mezcla con el material de la planta y después se calienta para extraer el aceite esencial, seguido de filtración. Posteriormente, el filtrado se concentra por evaporación del disolvente. El concentrado es de resina (resinoide), o de hormigón (una combinación de cera, fragancia, y aceite esencial). A partir del concentrado, se mezcla luego con alcohol puro para extraer el aceite y se destila a bajas temperaturas. Sin embargo, este método es un proceso relativamente lento, con lo que los aceites son más caros que otros métodos (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

El residuo del solvente retenido por el producto final es una desventaja que tiene este método aparte del costo, esto puede causar alergias, toxicidad, y afectar el sistema inmunitario (Ferhat *et al.*, 2007).

2.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN NO CONVENCIONALES

a. DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

El tiempo de preparación extensa y la cantidad de disolventes orgánicos son algunas de las deficiencias que tienen los métodos convencionales (extracción por solventes y destilación a vapor). Por otra parte, las pérdidas de algunos compuestos volátiles, la baja eficiencia de la extracción, la degradación de compuestos insaturados y residuos de solvente tóxico en el extracto puede ser encontrado. Por lo tanto, los fluidos supercríticos se han considerado como un medio alternativo para la extracción de aceite esencial. El dióxido de carbono (CO_2) es el fluido supercrítico más utilizado debido a sus condiciones críticas. En condiciones de alta presión, el dióxido de carbono se convierte en líquido, que puede ser utilizado como un medio muy inerte y seguro para extraer las moléculas aromáticas de materia prima (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

b. AGUA SUBCRÍTICA

El agua caliente a presión o agua subcrítica se ha introducido como un agente de extracción en condiciones dinámicas (presión lo suficientemente alta para mantener el agua en estado líquido y temperatura en el intervalo de 100°C a 374°C). Este método es más rápido que la extracción por hidrodestilación (15 min en comparación con 3 horas), proporciona un aceite

esencial más valioso (con mayores cantidades de compuestos oxigenados y no significativa presencia de terpenos), y permite un ahorro sustancial de costes, tanto en términos de material de energía y planta (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

c. MICROONDAS

Las microondas son ondas electromagnéticas no ionizantes con una frecuencia de 300 MHz a 300 GHz. El agua que se encuentra dentro de la célula vegetal, se calienta instantáneamente mediante las ondas de microondas, en cuyo proceso la evaporación genera una presión interna muy fuerte en las paredes celulares de la planta. Esta presión empuja y estira la pared celular y finalmente la destruye, lo que facilita la lixiviación de los fitoquímicos de las células rotas y así obtiene un mayor rendimiento de extracción (Mandal *et al.*; 2007).

Algunas ventajas del método de extracción por microondas son: Mayor selectividad, mayor rendimiento, tiempo de extracción más corto y un método respetuoso al medio ambiente. Es una combinación de calentamiento por microondas y la destilación seca, realizado a presión atmosférica sin ningún disolvente o agua que permite la extracción rápida y eficiente de los aceites esenciales de hierbas aromáticas, especias y semillas secas. Asimismo, reduce los residuos, agua y evita el consumo de disolvente, y permite ahorros sustanciales de energía. (Tongnuanchan y Soottawat, 2014). Por lo tanto, el microondas se fundamenta en un aumento brusco de la temperatura y una expansión drástica, y luego la destrucción de las paredes celulares de la planta, lo que lleva a la liberación de los fitoquímicos bioactivos en el solvente de extracción (Hoang *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2007; Proestos y Komaitis, 2008 citado por Wang *et al.*, 2018).

El principal efecto de las microondas consiste en su capacidad de producir cambios en la rotación molecular y en la movilidad iónica del medio sin alterar la muestra (Contreras, 2014).

Ferhat *et al.*, (2007) informaron de que el método de microondas ofrece las ventajas importantes sobre las alternativas tradicionales, tales como tiempos de extracción más cortos (30 min en comparación con 3 horas para la hidrodestilación y 1 hora para prensado en frío); mejores rendimientos, impacto ambiental (coste energético es sensiblemente superior para la realización de hidrodestilación y para motores mecánicos (CP) que la requerida para la

extracción rápida por microondas); características limpias (como ninguna generación de residuos y no hay agua o disolvente usado); y altas actividades antimicrobianas.

En resumen, la extracción asistida por microondas permite una extracción rápida, reduce los residuos, evita consumo de agua, disolvente, y permite ahorros sustanciales de energía

d. ULTRASONIDO

El método de extracción asistida por ultrasonido, debido a su mayor eficiencia y menor consumo de energía y agua, se ha convertido en una alternativa adecuada a los métodos de extracción convencionales y un método aprobado para procesar sustancias vegetales, especialmente compuestos con bajo peso molecular y este efecto aditivo del ultrasonido. Las ondas sonoras rompen las células vegetales y liberaran su contenido al entorno de extracción. Varios investigadores han aplicado la extracción sono-asistida para mejorar el rendimiento de extracción y acortar el tiempo de extracción (Belhachat *et al.*, 2018).

El ultrasonido genera ondas sónicas de intensidad específica y la amplitud en función de la frecuencia operativa. El ultrasonido puede ser clasificado en dos categorías principales, el ultrasonido de baja potencia (de 100 kHz y superior) y el ultrasonido de alta potencia (de 20 a 100 kHz), ambos de los cuales se han utilizado en la industria alimentaria. El ultrasonido de baja potencia fue aplicado por la industria alimentaria para evaluar las propiedades fisicoquímicas de productos alimenticios tales como la composición y estructura, y otras evaluaciones de control de calidad, mientras que el ultrasonido de alta potencia ha sido aplicado a una amplia gama de aplicaciones que incluyen cristalización, emulsificación, secado y procesos de congelación, así como la inactivación de enzimas (Belhachat *et al.*, 2018).

2.4. SONICACIÓN

2.4.1. FUNDAMENTO

La sonicación tiene algunas implicaciones sobre la desintegración celular, aumentando así la transferencia de masa. Se basa en la aplicación de ultrasonido logrando una ruptura de las estructuras celulares de los alimentos vegetales y con ello una mejor extracción del aceite

esencial (Peredo-Luna *et al.*, 2009). El fenómeno de cavitación se da durante ultrasonidos, en el que debido a la acción de las intensas ondas sonoras se produce en los sitios de nucleación del líquido múltiples microburbujas, que luego crecen y posteriormente colapsan (Damyeh *et al.*, 2016).

El colapso de las burbujas trae como consecuencia la conversión de la energía sónica en energía mecánica en forma de ondas de choque. Esta energía transmite el movimiento a partes desintegradas de las células que se produjeron cuando el contenido de energía de ultrasonido supera la resistencia de la pared. Los chorros de agua y las ondas de choque producidas por el ultrasonido, son los principales factores que intervienen en la rotura de la célula. El efecto mecánico de ultrasonido acelera la liberación de los componentes mediante la interrupción de las paredes celulares, mejora la transferencia de masa, y facilita el acceso de disolventes en el contenido celular (Damyeh *et al.*, 2016).

2.5. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, siendo el objetivo optimizar esta respuesta (Okoh *et al.*, 2010).

La MSR permite seleccionar previamente un número discreto de factores que se sabe que son los que más influyen en una función objetivo, que para el caso de la industria alimentaria pueden ser en el producto y en su aceptación global. A partir de la variación de estos factores y siguiendo diseños experimentales adecuados, se obtienen datos cuantitativos de la variable respuesta (aceptación) que, ajustando a un modelo matemático, proporcionan una ecuación multivariante que resume los resultados del estudio y permite predecir las respuestas para valores que no fueron determinados en el experimento (Delgado, 2011).

La MSR tiene aplicaciones importantes en el diseño, análisis y optimización de productos existentes y operaciones unitarias, y su uso disminuye el volumen de experimentos, reactivos, tiempo, aportes financieros, energía, entre otros. En los últimos años, la MSR se ha aplicado extensivamente para la optimización de múltiples variables en muchos bioprocesos y mostró resultados satisfactorios. Es ampliamente utilizado en agricultura,

biología, alimentos, química y otros campos. El principal objetivo de la MSR es optimizar simultáneamente los niveles de estas variables, determinar las condiciones operativas óptimas para obtener la respuesta deseable (Montgomery, 2002).

El objetivo de la MSR es optimizar la respuesta, para la cual se diseña un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos obtenidos (Montgomery, 2002).

El diseño central compuesto es el experimento diseñado de superficie de respuesta que más se utiliza. Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales (Belhachat *et al.*, 2018).

La optimización por el método de superficie es más ventajosa que la tradicional optimización simple por parámetros individuales donde el objetivo es localizar el tratamiento ganador entre todos aquellos que son probados, en la medida en que la MSR pretende localizar las condiciones óptimas de operación del proceso con un ahorro de tiempo, espacio y materia prima (Ye y Jjiang, 2011).

2.6. CROMATOGRAFÍA DE GASES

En la cromatografía gas-líquido el analito se divide entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un relleno sólido inerte o en las paredes de un tubo capilar (Skoog *et al.*; 2008).

2.6.1. DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

El espectrómetro de masas es uno de los detectores más potentes para cromatografía de gases. La combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas se conoce por las siglas GC-MS. La tasa de flujo procedente de las columnas capilares es casi siempre

tan baja que la salida de la columna se puede alimentar de manera directa a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. En GC-MS, el espectrómetro de masas barre la masa en forma repetida durante el experimento cromatográfico (Skoog *et al.*; 2008). Un esquema de un sistema característico se muestra en la Figura 7.

Los instrumentos para GC-MS han permitido identificar los componentes que causan el olor y el sabor en los alimentos, identificar contaminantes del agua, llevar a cabo diagnósticos médicos basados en los componentes del aliento y estudios sobre los metabolitos de fármacos, es decir permiten identificar miles de componentes presentes en sistemas naturales y biológicos (Skoog *et al.*; 2008).

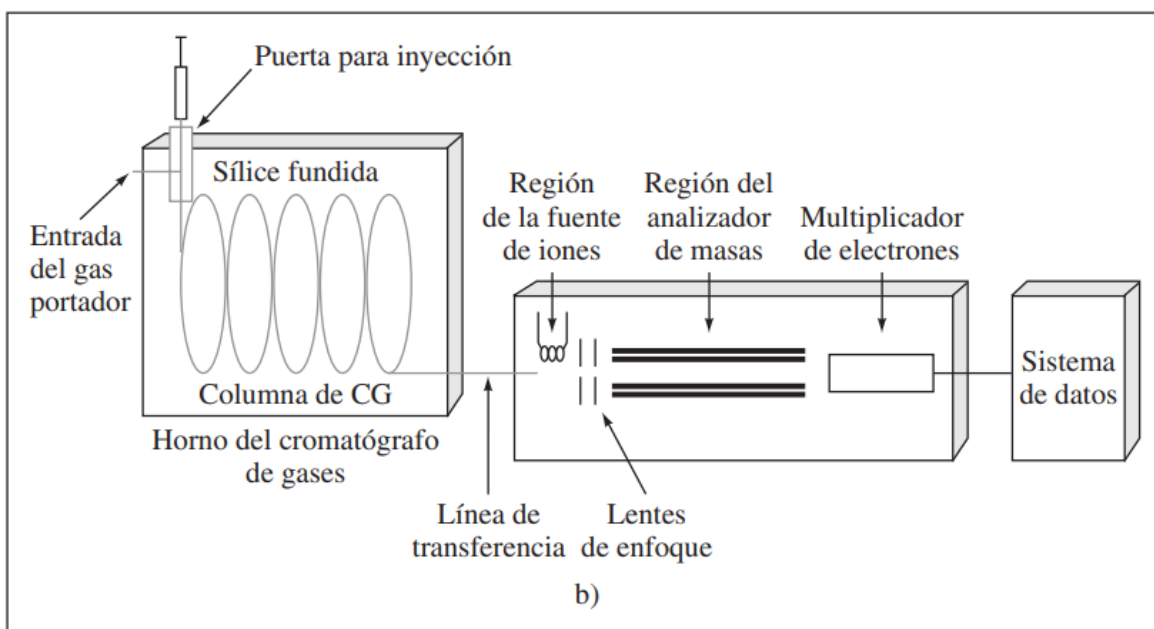


Figura 7. Esquema de un sistema de CG-EM capilar típico

FUENTE: Skoog *et al.*; 2008

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en las siguientes instalaciones: Planta Piloto de Alimentos (PPA), Laboratorio de Biotecnología, Laboratorio de Análisis Físicoquímico y en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2. MATERIA PRIMA

Cáscara de Limón (*Citrus aurantifolia*) de Variedad Sutil provenientes de la provincia de Sullana del departamento de Piura (Perú), proporcionado por la empresa "INVERSIONES LIBER" ubicado en la ciudad de Lima - Perú.

3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO

- Materiales de vidrio: Beakers de 50, 250, 500 y 1000 ml. Probetas, pipetas, Picnómetro de 5 ml con termómetro incorporado, fiolas, tubos de ensayo, viales ámbar de 1.5 ml.
- Bolsas de polietileno de alta densidad, marca Alico.
- Micropipetas de 0.1 a 1 ml.
- Otros: Cuchillos, tabla de picar, pinzas, espátula de metal, bowls, gradilla y otros materiales necesarios para los diferentes ensayos.

3.3.2. REACTIVOS

- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) marca Panreac (España)
- Agua destilada
- Alcohol etílico de 96°, 90°, 80° y 70° marca Dions (Perú)

3.3.3. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Refractómetro ABBE de serie AR, Modelo Kruss (Perú)
- Equipo Microwave Gravity Station, Serie 1605097. Model: NEOS – GR (Italia)
- Equipo Ultrasonic Cleaners VWR™, Serie 1025 H0011, Models 97043-930 (USA)
- Cortador de alimentos ROBOT COUPE CL50, Serie 322276950001, Modelo R5 V.V (USA)
- Empacadora al vacío, Serie 2972596316, Marca Komet, Modelo Plus Vac20 (Alemania)
- Agitador Vortex, Marca Velp^R Scientific, Modelo F202A0175 (Alemania)
- Balanza de precisión, marca Mettler Toledo, Serie 602206860045, modelo Mettler PE 2000 (USA)
- Balanza analítica, marca AND, Serie 50004, Modelo N92 (Korea)
- Balanza de humedad infrarroja OHAUS, Serie OH – 0200, Modelo MB35 (USA)
- Equipo Clevenger del laboratorio de Biotecnología (UNALM)
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C (USA)

3.4. MÉTODOS

3.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

- **Índice de refracción:** Según el método 921.08AOAC (2007). Para la medición se utilizó el refractómetro de mesa ABBE a una temperatura de 20 °C.
- **Gravedad específica:** Según la Norma Técnica Peruana ITINTEC N°319.081.1974, la cual consistió en medir el volumen del aceite en un picnómetro

a una temperatura de 20 °C, el picnómetro se pesó antes y después del llenado y por diferencia se obtuvo la densidad. Los resultados se expresaron en g/ml.

- **Solubilidad en alcohol:** Según la Norma Técnica Peruana ITINTEC N°319.084:1974, para lo cual se utilizó alcohol de 96°, 90°, 80° y 70° GL. Se colocó 0.3 ml de aceite esencial en un tubo de ensayo con una micropipeta y se añadió 0.3 ml de etanol para luego ser agitado en un vortex. Se añadió volúmenes de etanol hasta que se observó una sola fase.
- **Residuos por evaporación:** Según la Norma Técnica Peruana ITINTEC N°319.089:1974. Los análisis fisicoquímicos descritos anteriormente, se realizaron a los aceites obtenidos por extracción asistida por microondas con pretratamiento de ultrasonido, por extracción asistida por microondas sin pretratamiento, y de la extracción por hidrodestilación (Clevenger).
- **Cromatografía de gases para determinar componentes:** El análisis cromatográfico fue desarrollado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para la determinación y cuantificación de los componentes del aceite esencial de cáscara de limón extraído por microondas utilizando un pretratamiento de ultrasonido se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. A continuación, se detalla los parámetros usados.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C.
- Columna: J&W 122-1545.67659 DB-5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0.25 µm
- Rampa de temperatura: Empieza en 40 °C y sube a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5 °C/min hasta 200 °C manteniéndose por 5 min y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C, manteniéndose por 3 min.
- Volumen de Inyección: 1 µL
- Split: 1:100
- Gas portador: He, 1 ml/min 20 µL del aceite esencial fue diluido en 1 ml de diclorometano y luego se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases.

3.4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

a. EXTRACCIÓN POR MICROONDAS CON PRETRATAMIENTO DE ULTRASONIDO

En la Figura 8 se muestra el flujo de operaciones para la obtención de aceite esencial de cáscaras de limón (*Citrus aurantifolia*) por el método de extracción asistida por microondas con pretratamiento de ultrasonido. Asimismo, se describen cada una de las operaciones unitarias involucradas.

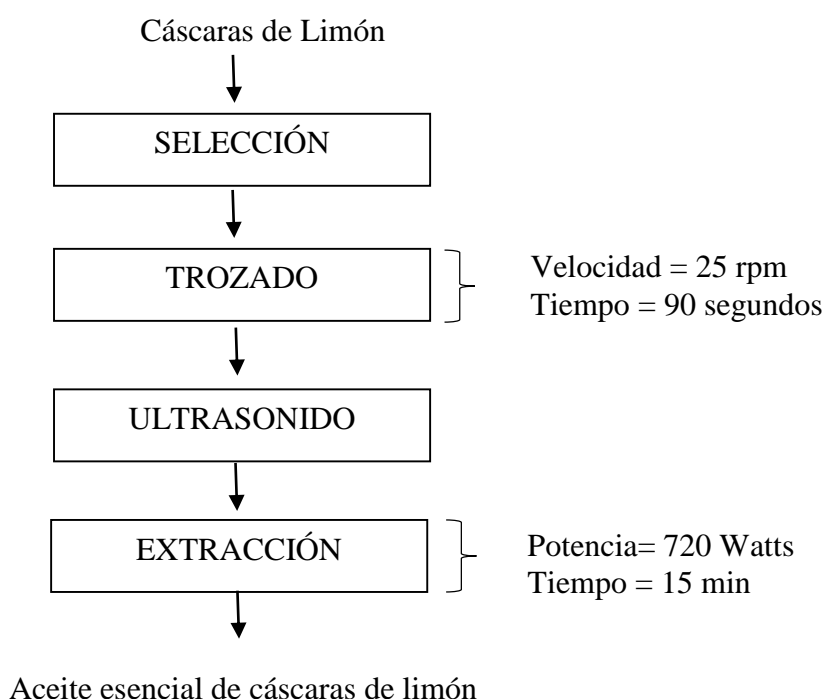


Figura 8. Flujo de operaciones para la extracción de aceite esencial de cáscara de limón por el método de extracción asistida por microondas

Selección: Se realizó una selección manual con el objetivo de retirar la materia prima que estaba en malas condiciones.

Trozado: La materia prima fue trozada utilizando un equipo cortador eléctrico, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula para facilitar la extracción del aceite esencial. El equipo se reguló a una velocidad 25 rpm y el tiempo de proceso fue de 90 segundos, a fin de obtener partículas homogéneas.

Ultrasonido: Las cáscaras de limón trozadas se colocaron en un vaso precipitado de 600 ml que fue colocado al interior de un baño ultrasónico que trabajó a una potencia de 180 watts con una fuente de alimentación de entrada de 220 voltios y una frecuencia de 35 kHz (parámetros constantes, según información proporcionada por el fabricante). Se reguló el equipo a diferentes tiempos y temperaturas según el diseño experimental obtenido a partir del software Desing-Expert® DX7Trial/dX7.

Extracción: Posterior al pretratamiento de ultrasonido, se pesó 500 gramos de muestra, y fueron colocadas en el equipo de extracción Mycroware Gravity Station, se extrajo el aceite esencial a presión atmosférica con una potencia constante de 720 watts durante 15 minutos, sin agregar ningún solvente. Se midió el volumen obtenido.

Envasado: El aceite esencial fue tratado con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual y envasado en viales de color ámbar.

Almacenamiento: Las muestras de aceite esencial envasadas, se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización fisicoquímica.

b. EXTRACCIÓN POR HIDRODESTILACIÓN

Con fines de comparación se realizó la extracción del aceite esencial de cáscara de limón por hidrodestilación (Clevenger), método convencional a nivel laboratorio. Para ello se realizó las mismas operaciones de selección y trozado, antes de la extracción.

Extracción: Se colocó 100 gramos de muestra en un matraz de fondo redondo y se añadió agua con una proporción de 1:6 respecto a la materia prima. Se procedió a la destilación utilizando el equipo de destilación Clevenger, a temperatura de ebullición por un tiempo de 90 minutos. Se midió la cantidad de aceite esencial obtenido.

Envasado: El aceite esencial fue tratado con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual y envasado en viales de color ámbar.

Almacenamiento: Las muestras de aceite esencial envasadas se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización fisicoquímica.

3.4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZANDO LA METODOLOGA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Se evaluó la influencia del pretratamiento ultrasónico en el rendimiento del aceite esencial de las cáscaras de limón aplicando el método de superficie de respuesta para un nivel de significancia de 0.05. La variable respuesta (rendimiento) se expresó en porcentaje. Las variables independientes (factores) que se controlaron fueron: el tiempo y temperatura del equipo ultrasónico siendo el nivel mínimo y máximo que se ensayaron los que se presentan en el Tabla 5.

Cada parámetro se probó en dos niveles codificados como (-1) para el nivel más bajo y (+1) para el nivel más alto. Un diseño compuesto central (CCD) con puntos axiales se utilizó para diseñar los datos experimentales.

Tabla 5: Factores y niveles para el método de superficie de respuesta

FACTO R	VARIABLE INDEPENDIENT E	UNIDAD	NIVEL	NIVEL	-ALPHA	+ALPHA
			INFERIOR -1	SUPERIO R +1		
A	Temperatura de ultrasonido	°C	25	40	22	43
B	Tiempo de ultrasonido	Min	6	30	1	35

El método generó 11 tratamientos con 3 repeticiones en los puntos centrales (0, 0, 0) para estimar el error puro. Los niveles codificados de los dos factores evaluados se indican en la Tabla 6. Dichos tratamientos fueron desarrollados en el laboratorio en forma aleatoria con tres repeticiones cada uno.

Tabla 6: Arreglo factorial de tratamientos por el método de superficie de respuesta

TRATAMIENTOS	FACTOR A: TEMPERATURA (°C)	FACTOR B: TIEMPO (min)
1	25	6
2	40	6
3	25	30
4	40	30
5	22	18
6	43	18
7	33	1
8	33	35
9	33	18
10	33	18
11	33	18

3.4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la maximización de los parámetros de temperatura y tiempo de ultrasonido, los cálculos estadísticos se realizaron mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM).

Se realizó una prueba T-student para verificar si existe diferencias significativas entre el valor máximo de rendimiento obtenido por el software y los valores de rendimiento obtenidos experimentalmente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DEL PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO EN EL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN

En el Tabla 7 se muestra el rango de cada variable independiente (temperatura y tiempo) y la respuesta (rendimiento) obtenida bajo diferentes combinaciones de pretratamiento establecidos por el diseño Central Compuesto (DCC).

La respuesta (rendimiento) varió ampliamente en función de la configuración de parámetros de los experimentos (de 1.980 ± 0.032 a 2.630 ± 0.046 por ciento (v / w) (ml de aceite esencial/ 100 g de materia en base seca). Observándose una diferencia significativa entre algunos tratamientos más que en otros (Anexo 1). El tratamiento 5 (22 °C y 18 min) tuvo el mayor rendimiento de aceite esencial, mientras que el rendimiento más bajo se encontró en el tratamiento 8 (33 °C y 35 min).

Se observó que los factores tiempo y temperatura del pretratamiento ultrasónico tienen un efecto significativo en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de cáscara de limón de variedad sutil ($p < 0.05$), tal como se determinó mediante el análisis de Varianza (Anexo 2). Tal efecto puede atribuirse a las reacciones entre la corriente sónica producida por el ultrasonido rompiendo las paredes de la materia prima en diferentes niveles dependiendo del tiempo y temperatura a las que son expuestas (Belhachat *et al.*, 2018).

Tabla 7: Resultados del rendimiento de la extracción de aceite esencial de cáscara de limón aplicando un pretratamiento ultrasónico

TRATAMIENTO	TEMPERATURA DE ULTRASONIDO (A)	TIEMPO DE ULTRASONIDO (B)	VARIABLE RESPUESTA RENDIMIENTO (porcentaje)
1	25	6	2.001 ± 0.021 ^a
2	40	6	2.389 ± 0.035 ^c
3	25	30	2.422 ± 0.026 ^c
4	40	30	2.006 ± 0.011 ^a
5	22	18	2.630 ± 0.046^d
6	43	18	2.003 ± 0.010 ^a
7	33	1	2.146 ± 0.016 ^b
8	33	35	1.980 ± 0.032 ^a
9	33	18	2.189 ± 0.018 ^b
10	33	18	2.211 ± 0.036 ^b
11	33	18	2.199 ± 0.021 ^b

Los resultados se dan como media ± desviación estándar (n=3). Letras en minúscula de superíndices indican diferencia significativa (p<0.05) del rendimiento entre tratamientos.

a. COEFICIENTES DE REGRESIÓN Y AJUSTE DEL MODELO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinomial de tercer orden. El modelo polinomial utilizado en el análisis de la superficie de respuesta se muestra en la siguiente ecuación.

$$Y = -0.796 + 0.103*A + 0.408*B - 0.015*A*B - 4.35E-04*A^2 - 0.007*B^2 + 8.102E-05*A^2*B + 2.0E-04*A*B^2$$

Donde “Y” expresa el rendimiento de extracción de aceite esencial de cáscara de limón (expresado en ml por 100g de peso seco) (porcentaje), A: temperatura de ultrasonido (°C) y B: tiempo de ultrasonido (min).

Respecto a la ecuación, se observa que A², B² y la interacción entre las dos variables AB demostraron efectos negativos en el rendimiento de extracción, mientras que la variable A, B y la interacción entre A²B y B²A mostraron efectos positivos.

Los resultados de este estudio muestran que el coeficiente de determinación R² fue 0.9855 para el modelo que predice el rendimiento de extracción de aceite esencial de cáscara de limón. Esto implica que la variación de la muestra del 98.55 por ciento podría atribuirse a las variables independientes y, el modelo no explicó solo el 1.45 por ciento del total de variaciones. Sin embargo, R² no se considera como el punto principal para implicar la precisión del modelo, ya que considera términos innecesarios que hacen que su valor sea elevado, debido a aquello es el R² ajustado, es el más apropiado para evaluar el modelo. Tan *et al.*, (2012) citado por Belhachat *et al.*, (2018) menciona que, si el valor del R² ajustado es más del 90 por ciento, el modelo es el indicado, en la práctica se obtuvo 98.14 por ciento, concluyendo que el modelo seleccionado es el correcto.

El resultado para R² predicho muestra un valor de 0.9737. El modelo F value, 242.43, implica que el modelo es significativo. El p-value del modelo fue inferior a 0.05, confirmando una vez más que el modelo es significativo. Por lo que todos los datos obtenidos reforzaron la precisión del modelo.

Asimismo, en el Tabla ANOVA del Anexo 2 se puede ver que el valor de P del rendimiento de extracción por falta de ajuste fue superior a 0.05, es decir no significativo, indicando la idoneidad de los modelos para predecir con precisión la variación (Prasad *et al.*, 2011). La falta de ajuste mide qué tan bien los modelos se ajustan a los datos. Sobre la base del resultado en el Anexo 2 se mostró que la falta de ajuste con el valor de p (0.0710), la "adecuación" del modelo, es mayor que 0.05, lo que indica que el modelo predicho representa razonablemente los valores observados, significando que este modelo fue lo

suficientemente preciso prediciendo la respuesta relevante. Así, la respuesta fue suficientemente explicada por el modelo.

El coeficiente de variación (CV) describe la medida en que se dispersan los datos (Pathirana y Shahidi, 2005). Es una medida de la variación residual de los datos en relación con el tamaño de la media; los pequeños valores de CV dan mejor reproducibilidad. El coeficiente de variación (CV) de valor menor de 10 por ciento indica que el modelo es reproducible (Mason *et al.*, 1989 citado por Belhachat *et al.*, 2018). En el presente trabajo se encontró que el CV de 1.26 por ciento (Anexo 2) indicando que los resultados experimentales fueron precisos y confiables.

b. ADECUACIÓN DE LOS MODELOS POLINOMIALES DE TERCER ORDEN

La aproximación suficiente del modelo polinomial de tercer orden se puede verificar al trazar la relación entre los valores predichos y los valores experimentales del rendimiento de extracción de aceite esencial de cáscara de limón (Figura 9).

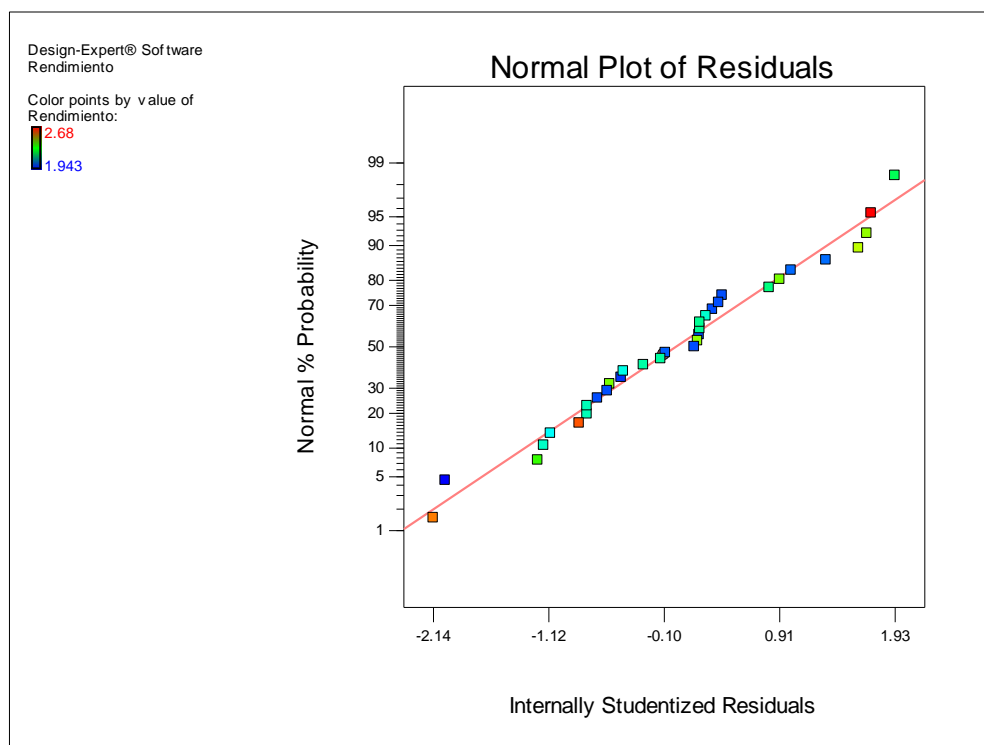


Figura 9. Rendimiento de extracción experimental frente al rendimiento de extracción previsto en condiciones de extracción óptima

Como se puede observar, los valores experimentales estuvieron cerca de una línea recta de los valores predichos, existe una concordancia entre estos valores, el coeficiente de determinación R^2 para la extracción del rendimiento de aceite esencial de cáscara de limón fue de 0.9855, este resultado indicó que el modelo de superficie de respuesta en este estudio era adecuado para determinar los mejores parámetros de ultrasonido que maximizara el rendimiento de la extracción de aceite esencial de cáscara de limón.

c. Análisis de superficies de respuesta y figuras de contorno

La influencia de los dos factores (temperatura y tiempo) en el rendimiento de extracción del aceite esencial de cáscara de limón se determinó a través de la ecuación de regresión polinómica de tercer orden. La mejor manera de expresar el efecto de cualquier parámetro sobre el rendimiento del aceite esencial dentro del espacio experimental bajo investigación fue generar Figuras de superficie de respuesta de la ecuación.

La relación entre las variables independientes (factores) con el rendimiento se representó gráficamente mediante la superficie de respuesta 3D y los Figuras de contorno 2D generados por el modelo (Figura 10).

Las curvas de superficies de respuesta 3D en la figura 10 (a) demostraron los efectos de los factores evaluados (tiempo y temperatura de ultrasonido) y sus interacciones mutuas en el rendimiento de extracción.

Una figura de contorno elíptica indica que las interacciones entre las variables fueron significativas, mientras que una gráfica de contorno circular significa que fueron no significativas (Belhachat *et al.*, 2018). El contorno exhibió una naturaleza elíptica (figura 10 (b)), indicando que los efectos interactivos entre el tiempo y la temperatura de ultrasonido fueron significativos.

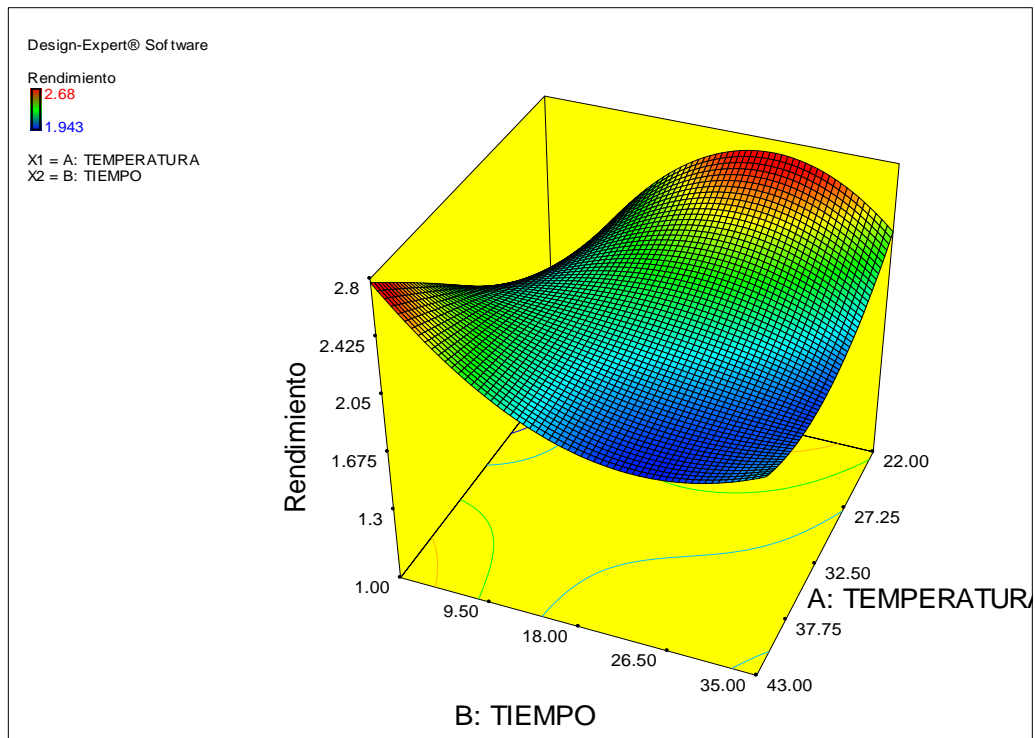


Figura de superficie de respuesta 3D (a)

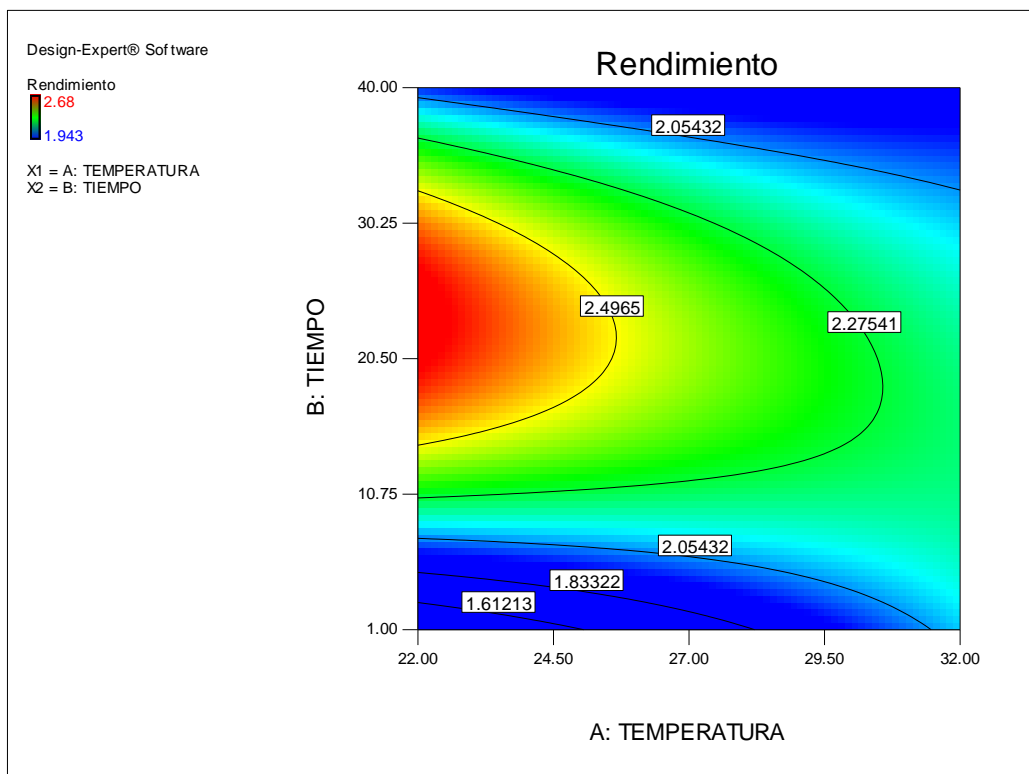


Figura de Contorno 2D (b)

Figura 10. Representación gráfica del rendimiento de aceite esencial mediante la superficie de respuesta 3D y 2D

4.1.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Evaluando solo la influencia de la temperatura (Anexo 2), la variable mostró una influencia lineal y cuadrática significativa. Se evaluó 5 temperaturas (22, 25, 33, 40 y 43 °C), el rendimiento en el minuto uno hasta el minuto diez presentó un comportamiento lineal creciente y a partir del minuto 11, el rendimiento empezó a disminuir al aumentar la temperatura, presentando un comportamiento lineal decreciente y un comportamiento cuadrático, por lo que se concluye que, el rendimiento aumenta con el aumento de temperatura hasta cierto punto, después de ello comienza a disminuir. Hemwimol *et al.*, (2006), mencionan que mientras la temperatura se eleva, la amplitud de las ondas ultrasónicas que viaja a través de un medio líquido crea burbujas y estas colapsan por la cantidad de energía que acumulan. Sin embargo, la formación de burbujas de cavitación a una temperatura demasiado alta hace que estas colapsan con mayor fuerza, destruyendo parte del aceite esencial. Concordando con lo reportado por Yu *et al.*, (2012), quienes afirman a través de su estudio de extracción de aceite esencial de pino, que la temperatura ultrasónica mejora el rendimiento del aceite esencial hasta cierto punto, por ello la importancia de determinar la temperatura adecuada de ultrasonido.

4.1.2 EFECTO DEL TIEMPO

El tiempo de ultrasonido es un factor importante que afecta la eficiencia de extracción (Xu *et al.*, 2015). Es necesario determinar el tiempo adecuado de ultrasonido para evitar el uso excesivo de energía. Los tiempos experimentales que se estudiaron en la presente investigación fueron: 1, 6, 18, 30 y 35 minutos, la influencia que tuvo el tiempo en relación con el rendimiento como se puede observar en la figura 10 (a), (b) y en el Anexo 2, fue lineal y cuadrática. A una temperatura constante, el rendimiento se incrementó hasta cierto tiempo, después del cual el rendimiento disminuyó.

Asimismo, los resultados mostraron que para un tiempo de ultrasonido mayor a 25 minutos aproximadamente, el rendimiento del aceite esencial de cáscara de limón sutil disminuye; este resultado podría deberse que pasado un tiempo determinado de ultrasonido las ondas ultrasónicas pueden destruir el aceite esencial, de la misma manera con la que actúa con la

pared celular. Según Huie (2002), la pared celular de la planta es muy delgada y puede ser fácilmente destruida por el ultrasonido, lo que facilita la liberación del aceite esencial, lo que resulta un tiempo de extracción reducido y una mayor eficiencia de extracción.

4.1.3 EFECTO DE LA INTERACCIÓN TEMPERATURA Y TIEMPO

Relacionando la temperatura y el tiempo se puede interpretar de los Figuras de superficie de respuesta, que a una temperatura de 22 °C, el rendimiento aumenta significativamente hasta el minuto 24, pasado este tiempo el rendimiento empieza a disminuir, de igual manera a una temperatura de ultrasonido de 25 °C, el rendimiento de extracción del aceite esencial de limón se incrementa hasta el minuto 22, pasado ello, el rendimiento disminuye, a una temperatura de 33 °C pasado el minuto 12 de ultrasonido el rendimiento disminuye y de la temperatura de 40 °C y 43 °C mientras aumenta el tiempo el rendimiento disminuye. Por lo tanto, a mayor temperatura se necesita menor tiempo de ultrasonido, y a menor temperatura se necesita mayor tiempo de ultrasonido. Por ello la importancia de determinar ese tiempo y esa temperatura adecuada que maximice el rendimiento en la extracción del aceite esencial.

La extracción del aceite esencial de la parte externa se atribuye a la transferencia de masa externa, las ondas de ultrasonido pueden destruir fácilmente las glándulas externas de las estructuras secretoras de la planta, facilitando así la liberación de componentes (Huie, 2002). Por ejemplo, Chen *et al.*, (2012), analizó el rendimiento de extracción de polisacáridos y dio como resultado que los primeros 60 minutos aumenta rápidamente y se obtiene el resultado de extracción óptimo, ya que después de los 60 minutos, el aumento del rendimiento de extracción es lento.

4.2 MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO

Los resultados de la aplicación de la metodología de superficie de respuesta 3D y las Figuras derivadas de los modelos, mostraron que el tiempo de ultrasonido y la temperatura de ultrasonido tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) en la extracción del rendimiento del aceite esencial de cáscara de limón sutil.

Para obtener la mejor combinación de los parámetros de tiempo y temperatura que da el máximo rendimiento fue necesario definir ciertas condiciones de los parámetros. Por ello, en la Tabla 8 se presenta la mejor restricción de ambos parámetros, obtenida por la metodología de superficie de respuesta.

Tabla 8: Cuadro de restricciones para la Maximización, obtenido por la metodología de superficie de respuesta (RSM)

NOMBRE	CRITERIO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
TEMPERATURA (°C)	En el rango	25	43
TIEMPO (min.)	En el rango	6	30
RENDIMIENTO (%)	máximo	1.94	2.68

De acuerdo al rango trabajado de temperatura y tiempo de ultrasonido (Tabla 8), la mejor combinación de los parámetros para obtener el máximo rendimiento de aceite esencial de cáscara de limón predicho por el modelo polinomial de tercer orden fue la siguiente: tiempo de 22.32 minutos y temperatura de 25°C de ultrasonido, obteniéndose un rendimiento de 2.533% con una deseabilidad de 0.801 (Anexo 3). Para facilitar el proceso de ultrasonido, la mejor condición se modificó de la siguiente manera: tiempo de 22 minutos y temperatura de 25°C de ultrasonido, se realizó cuatro pruebas experimentales para la validación y el rendimiento experimental real en estas condiciones fue del $2.56 \pm 0.03\%$, valor cercano al valor predicho del modelo.

Se realizó una prueba de comparación t-student, donde se determinó que entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor obtenido por el software no existe diferencias significativas con un p-valor > 0.05 (Anexo 4).

4.3 COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia*)

A continuación, se muestra el rendimiento del aceite esencial extraído por el método de extracción asistida por microondas utilizando el pretratamiento ultrasónico maximizado, extraído solo por microondas y extraído con el método convencional de hidrodestilación (Clevenger).

Tabla 9: Comparación del rendimiento de aceite esencial respecto al método tradicional de extracción (clevenger)

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	RENDIMIENTO (porcentaje)
Microondas con pretratamiento* (T1)	2.56 ± 0.03 por ciento
Microondas (T2)	1.83 ± 0.03 por ciento
Hidrodestilación (T3)	1.92 ± 0.03 por ciento

***pretratamiento = 22 minutos de ultrasonido a 25°C.**

Se observa que existe diferencia significativa entre los tres tratamientos a un nivel de significancia del 95% (Anexo 5). Bajo las mejores condiciones de ultrasonido, el rendimiento del aceite esencial de cáscara de limón aumentó de 1.92 ± 0.03 por ciento (clevenger) y 1.83 ± 0.03 por ciento (microondas) a 2.56 ± 0.03 por ciento (ultrasonido más microondas).

En la presente investigación se obtuvo 1.83 por ciento en la extracción asistida por microondas, valor que difiere respecto a lo reportado por algunos investigadores. El rango del rendimiento para el aceite esencial de la misma variedad sutil que se reportaron fue de 0.8 a 1.7 por ciento, al utilizar potencias entre 265 a 785 watts y tiempos entre 15 a 35 minutos (Bousbia *et al.*, 2009; Shakir y Salih, 2015 y Bustamante *et al.*, 2016). Las diferencias entre los resultados pueden deberse a la potencia y tiempo de extracción utilizada, en el presente trabajo se utilizó 720 watts por 15 minutos. Al respecto, Chemat y Esveld (2001) mencionan que una mayor absorción de energía electromagnética podría resultar en una mayor disipación de energía dentro del material de la planta y generar un movimiento

molecular y un calentamiento más efectivos, lo que llevaría a una mejora en la eficiencia de extracción.

Para la hidrodestilación Bousbia *et al.* (2009) y Shakir y Salih. (2015) reportaron rendimientos de 0.8 por ciento y 1.061 por ciento con tiempos de extracción de 120 y 45 minutos, respectivamente. La diferencia que muestran estos valores entre sí y con el valor obtenido (1.92 por ciento de rendimiento) podría ser debido al tiempo de extracción usado, que en el presente trabajo fue 90 minutos.

Una ventaja del uso del microondas como método de extracción es que no se usa solvente alguno debido a que el tiempo de extracción es corto en comparación a una extracción con el método tradicional (clevenger) que necesariamente necesita de un solvente ya que el tiempo de exposición de la destilación es largo, por lo que el uso de un gran volumen de disolvente puede llevar a más energía y tiempo a condensarse la solución de extracción (Jeyaratnam *et al.*, 2016).

Al comparar la extracción por el método de microondas con el pretratamiento ultrasónico con el microondas solo y la hidrodestilación, el rendimiento del aceite esencial obtenido es mayor. Este mayor rendimiento se puede explicar con el fundamento con el que actúa el ultrasonido, el fenómeno de cavitación que se produce durante la el pretratamiento ultrasónico, en el cual, debido a la acción de las ondas sonoras intensas, se producen múltiples microburbujas en los sitios de nucleación en el fluido, que luego crecen y posteriormente se colapsan, desintegrando la membrana celular, y, por lo tanto, aumentan la transferencia de masa (Damyeha *et al.*, 2016).

Aunque las dos técnicas de extracción (ultrasonido y microondas) tienen sus propias ventajas, el microondas tiene el problema de un calentamiento no homogéneo, mientras que el efecto térmico del ultrasonido es relativamente débil. Todas estas deficiencias restringen la aplicación y la efectividad de estos dos métodos por separado. En consecuencia, la combinación del microondas con el ultrasonido es una técnica de extracción complementaria, es decir, las ondas ultrasónicas podrían compensar efectivamente el defecto del calentamiento desigual por microondas, y viceversa, el excelente efecto térmico por microondas podría compensar efectivamente el problema de la escasez de producción de calor insuficiente por ultrasonido (Zhang y Liu, 2008).

Lou *et al.*, (2010) realizaron un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para entender lo que pasaba con la pared celular de la materia prima evaluada y lo definieron de la siguiente manera: el ultrasonido más el microondas combina la cavitación y el golpe mediante un intenso movimiento mecánico de la onda ultrasónica con los excelentes efectos de expansión y calentamiento de las microondas, en consecuencia, la rotura de células y la fuga de aceite esencial por ultrasonido y microondas fue más fácil que el método simple de ultrasonido y microondas por separado. El microondas junto al ultrasonido causó más daño en la pared celular.

4.4 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL

En el Tabla 10 se muestran las características fisicoquímicas del aceite esencial obtenido por la combinación de ultrasonido y microondas, microondas solo e hidrodestilación.

Tabla 10: Características fisicoquímicas del aceite esencial de cáscara de limón

TRATAMIENTO	Ind. Ref	Gravedad específica	Residuo por Evaporización	Solubilidad en etanol
Microondas con pretratamiento* (T1)	1.450 ± 0.002	0.8557 ± 0.01	0.2 ± 0.01 %	96° 1:1
				90° 1:4
				80° insoluble
				70° insoluble
Microondas (T2)	1.450 ± 0.002	0.8545 ± 0.01	0.3 ± 0.01%	96° 1:1
				90° 1:4
				80° insoluble
				70° insoluble
Hidrodestilación (T3)	1.456 ± 0.002	0.8525 ± 0.01	0.7 ± 0.01 %	96° 1:1
				90° 1:7
				80° insoluble
				70° insoluble

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n = 3).
***pretratamiento = 22 minutos de ultrasonido a 25°C.**

Como se observa en el Tabla 10, se obtuvo 1.450 ± 0.002 de índice de refracción por microondas, 1.456 ± 0.002 por hidrodestilación y 1.450 ± 0.002 por microondas con pretratamiento de ultrasonido. Quinde (1984) citado por Pezo (2003), menciona que el índice de refracción de los aceites esenciales oscila generalmente entre 1.43 y 1.62 a temperaturas alrededor de 20 °C siendo este un parámetro que permite revelar la presencia de sustancias extrañas.

Los valores que se encontraron están dentro del rango establecido, pero son menores a los reportados por Horna (2015) y Chirinos y Quispe (2018), quienes determinaron valores de 1.4742 y un rango de 1.4820 -1.4900, para el aceite esencial de limón extraído por el método de centrifugado y 1.4740 -1.4780, por método de arrastre de vapor, los valores corresponden a aceites esenciales de limón sutil peruano. Asimismo, Sánchez (2003) mencionado por Quiroz (2009), determinó valores entre 1.4743 – 1.4757 para el limón sutil ecuatoriano. Y un valor de 1.48 para el limón de Nigeria con el método de extracción de clevenger fue determinado por Njoku y Evbuomwan (2014). Hüsni *et al.*, (2007) mencionan que los aceites esenciales con un menor valor del índice de refracción y densidad están relacionados con una menor cantidad de fenoles, en su composición. Granados *et al.*, (2012) citan que los aceites esenciales con índices de refracción mayores a 1.47 y densidades superiores a 0.9 g/ml tienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos.

Gamarra *et al.*, (2005) menciona que la relación entre el tiempo de destilación y el índice de refracción es directa, es decir conforme aumenta el tiempo de destilado aumenta el índice de refracción muy levemente lo cual puede ocurrir debido a que conforme progresa la destilación se van destilando compuestos del aceite esencial y/o modificándose los compuestos destilados en los primeros minutos, los cuales pueden ir cambiando la coloración del aceite esencial hacia más opaca, ello explicaría la ligera diferencia determinada por el método de hidrodestilación, respecto al método de extracción de microondas.

Tomando en cuenta que este parámetro es exclusivo de cada aceite esencial, es muy importante su determinación debido a que su valor cambia si este se diluye o mezcla con otras sustancias y, por lo tanto; es una medida de la calidad y un parámetro que ayuda a controlar la adulteración (Ortuño, 2006; citado por Téllez, 2017). Las primeras horas del

proceso de destilación se deben a la mayor cantidad de terpenos, mientras que, en la etapa final de destilación, prevalece la presencia de compuestos oxigenados (Gamarra *et al*, 2005).

Se obtuvo 0.8545 ± 0.01 de gravedad específica para la extracción por microondas, 0.8525 ± 0.01 por hidrodestilación y 0.8557 ± 0.01 por microondas con pre-tratamiento de ultrasonido. Montes (1981) citado por Gutiérrez (2008), menciona que la gravedad específica en aceites esenciales va desde 0.84 a 1.18. Los resultados están dentro de lo mencionado; resultados similares fueron encontrados por Sánchez (2003) citado por Quiroz (2009), quien obtuvo un rango de 0.851 – 0.855, Horna (2015) obtuvo 0.8589, Chirinos y Quispe (2018) obtuvieron 0.8620, todos para el aceite esencial de limón sutil peruano. León (2017) obtuvo un valor de 0.86 para aceite esencial de limón sutil, proveniente de Ecuador y Njoku y Egbuomwan (2014) obtuvieron un valor de 0.85 para el limón de Nigeria con el método de extracción cleveenger.

En cuando a los residuos por evaporación, se obtuvo 0.3 ± 0.01 por ciento para la extracción por microondas, 0.7 ± 0.01 por ciento por hidrodestilación y 0.2 ± 0.01 por ciento por microondas con pre-tratamiento de ultrasonido. Chirinos y Quispe (2018) mencionan que los residuos por evaporación están relacionados con el tiempo que está el aceite en contacto con la corteza durante la expresión, y con el tipo de proceso de extracción que produce un mayor o menor esfuerzo mecánico sobre la corteza del fruto.

Los valores determinados difieren con lo reportado por Sánchez (2003) citado por Quiroz (2009), quien halló valores de 2.2 – 2.5 por ciento; Horna (2015) de 3.15 por ciento, mientras que Chirinos y Quispe (2018) encontraron rangos de 10.0 - 18.0 por ciento, para aceites extraídos por centrifugado y para aceite, extraído por destilación, valores entre 0.2 - 2.2 por ciento. La diferencia podría deberse al tiempo de extracción, ya que para la extracción con el microondas solo se expuso a la materia prima por 15 minutos, y el tiempo de extracción por hidrodestilación fue 90 minutos. Cuanto menos residuo por evaporación tenga, el aceite esencial es más puro (Horna, 2015).

Por último, para la solubilidad en alcohol, los tres tratamientos fueron solubles en etanol de 96 por ciento en la misma proporción, pero para la solubilidad a 90 por ciento se necesitó más etanol para la solubilizar el aceite extraído por el método de hidrodestilación (T3). Para el etanol de 80° y 70° los aceites extraídos por los tres tratamientos mostraron insolubilidad.

Horna (2015) encontró solubilidad para etanol de 95 por ciento, Chirinos y Quispe (2018) solubilidad al 90 por ciento. La solubilidad se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en el aceite esencial. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrogeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los aceites esenciales, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria (Téllez, 2017). Por lo mencionado, se puede concluir que el aceite extraído por el método de microondas (T1 y T2) contiene mayor porcentaje de compuestos oxigenados que el aceite extraído por el método de hidrodestilación.

4.5 EFECTO DEL PRETRAMIENTO ULTRASÓNICO SOBRE EL PRINCIPAL COMPONENTE QUÍMICO (D-LIMONENO) DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

En el Tabla 11 se muestra el porcentaje de D-Limoneno del aceite esencial de cáscara de Limón obtenido por extracción asistida por microondas con pretratamiento de ultrasonido.

Tabla 11: Contenido de D-Limoneno en el aceite esencial de limón sutil extraído por microondas más ultrasonido.

Tratamiento	Compuesto (porcentaje)
Microondas con pretratamiento*	51.82 por ciento

***pretratamiento = 22 minutos de ultrasonido a 25°C.**

Como se puede observar, el resultado obtenido para el aceite esencial de cáscara limón de variedad sutil extraído por microondas con pretratamiento ultrasónico fue de 51.82 por ciento de D – Limoneno (Anexo 6 y 7).

Para el aceite esencial de limón sutil “*Citrus aurantifolia*” obtenido por microondas sin ningún pretratamiento encontraron valores para el D-limoneno de 60.56 por ciento (Bousbia *et al.*, 2009) y 59.156 por ciento (Shakir y Salih 2015) (Anexo 8 y 9). Y para el aceite de

limón extraído por hidrodestilación, Bousbia *et al.* (2009) obtuvieron 63.44 por ciento de D-limoneno y Njoku y Egbuomwan (2014) un valor de 64 por ciento (Anexo 10 y 11) y en el Anexo 12 se observa la figura

Bousbia *et al.*, (2009) llegaron a la conclusión que no hay diferencia entre el porcentaje de limoneno obtenido por microondas y por hidrodestilación. Lo mismo mencionaron Bustamante *et al.* (2016), quienes analizaron la composición de la cáscara de naranja con estos dos tipos de extracción (microondas e hidrodestilación) obteniendo valores similares para el D-limoneno en ambas muestras (96.75 y 97.38 por ciento para hidrodestilación y microondas, respectivamente), lo que demuestra que la técnica de extracción alternativa (microondas) acelera el proceso de extracción, pero sin causar cambios considerables en la composición del aceite esencial.

Sin embargo Shakir y Salih (2015), mencionan que el porcentaje de limoneno depende de las condiciones de extracción, ellos analizaron los componentes de varios aceites esenciales de cáscara de cítricos (naranja, limón, mandarina) con diferentes potencias y tiempos de extracción para microondas y con diferentes tiempos para la hidrodestilación, llegando a la conclusión que el porcentaje de los componentes del aceite esencial varían según las condiciones del proceso de extracción, cuando se incrementó la potencia de microondas (de 135 watts a 265 watts durante 60 min y 35 min respectivamente) , la cantidad de limoneno disminuyó. Al igual que en la hidrodestilación, que al aumentar el tiempo de extracción (de 45 min a 75 min) el porcentaje de limoneno obtenido fue menor. Por lo tanto, cuando se utiliza la potencia de microondas para la extracción, la mejor condición es la exposición a una potencia de microondas baja durante más tiempo. La influencia de la energía de microondas en la extracción es estrictamente térmica que acelera el proceso de extracción (Ferhat *et al.*, 2006).

Shakir y Salih (2015), mencionan que la hidrodestilación es más conveniente para proporcionar una gran cantidad de limoneno debido al aumento gradual de la temperatura o una extracción por microondas, pero con baja potencia y mayor tiempo de extracción.

Por lo mencionado anteriormente la diferencia que muestra en el porcentaje de D-limoneno obtenido en la extracción asistida por microondas con el pretratamiento ultrasónico en comparación a lo obtenido por los autores mencionados anteriormente en la cuantificación

del D-limoneno por el método de microondas sin ningún pretratamiento y con la hidrodestilación (Anexo 8, 9, 10 y 11), específicamente para el porcentaje de limoneno pudo deberse a la potencia a la cual fue extraído el aceite esencial después del pretratamiento, en el presente trabajo de investigación se utilizó una potencia de 720 watts durante 15 minutos. Bousbia *et al.* (2009) usaron una potencia de 500 watts con un tiempo de extracción de 15 minutos y Shakir y Salih (2015), usaron una potencia de 265 watts durante 35 minutos. La potencia no debe ser demasiado alta, de lo contrario se produciría una pérdida de compuestos volátiles (Bousbia *et al.*, 2009).

Si se observa un menor valor de limoneno en la extracción por microondas una de las posibles explicaciones es que el microondas podría producir efectos en algunos terpenos, y los terpenos pueden estar sujetos a cambios de configuración en la posición de los dobles enlaces, lo que provoca una reducción (Plessi *et al.*, 2002). Por otro lado, Petigny *et al.* (2014) informaron que las microondas podrían aumentar las degradaciones de los productos naturales, incluidos los compuestos orgánicos no volátiles y los compuestos orgánicos volátiles.

Otro factor que pudo influir en la diferencia presentada respecto a los otros dos tratamientos (microondas sin ultrasonido e hidrodestilación) pudo ser causado por el pretratamiento ultrasónico que, al estallar las burbujas, estas ondas sónicas viajaron con gran intensidad, destruyendo los compuestos más volátiles del aceite esencial, en este caso el monoterpeno limoneno, pero al destruir parte de la pared celular de la cáscara de limón también ayudó en la obtención de mayor porcentaje de otros compuestos importantes como el citral que le da la propiedad odorífica y mayor porcentaje de compuestos oxigenados quien le da la característica de solubilidad como lo mencionan Shakir y Salih (2015), los aceites esenciales extraídos por microondas sin disolventes son más ricos en compuestos oxigenados. Aquello se puede corroborar con los resultados obtenidos, para el tratamiento maximizado (microondas más ultrasonido) se obtuvo 9.79 por ciento de compuestos oxigenados.

Los beneficios de las ondas ultrasónicas y las microondas en la extracción son la intensificación de la transferencia de masa, el excelente efecto térmico, la ruptura celular y la mejora de los efectos de penetración (Chemat *et al.*, 2017).

Por otro lado, Lota *et al.* (2002) encontraron diferencias significativas en la variedad de la materia prima; estudiaron 19 muestras de aceites esenciales extraídas de distintas variedades de limón, cultivadas en las mismas condiciones geográficas en Francia, con el objetivo de determinar si la variedad influye en la composición del aceite esencial. Fueron extraídas por prensado en frío. Las 19 muestras fueron distribuidas en 3 grupos dependiendo del componente Limoneno, *Citrus aurantifolia* estuvo en el grupo dos, donde el rango de D-limoneno se encuentra entre el rango 48.6 - 71.2 por ciento, por el lado de variedad, el resultado obtenido para el tratamiento óptimo se encuentra dentro del rango mencionado por el autor. Combariza *et al.* (1994) demostraron que no solo la variedad afecta en la composición del aceite esencial sino también su estado de madurez, obteniendo mayor limoneno en el estado de madurez intermedia.

V. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un modelo polinomial de tercer orden para predecir el rendimiento de extracción del aceite esencial de la cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*). El modelo demostró una buena concordancia entre los valores predichos y los valores reales, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9855$.
2. Existe un efecto significativo de la interacción temperatura y tiempo en el pretratamiento de ultrasonido sobre el rendimiento del aceite esencial de limón, extraído por microondas.
3. Los parámetros del tratamiento de ultrasonido previo a la extracción por microondas que maximizan el rendimiento del aceite esencial de cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*) fueron: 25 °C de temperatura y 22 minutos de ultrasonido. En estas condiciones, el rendimiento de extracción fue 2.56 ± 0.03 por ciento (en base seca).
4. No existe diferencias significativas con un p-valor > 0.05 entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor obtenido por el software para la validación de la maximización del rendimiento.
5. El rendimiento de la extracción por microondas (sin ultrasonido) fue 1.83 por ciento, y el valor obtenido por el método convencional de hidrodestilación fue de 1.92 por ciento.
6. Por los rendimientos obtenidos, se puede concluir que el ultrasonido como pretratamiento en la extracción asistida por microondas podría ser una alternativa a otras técnicas de extracción novedosas para obtener aceites esenciales con un alto rendimiento, como un método de extracción verde, libre de solventes “respetuoso con el medio ambiente” y sencillo de aplicar.

7. Las características físicoquímicas como el índice de refracción, gravedad específica y residuos por evaporación fueron muy similares entre el aceite esencial obtenido con el pretratamiento de ultrasonido más microondas, con microondas solo y con hidrodestilación.

8. El contenido de D-limoneno en el aceite esencial de limón, obtenido por el método de extracción asistida por microondas con pretratamiento de ultrasonido (25 °C de temperatura y 22 minutos) fue de 51.82 por ciento.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar paso a paso cómo va cambiando la estructura de la pared celular de la cáscara de limón (*Citrus aurantifolia sp.*) a lo largo del pretratamiento de ultrasonido.
- Realizar un estudio con aplicación del aceite esencial de la cáscara de limón (*Citrus aurantifolia sp.*) como compuesto bioactivo para envases inteligentes.
- Realizar un estudio de prefactibilidad para conocer la viabilidad del método alternativo y atractivo para la extracción de aceite esencial de cáscara de limón a escala industrial.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AGRODATA. (2019). Exportación del Limón Fresco Sutil Peruano (en línea). Recuperado de <https://www.agrodataperu.com/2019/01/limon-fresco-sutil-peru-exportacion-2018-diciembre.html>
- Belhachat, D., Mekimene, L., Belhachat, M., Ferradji, A., Aid, F., (2018). Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of Pistacia lentiscus using ultrasonic pretreatment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 9: 132-140. doi:10.1016/j.jarmap.2018.04.003
- Benvenuti, F., Giron, F., Lamberti, L. (2001). Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of their semi continuous extraction process. *Journal of supercritical fluids* 20: 29-44. doi:10.1016/S0896-8446(01)00058-4
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, MG., Faleiro, L., Neffati, M., Costa, M., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. *Food Chemical* 105:146-55. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.059
- Bousbia, N., Abert, M., Mohamed, A., Brahim, Y., Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering* 90: 409-413. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.034
- Bustamante, J., Stempvoort, S., Gallarreta, MG., Houghton, J., Briers, H., Budarin, V., Matharu, A., Clark, J. (2016). Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production* 137: 598-605. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.07.108

- Contreras, E., Ruiz, J. (2012). Estudio Comparativo de dos Métodos de Extracción para el Aceite Esencial presente en la Cáscara de Pomelo (*Citrus maxima*). (Tesis para optar por el grado de ingeniero). Universidad de Cartagena, España. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11227/108>
- Contreras, V. (2014). Extracción de Aceite de Orégano mediante Radiación de Microondas. (Tesis para optar por el grado de ingeniero). Instituto Tecnológico de Durango, México. Recuperado de <https://studylib.es/doc/4986484/extracci%C3%B3n-de-aceite-de-or%C3%A9gano-mediante-radiaci%C3%B3n-de-mic>
- Combariza, M., Tirado, C., Stashenko, E. (1994). Limonene Concentration in Lemon (*Citrus volkameriana*) Peel Oil as a Function of Ripeness. *Journal of High Resolution Chromatography* 17: 643-646. doi:10.1002/jhrc.1240170905
- Chemat, F., Esveld, E. (2001). "Microwave superheated boiling of organic liquids: origin, effect and application". *Chemical Engineering Technology* 24: 735-744. doi:10.1002/1521-4125(200107)24
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, AG., Meullemiestre, A., Tixier, F., Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrason. Sonochem* 34: 540–560. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- 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* 19: 1160–1168. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.03.008
- Chirinos, D., Quispe, V. (2018). Estudio técnico para la producción de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) utilizable en la industria de perfumería. (Tesis para optar por el grado de ingeniero). Universidad Nacional de Ingeniería, Perú. Recuperado de <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/14158>

- Damyeh, MS., Niakousari, M., Saharkhis, MJ. (2016). Ultrasound pretreatment impact on Prangos ferulacea Lindl. And Satureja macrosiphonia Bornm. essential oil extraction and comparing their physicochemical and biological properties. Industrial Crops and Products 87: 105–115. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.025
- Delgado, J. (2011). Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales. Bogotá, Colombia, UNAD. doi:10.22490/25394088.1098
- Empresa Municipal de Mercados. (2018). Serie Histórica por volumen de los principales productos (en línea). Recuperado de <http://www.emmsa.com.pe/index.php/estadisticas/volumenes-de-ingresos>
- Ferhat, M, Meklati B, Chemat F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave ‘dry’ distillation. Flavour Frag Journal 22: 494–504. doi:10.1002/ffj.1829
- Ferhat, B., Meklati, Y., Smadja, J., Chemat, F. (2006) "An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel". Journal of Chromatography 1112: 121-126. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.030
- Gamarra, F., Sakanaka, L., Tambourgi, E., Cabral, F. (2005). Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process. Brazilian Journal of Chemical Engineering 23 (1): 147 – 151. doi:10.1590/S0104-66322006000100016
- Granados, C., Yáñez, Y., Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 10(1):12-23. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90326398005>
- Grünauer, C. (2009). Influencia del Secado sobre la Captación de Agua de Pectina extraída a partir del *Citrus aurantifolia* Swingle. (Tesis para optar por el grado de ingeniero). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31725>

- Guerrero, D., Flores, A., JO, O., Lama, D., Luy, G., Mao, J. (2012). Diseño y Experimentación de la Línea de Producción de una Planta Procesadora de Limones. Área departamental de Ingeniería y de Sistemas. Lima, Perú. Recuperado de <https://hdl.handle.net/11042/1561>
- Gutiérrez, M. (2008). Caracterización e identificación de componentes del aceite esencial de cedrón (*Aloysia triphylla*). (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.
- Hemwimol, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry* 13: 543-548. doi: 10.1016/j.ultsonch.2005.09.009
- Horna, C. (2015). Estudio comparativo y evaluación del rendimiento de dos tecnologías de extracción de aceites esenciales de naranja, mandarina y tangelo. (Tesis para optar por el grado de Ingeniero). ESAN, Perú. Recuperado de <https://hdl.handle.net/20.500.12640/666>
- Huie, C. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373: 23–30. doi: 10.1007/s00216-002-1265-3
- Hüsni, K., Başer, C., Demirci, F. (2007). Flavours and Fragrances. *Chemistry of Essential Oils*. 1: 43-86. DOI: 10.1007/978-3-540-49339-6_4
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2017). Producción Nacional. Boletín de informe técnico 03. Lima, Perú. Recuperado de <http://m.inei.gob.pe/biblioteca-virtual/boletines/produccion-nacional/2017/1/#lista>
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2018). Perú: Panorama Económico Departamental. Boletín de informe técnico 02. Lima, Perú. Recuperado de <https://www.inei.gob.pe/biblioteca-virtual/boletines/panorama-economico-departamental/2018/1/>

- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). (2019). Producción Nacional. Boletín de informe técnico 12. Lima, Perú. Recuperado de <https://www.inei.gob.pe/biblioteca-virtual/boletines/panorama-economico-departamental/2019/1/>
- INFOAGRO, (2016). El Cultivo de los Limones (en línea). Lima, Perú. Recuperado de <http://www.infoagro.com/citricos/limon2.htm>
- Jeyaratnam, N., Nour, A., Akindoyo, JO., (2016). Comparative study between hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation for extraction of Cinnamomum Cassia oil. Journal of Engineering and Applied Sciences 11: 2647-2652. Recuperado de http://www.arpnjournals.org/jeas/research_papers/rp_2016/jeas_0216_3698.pdf
- León, A., Robles, A. (2009). Estudio de prefactibilidad para la Instalación de una planta extractoras de Aceites Esenciales. Tesis Ing. Ibarra, Ecuador, UTN. Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/250>
- León, C. (2017). Aprovechamiento Industrial del aceite esencial del limón sutil *Citrus aurantifolia*. Tesis Ing. Loja, Ecuador, UTPL. Recuperado de <https://dspace.utpl.edu.ec>
- León, J. (2016). Piura produce 120 mil toneladas de limón al año. Agencia Agraria de Noticias. Producción de limón en Piura. Lima, Perú. Recuperado de <https://agraria.pe/noticias/piura-produce-120-mil-toneladas-de-limon-al-ano-12133#:~:text=La%20entidad%20detall%C3%B3%20que%20en,las%2020%20TM%2Fha%E2%80%9D>
- León, J. (2016). Lima Tahíti y Limón Eureka tienen oportunidades en América e Europa. Agencia Agraria de Noticias. Producción de limón en Piura. Lima, Perú. Recuperado de <https://agraria.pe/noticias/lima-tahiti-y-limon-eureka-tienen-oportunidades-10875>
- Lopez, S., Li, Q., Thompson, IP. (2010). Biorefinery of waste orange peel. Journal Critical Reviews in Biotechnology 30 (1): 63-69. doi:10.3109/07388550903425201

- Lou, ZX., Wang, HX., Zhu, S., Zhang, M., Gao, Y., Ma, CY., Wang, Z. (2010). Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. *Journal Chromatogr.* 1217 (16): 2441–2446. doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.022
- Llihua, L. (2018). Efecto de la sacarosa y cotiledones sobre el prendimiento de microinjertos in vitro de naranja y limón (*Citrus sp.*). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. doi: 10.36331/revista.v6i1.62
- Lota, M.L., Serra, D, Tomi, F., Jacquemond, C., Casanova, J. (2002). Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 796-805. doi:10.1021/jf010924I
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction-an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Reviews* 1 (1): 7-18. Recuperado de <https://www.phcogrev.com/article/2007/1/1-0>
- Martínez, C. (2013). Extracción y Caracterización del Aceite Esencial de Limón (*Citrus Limonium*). Tesis Ing. Tuxpan, México, Universidad Veracruzana. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/19571/JAEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production* 13: 833-839. doi:10.1016/j.jclepro.2004.02.039
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). (2017). Informe del limón (en línea). Lima, Perú. Recuperado de http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/ftaxonomia_plantas/f01-cultivo/informe_limon_ago17.pdf
- Njoku, VI., Evbuomwan, BO. (2014). Analysis and Comparative Study of Essential Oil Extracted from Nigerian Orange, Lemon and Lime Peels. *Greener Journal of Chemical Science and Technology* 1(1): 6-14. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.084

- OEIDRUS (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable). (2010). Estudio Estadístico sobre la producción de cítricos en baja California (en línea). Recuperado de http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/biblioteca/agropecuaria/CitricosBC.pdf.
- Okoh, O., Sadimenko, A., Afolayan, A. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.084
- Pathirana, L., Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 5: 2433-2440. Doi:10.1021/jf049320i
- Peredo - Luna, H., Palou - García, E., López - Malo, A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. Puebla, México. Ingeniería de Alimentos 3: 24-32. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pereira CG, Meireles M. (2007). Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. Flavour Frag Journal 22: 407–13. doi:10.1002/ffj.1813
- Petigny, L., Périno, S., Minuti, M., Visinoni, F., Wajsman, J., Chemat, F. (2014). Simultaneous microwave extraction and separation of volatile and non-volatile organic compounds of boldo leaves. From lab to industrial scale. International Journal of Molecular Sciences 15 (5): 7183-7198. doi:10.3390/ijms15057183
- Pezo, A. (2003). Caracterización del aceite esencial de hojas de molle (*Schinus molle*) obtenido por dos métodos de destilación. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Plessi, M., Bertelli, D., Miglietta, F. (2002). Effect of microwaves on volatile compounds in white and black pepper. Food Science and Technology 35 (3): 260-264. doi:10.1006/fstl.2001.0853

- Prasad, K., Hassan, F., Yang, B., Kong, K., Ramanan, R., Azlan, A., Ismail, A. (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. Peels. *Food Chemistry* 128:1121-1127. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.105
- Puente, C. (2006). Determinación de las características físicas y químicas del limón sutil (*Citrus aurantifolia* Swingle). Tesis Ing. Ibarra, Ecuador, UTN. Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/352>
- Quiroz, A. (2009). Utilización de residuos de cáscara de naranja para la preparación de un desengrasante doméstico e industrial. Tesis Ing. Quito, Ecuador, Universidad Internacional SEK. Recuperado de <http://repositorio.uisek.edu.ec/123456789/407>
- Robles, L., Ochoa, L. (2012). Ultrasonido y sus Aplicaciones en el Procesamiento de Alimentos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* 13(2):109-122. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/813/81325441002.pdf>
- Sahraoui, N., Vian, M.A., Mohamed, E., Chemat, F. (2011). Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2:163-170. doi: 10.1016/j.ifset.2011.02.002
- Shakir, I., Salih, S. (2015). Extraction of Essential Oils from Citrus By-Products Using Microwave Steam Distillation. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering* 16(3): 11- 22. Recuperado de <https://www.iasj.net/iasj/download/387bf8b9fb2dee1a>
- Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Sexta Edición. México. Recuperado de https://www.academia.edu/37326567/Principios_de_an%C3%A1lisis_instrumental_6ta_Edici%C3%B3n_Douglas_A_Skoog_LIBROSVIRTUAL
- Tan, Q., Kieu, X., Kim, N., Hong, X. (2012). Application of response surface methodology (RSM) in condition optimization for essential oil production from *Citrus latifolia*. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24: 25–30. doi:10.9755/ejfa.v24i1.10595

- Teixeria, M., Leme, E., Delarmelina, C., Almeida, A., Figueira, G., Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plant on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111:197-201. doi:10.1016/j.jep.2006.11.034
- Tellez, L. (2017). Caracterización de los aceites esenciales de seis ecotipos de orégano (*Origanum vulgare ssp.*) procedentes del valle de Urubamba – Cusco., Perú. Tesis Mg.Sc. Lima, Perú, UNALM. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3479/tellez-monzon-lena-asuncion.pdf?sequence=1>
- Tongnuanchan, P., Soottawat, B. (2014). Essential oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* 9 (7): 1750-3841. doi: 10.1111/1750-3841.12492
- Turina, A., Nolan, M., Zygadlo, J., Perillo, M. (2006). Natural terpenes: self - assembly and membrane partitioning. *Biophys Chemical* 122:101–130. doi: 10.1016/j.bpc.2006.02.007
- Veldhuizen, E., Tjeerdsma, V., Bokhoven, J., Zweijtzer, C., Burt, S., Haagsman, H. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal Agriculture Food Chemical* 54:1874–9. doi: 10.1021/jf052564y
- Wang, Y., Li, R., Jiang, Z., Tan, J., Tang, S., Li, T., Liang, L., He, H., Liu, Y., Li, J., Zhang, X. (2018). Green and solvent-free simultaneous ultrasonic-microwave assisted extraction of essential oil from white and black peppers. *Industrial Crops & Products* 114:164-172. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.002
- 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* 117: 895-902. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.032

- Ye, CL., Ying, C.J. (2011). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from plantago asiática L. by response Surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 84: 495-502. doi:10.1016/j.carbpol.2014.10.032
- Yildirim, A., Cakir, A., Mavi, A., Yalcin, M., Fauler, G., Taskesenligil, Y. (2004). The variation of antioxidant activities and chemical composition of essential oils of *Teucrium orientale* L. var. *orientale* during harvesting stages. *Flavour Frag Journal* 19: 367-72. doi: 10.1002/ffj.1343
- Yu, X., Sun, D., Li, X. (2012). Ultrasound-enhanced supercritical co2 extraction of Masson Pine Wood essential oil. *Asian Journal of Chemistry* 24: 409-412.
Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/286880160_Ultrasound-Enhanced_Supercritical_CO2_Extraction_of_Masson_Pine_Wood_Essential_Oil
- Zhang, L., Liu, Z. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem* 15 (5): 731-737. doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.12.001

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) – RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN POR TRATAMIENTO

Tabla ANOVA para RENDIMIENTO por TRATAMIENTO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.31247	10	0.131247	180.29	0.0000
Intra grupos	0.0160153	22	0.00072797		
Total (Corr.)	1.32849	32			

Pruebas de Múltiple Rangos para RENDIMIENTO por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T8	3	1.98033	X
T1	3	2.00067	X
T6	3	2.00333	X
T4	3	2.006	X
T7	3	2.14567	X
T9	3	2.18867	X
T11	3	2.19867	X
T10	3	2.21133	X
T2	3	2.38933	X
T3	3	2.422	X
T5	3	2.63	X

ANEXO 2: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DEL MODELO POLINOMIAL DETERMINADO A PARTIR DE DCC PARA LOS RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN.

Source	Sum of squares	Df	Mean square	F Value	p-value	Prob > F
Model	1.309200	7	0.18702858	242.4299	< 0.0001	Significant
A-	0.587559	1	0.58755978	761.6059	< 0.0001	
TEMPERATURA						
B-TIEMPO	0.024258	1	0.02425842	31.44422	< 0.0001	
AB	0.485616	1	0.48561633	629.464	< 0.0001	
A^2	0.054140	1	0.05414066	70.17814	< 0.0001	
B^2	0.101298	1	0.10129866	131.3052	< 0.0001	
A^2B	0.017774	1	0.01777473	23.03994	< 0.0001	
AB^2	0.277673	1	0.27767329	359.9253	< 0.0001	
Residual	0.019286	25	0.00077147			
Lack of Fit	0.002497	1	0.00249731	3.569811	0.0710	not significant
Pure Error	0.016789	24	0.00069956			
Cor Total	1.328487	32				
Std. Dev.	0.0278		R-Squared	0.9855		
Mean	2.1978		Adj R-Squared	0.9814		
C.V (porcentaje)	1.2638		Pred R-Squared	0.9737		
			Adeq	47.4853		
			Precision			

ANEXO 3: MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
TEMPERATURA	is in range	25	43	1	1	3
TIEMPO	is in range	6	35	1	1	3
RENDIMIENTO	maximize	1.943	2.68	1	1	5

Solutions					
Number	TEMPERATURA	TIEMPO	RENDIMIENTO	Desirability	
1	<u>25.00</u>	<u>22.32</u>	<u>2.53299</u>	<u>0.801</u>	<u>Selected</u>
2	25.00	22.43	2.53296	0.800	
3	25.00	22.59	2.53282	0.800	
4	43.00	6.00	2.45877	0.700	
5	43.00	35.00	2.15453	0.287	

ANEXO 4: RESUMEN ESTADÍSTICO DE LA PRUEBA T-STUDENT PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS (STATGRAPHICS)

Resumen	Valor Experimental	Valor Software
Recuento	4	4
Promedio	2.555	2.53
Desviación Estándar	0.0264575	0
Coefficiente de Variación	1.03552%	0%
Mínimo	2.52	2.53
Máximo	2.58	2.53
Rango	0.06	0
Sesgo Estandarizado	-0.705387	
Curtosis Estandarizada	-0.116642	

Esta tabla contiene el resumen estadístico para las dos muestras de datos. Pueden utilizarse otras opciones tabulares, dentro de este análisis, para evaluar si las diferencias entre los estadísticos de las dos muestras son estadísticamente significativas. De particular interés son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada que pueden usarse para comparar si las muestras provienen de distribuciones normales.

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de VALOR EXPERIMENTAL: 2.555 +/- 0.0420998 [2.5129; 2.5971]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de VALOR SOFTWARE: 2.53 +/- 0 [2.53; 2.53]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: 0.025 +/- 0.0323697 [-0.00736969; 0.0573697]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = 1.88982 valor-P = 0.107679

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El StatAdvisor

Esta opción ejecuta una prueba-t para comparar las medias de las dos muestras. También construye los intervalos, ó cotas, de confianza para cada media y para la diferencia entre las medias. De interés particular es el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde -0.00736969 hasta 0.0573697. Puesto que el intervalo contiene el valor de 0, no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, con un nivel de confianza del 95.0%.

ANEXO 5: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

PRIMERO: Resumen de análisis

ANOVA SIMPLE- RENDIMIENTO POR TRATAMIENTO	
Variable dependiente	Rendimiento de aceite esencial
Factor	Método de extracción
Número de Observaciones	9
Número de niveles	3

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para RENDIMIENTO. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de RENDIMIENTO para los 3 diferentes niveles de METODO DE EXTRACCION. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

SEGUNDO: Tabla ANOVA

TABLA ANOVA PARA RENDIMIENTO POR TRATAMIENTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.939756	2	0.469878	542.17	0.0000
Intra grupos	0.0052	6	0.000866667		
Total (Corr.)	0.944956	8			

La tabla ANOVA descompone la varianza de RENDIMIENTO en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 542.167, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de RENDIMIENTO entre un nivel de METODO DE EXTRACCION y otro, con un nivel del 5% de significación.

TERCERO: Prueba de Múltiple Rangos para Rendimiento de aceite esencial por Método de

Extracción

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Microondas	3	1.83333	X
Hidrodestilación	3	1.91667	X

Microondas y ultrasonido	3	2.55667	X
Contraste		Diferencia	Sig.
Hidrodestilación – Microondas		0.0833333	*
Hidrodestilación - Microondas y Ultrasonido		-0.64	*
Microondas - Microondas y Ultrasonido		-0.723333	*

*indica una diferencia significativa

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

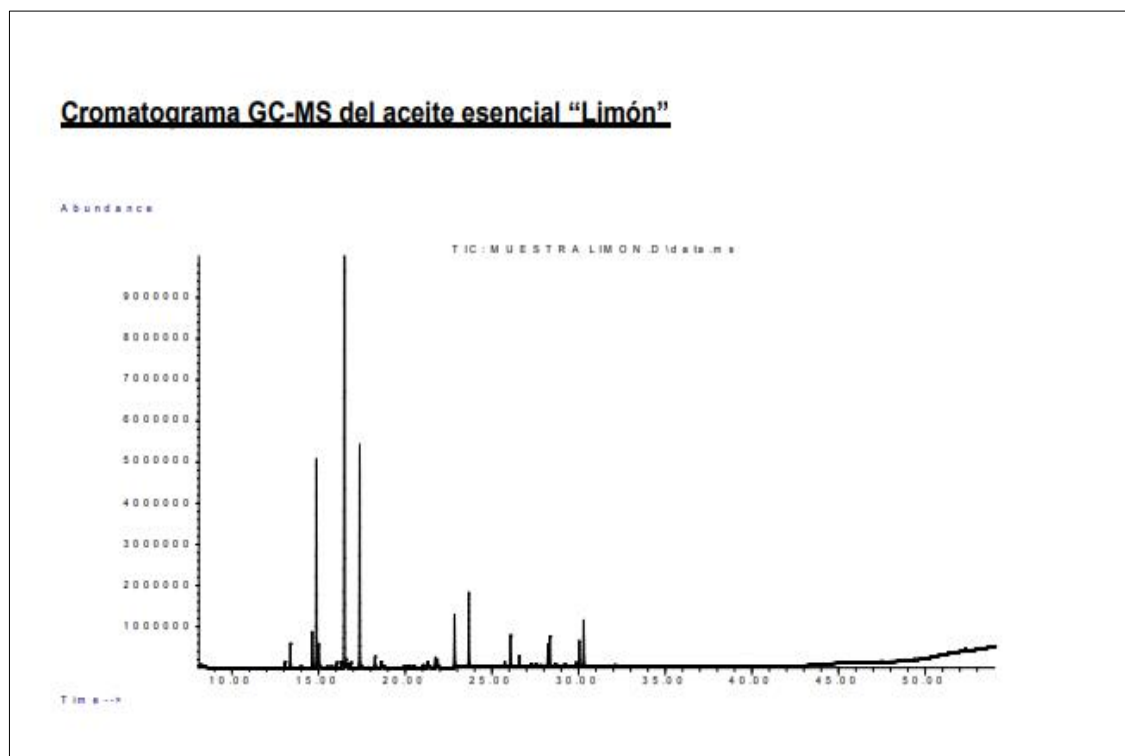
ANEXO 6: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS CON UN PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO

Se identificaron 24 compuestos que comprenden el 97.93 por ciento de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del compuesto	tR (min)	Porcentaje en la muestra
1	α -Felandreno	13.07	0.27
2	α -Pinoeno	13.38	1.21
3	Sabineno	14.63	1.82
4	β -Pinoeno	14.88	10.88
5	β -Mirceno	15.01	1.21
6	α -Terpinoeno	16.06	0.28
7	<i>p</i> -Cimeno	16.32	0.31
8	Limoneno	16.50	51.82
9	β -Felandreno	16.58	0.24
10	γ -Terpinoeno	17.37	11.66
11	Terpinoleno	18.26	0.59
12	4-Carvomentenol	21.33	0.38
13	β -Citral	22.85	2.86
14	α -Citral	23.67	4.12
15	γ -Elemeno	25.74	0.27
16	Nerol	26.07	1.67
17	Acetato de Geraniol	26.60	0.59
18	β -Elemeno	27.24	0.18
19	Aldehído láurico	27.53	0.17
20	β -Cariofileno	28.23	1.29
21	α -Bergamoteno	28.34	1.65
22	Germacreno D	29.85	0.23
23	α -Farneseno	30.04	1.51
24	β -Bisaboleno	30.30	2.72

FUENTE: Servicio prestado por la Universidad Cayetano Heredia

ANEXO 7: CROMATOGRAMA GC – MS PARA EL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS CON UN PRETRATAMIENTO ULTRASÓNICO



FUENTE: Servicio prestado por la Universidad Cayetano Heredia

ANEXO 8: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS

Se identificaron 23 compuestos que comprenden el 98.58 por ciento de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del Compuesto	Porcentaje
	Monoterpenes	88.7
1	Pinene<Alpha->	1.86
2	Pinene<Beta->	11.60
3	Myrcene<Beta->	1.40
4	Limonene	60.56
5	Terpinene<Gamma->	11.91
	Oxygenated Monoterpenes	5.11
6	Linalool	0.25
7	Citronellal	0.05
8	Terpin-4-ol	0.08
9	Terpineol<Alpha->	0.38
10	Nerol	0.20
11	Neral	1.66
12	Geraniol	0.12
13	Geranial	2.23
	Sesquiterpenes	3.56
14	Caryophellene<E->	0.56
15	Bergamotene<Alpha-Trans->	1.00
16	Humulene<Alpha->	0.13
17	Farnesene<(E)-Beta->	0.03
18	Germacrene D	0.05
19	Bisabolene<(Z)-Alpha->	0.10
20	Bisabolene(Beta-)	1.51
	Oxygenated Sesquiterpenes	0.02
21	Bisabolol<Alpha->	0.02
	Other oxygenated compounds	1.19
22	Citronellyl Acetate	0.04
23	Neryl Acetate	0.87

FUENTE: Bousbia *et al.*, (2009)

ANEXO 9: PORCENTAJE DE LIMONENO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE MICROONDAS

COMPONENT	COMPOSITION (porcentaje)
Limoneno	59.156

FUENTE: Shakir y Salih (2015)

ANEXO 10: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN (CLEVINGER)

Se identificaron 22 compuestos que comprenden el 99.35 por ciento de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del Compuesto	Porcentaje
	Monoterpenes	92.50
1	Pinene<Alpha->	1.94
2	Pinene<Beta->	13.09
3	Myrcene<Beta->	1.46
4	Limonene	63.44
5	Terpinene<Gamma->	11.17
	Oxygenated Monoterpenes	4.91
6	Linalool	0.36
7	Citron ellal	0.05
8	Terpin-4-ol	0.19
9	Terpineol<Alpha->	0.37
10	Nerol	0.13
11	Neral	1.55
12	Geraniol	0.07
13	Geranial	2.05
	Sesquiterpenes	1.92
14	Caryophellene<E->	0.31
15	Bergamotene<Alpha-Trans->	0.54
16	Humulene<Alpha->	0.06
17	Farnesene<(E)-Beta->	0.06
18	Bisabolene<(Z)-Alpha->	0.05
19	Bisabolene(Beta-)	0.81
	Oxygenated Sesquiterpenes	0.02
20	Bisabolol<Alpha->	0.02
	Other oxygenated compounds	0.82
21	Citronellyl Acetate	0.02
22	Neryl Acetate	0.60

FUENTE: Bousbia *et al.*, (2009)

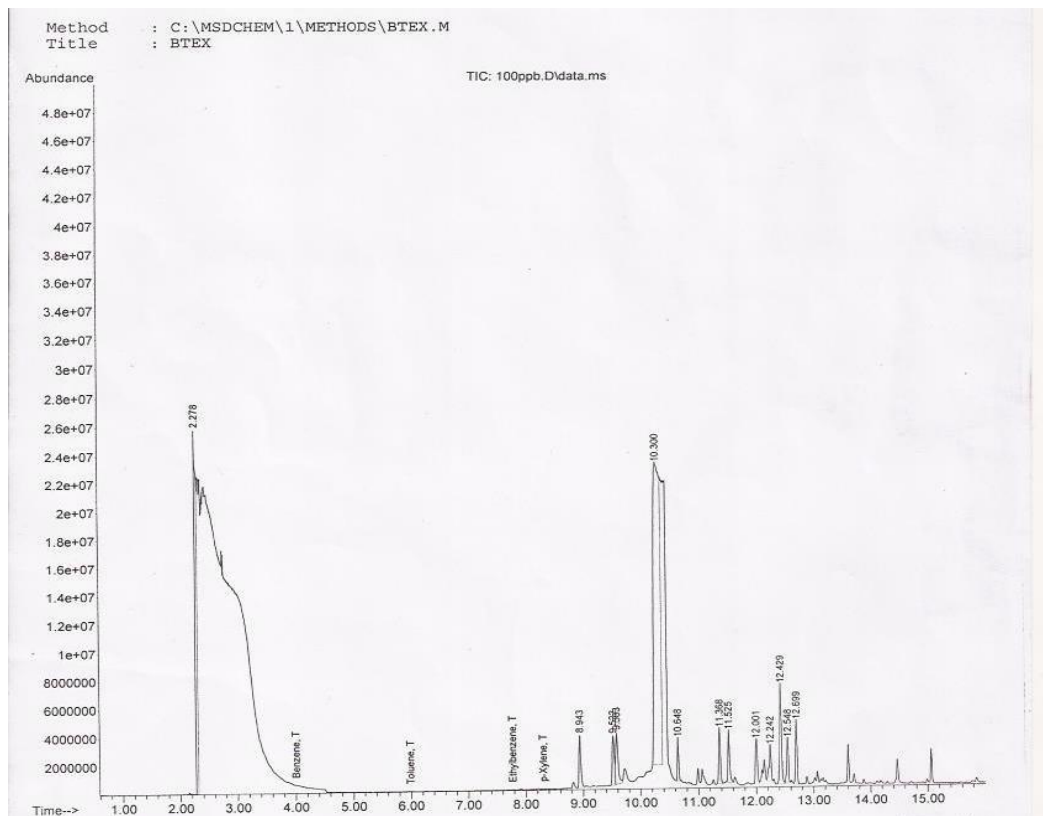
ANEXO 11: COMPONENTES Y COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DE LIMÓN SUTIL EXTRAÍDO POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN (CLEVINGER)

Se identificaron 12 compuestos que comprenden el 99.35 por ciento de la composición total del aceite esencial.

COMPONENT	COMPOSITION (porcentaje)
1R- α -Pinene	3.20
D-Limonene	64.00
1,3,8-p-Menthatriene	2.91
2-Cyclohexen-1-ol	6.21
1,4-Cyclohexadiene	2.54
2-Cyclohexen-1-one (LCarvone)	3.27
β -Phellandrene	3.52
β -Pinene	3.82
1,4-Cyclohexadiene	1.96
Cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	3.15
2-methyl-5-(1-methylethenyl)	2.97
3-Cyclohexen-1-ol	2.46

FUENTE: Njoku y Evbuomwan (2014)

ANEXO 12: FIGURA CROMATOGRÁFICA GC – MS PARA EL ACEITE ESENCIAL DE CÁSCARA DE LIMÓN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO CLEVINGER.



FUENTE: Njoku y Evbuomwan (2014)

ANEXO 13: FOTOGRAFÍAS

a) Fotos del acondicionamiento de la materia prima

Materia prima inicial



Materia prima sin albedo



Cortado de la cáscara de limón



Equipo de cortado



Cáscara de limón trozado



Pesado de la Cáscara trozada



Empacado al vacío



b) Pretratamiento ultrasónico:

Materia prima sonicándose



c) Extracción por el método de microondas

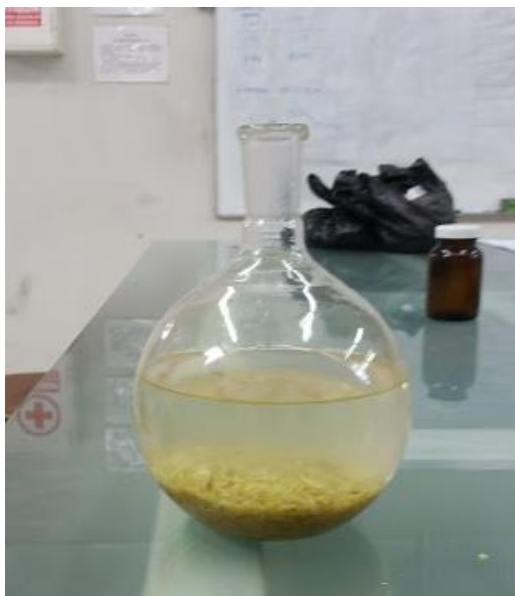
Extracción en el microondas

, Aceite esencial extraído por el microondas



d) Extracción por el método de hidrodestilación (Clevenger)

Acondicionamiento de la materia prima



Extracción



Aceite esencial extraído por clevenger



Medición del aceite esencial



Almacenamiento del aceite

