Artículo Original / Original Article

Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*), y el efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana

Solvent free microwave extraction of orange essential oil (*Citrus sinensis*), and the effect of the process conditions in its yield, composition and antimicrobial activity

RESUMEN

La extracción asistida por microondas (MAE por sus siglas en inglés) es una técnica eco amigable relativamente nueva que ha recibido una atención creciente debido a su menor tiempo de extracción y consumo de energía, mayor rendimiento de compuestos de interés y menor consumo de disolvente; a diferencia de técnicas convencionales de extracción, que implican elevados gastos de energía y tiempo. Así mismo, subproductos de industrias como cáscaras de cítricos, son desechados en grandes cantidades, no aprovechándose las propiedades funcionales sus compuestos. En esta investigación se realizó la extracción de aceite esencial a partir de cáscara de naranja, por microondas libre de solventes (SFME por sus siglas en inglés), a diferentes condiciones de potencia (400, 800 W, y sus combinaciones). El objetivo fue evaluar el efecto de las diferentes condiciones de proceso sobre el rendimiento del aceite esencial extraído, sobre su composición química y actividad antimicrobiana. Los más altos rendimientos de extracción correspondieron a los aceites extraídos a 400 W y a 800/400 W, siendo este último el que conllevó un menor gasto de energía y emisión de CO₂. En general, todos los aceites extraídos presentaron los mismos compuestos mayoritarios (limoneno, β- mirce- no, linalool y α- pineno), mientras que el aceite sometido a 400 W, presentó cantidades menores de 0,23% de 5 compuestos minoritarios adicionales. Sobre la actividad antimicrobiana, se detectó mayor actividad contra *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) respecto a *Escherichia coli* (ATCC 8739) en todos los tratamientos.

Palabras clave: Aceite esencial; Actividad antimicrobiana; Extracción asistida por microondas; Monoterpenos; Mé- todo verde.

ABSTRACT

Microwave assisted extraction (MAE) is a relatively new ecofriendly technique that has received increasing attention due to its reduced extraction time and energy consumption; higher yield and lower solvent consumption; unlike conventional extraction techniques, which involve higher energy costs and greater time. Likewise, industry by-products such as citrus peels are disposed of in large quantities, thus

Catherina Cordova^{1*}, Juan Guillén², Tarsila Tuesta^{1*}.

1. Grupo de Investigación en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química y Textil-Universidad Nacional de Ingeniería (GIA-FIQT-UNI), Lima, Perú.
2. Facultad de Biología- Universidad Mayor de San Marcos, Lima- Perú.

*Dirigir correspondencia: Catherina Cordova o Tarsila Tuesta.
Grupo de Investigación en Alimentos,
Facultad de Ingeniería Química y Textil-Universidad Nacional
de Ingeniería (GIA-FIQT-UNI),
Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú.
E-mail: ccordovaf@uni.pe / tarsilat@uni.edu.pe

Este trabajo fue recibido el 26 de mayo de 2020.
Aceptado con modificaciones: 07 de septiembre de 2020.
Aceptado para ser publicado: 21 de septiembre de 2020.

functional properties of their compounds are left unused. In the present investigation, solvent-free microwave extraction (SFME) was used to obtain orange peel essential oil at different power conditions (400, 800 W, and their combinations). The aim was to evaluate the effect of the process on the yield, composition and antimicrobial activity of the essential oil obtained. The highest extraction yields were obtained using powers of 400 and 800/400 W, corresponding the minor energy and CO₂ emission generated to the latter. In general, all oils had the same major components (limonene, β- myrcene, linalool and α- pinene), with the oil obtained at 400 W having, in addition, five minor compounds, in amounts less than 0.23%. Regarding antimicrobial activity, in general, greater activity against *L. monocytogenes* (ATCC

19115) was detected in comparison with *E. coli* (ATCC 8739) in all treatments.

Keywords: Antimicrobial activity; Essential oil; Green method; Microwave assisted extraction; Monoterpenes.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales de plantas aromáticas, son productos necesarios para diferentes industrias, como la industria de alimentos, cosméticos, perfumes, farmacéutica y medicinal; teniendo aplicación debido principalmente a sus propiedades antisépticas, antibacterianas y antioxidantes; e incluso como insecticidas y acaricidas¹, y contra infecciones bacterianas fitopatógenas².

Esto aunado a la actual tendencia creciente de consumo de productos naturales, con propiedades funcionales³, que juegan un rol esencial en el cuidado a la salud, siendo la base de la medicina tradicional⁴; y de la necesidad de obtener menores desperdicios en las industrias, como partes de plantas o alimentos que hoy en día se consideran desechos pero que podrían considerarse subproductos con alto valor nutricional⁵; hace de los aceites esenciales una opción atractiva para el aprovechamiento de plantas nativas que tienen conocidas propiedades terapéuticas, que permiten la utilización de las cáscaras de cítricos como subproductos industriales.

A nivel mundial, en el 2018 se produjo 84,8 Mt de naranja aproximadamente⁶. Se estima que más del 40% de naranjas son procesadas por la industria de alimentos cada año. Esto genera grandes cantidades de residuos de cáscara de naranja⁷ (6,8 Mt considerando que la cáscara representa el 20% del peso del fruto aproximado), en lugar de obtener un producto de mayor valor agregado.

Sin embargo, los métodos convencionales para obtener aceite esencial, como la extracción por arrastre de vapor y la hidrodestilación, que involucran altas temperaturas, tiempos prolongados y altos consumos de energía; pueden ir en perjuicio de los componentes bioactivos que éstos contienen⁸.

Por otra parte, se cuenta con una tecnología emergente, catalogada como “método verde”¹, ya que requiere menos operaciones unitarias, mano de obra, tiempo de extracción y gasto de energía, y resulta en mejores rendimientos^{1,9}. Se trata de la extracción asistida por microondas (MAE), que incluso, es reconocida como una técnica que aumenta la calidad de los aceites esenciales, reduce el consumo de solventes, y por ende disminuye la contaminación y costos de recuperación del producto final¹⁰. Estudios anteriores han revelado que las condiciones de proceso, tienen impacto en el rendimiento y características del aceite esencial a obtener^{7,9,11}.

En esta investigación, se estudió el proceso de extracción de aceite esencial de cáscara de naranja asistido por microondas libre de solventes a diferentes potencias (en una y dos etapas), evaluando el rendimiento de extracción de los aceites obtenidos, su composición y actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Las naranjas (*Citrus Sinensis* var. Valencia) empleadas fueron adquiridas en el Mercado Modelo de frutas, en Lima, Perú. Las frutas estaban en estado de madurez intermedio (color 3 según la Norma Técnica Colombiana 4086:1997). La cáscara fue cortada y picada en piezas de 0,6 cm² aproximadamente. Se analizó el contenido de humedad de la materia prima por el método de desecación por estufa¹².

Extracción por microondas libre de solvente

El aceite esencial de cáscara de naranja fue extraído por microondas libre de solvente (SFME), en un equipo microondas MILESTONE modelo NEOS (fabricado por Milestone S.r.l), con una máxima potencia de salida de 900 W, a 2450 MHz., con incrementos variables de potencia de 1 W. Durante el experimento, la temperatura, tiempo y potencia fueron monitoreados por el equipo. La temperatura del agua de refrigeración fue de 5 °C.

Para el proceso de extracción, 500 g de cáscara de naranja previamente cortada y picada, se colocó en un envase cilíndrico de 2 litros de capacidad.

El agua contenida en la muestra se calentó por la interacción con las ondas electromagnéticas producidas por el equipo, haciendo que las glándulas y receptáculos oleíferos estallen, liberándose el aceite esencial¹³. La mezcla de vapor de agua y aceite pasó a través del condensador dispuesto sobre el equipo. Después de la condensación, la mezcla fue decantada para la separación del aceite. Se secó el aceite esencial extraído con sulfato de sodio anhidro, y se almacenó a 4 °C hasta su uso^{9,10,13}.

El equipo microondas se programó según los experimentos detallados en la tabla 1, a una etapa: a 800 y 400 W; y a dos etapas: empleando potencias de 800 y 400 W sucesivamente y viceversa. Se dio por concluida la extracción cuando los rendimientos adicionales fueron inferiores a 0,1%; esto fue a los 20, 30, 35 y 55 minutos para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Las extracciones fueron realizadas por triplicado por cada tratamiento establecido.

Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción se calculó en base seca, como el porcentaje de la masa obtenida de aceite esencial sobre la masa del peso seco de la cáscara de naranja empleada, como se detalla en la ecuación 1¹⁴.

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

(Ecuación 1)

Consumo de Energía

El consumo de energía para obtener aceite esencial de la cáscara de naranja, fue calculado según la ecuación 2, que considera: potencia de salida del microondas y tiempo de extracción, considerándose este último como el tiempo en el que se extrae la mayor cantidad de aceite esencial según lo señalado en la tabla 2, ya que el tiempo remanente se consideró como un periodo no productivo¹.

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

(Ecuación 2)

El consumo específico de energía, por gramo de aceite extraído, se calculó según la Ecuación 3¹.

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

(Ecuación 3)

Emisión CO₂

El impacto ambiental se estimó calculando la cantidad de CO₂ emitida. Considerando que para obtener 1 kWh de energía a partir de carbono o combustible, 800 g de CO₂ serán liberados en la atmósfera durante su combustión¹, la emisión de CO₂ se calculó de acuerdo a la ecuación 4¹.

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

(Ecuación 4)

Para la emisión de CO₂ por gramo de aceite esencial extraído bajo los diferentes tratamientos, se aplicó la Ecuación 5¹.

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

(Ecuación 5)

Análisis químicos

Los aceites esenciales fueron analizados por cromatografía de masas acoplado a espectrofotómetro de masas (GC- MS) (Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C), usando una columna capilar J&W. Phase DB- 5ms, 60 m de largo x 250 µm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de film.

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

Los constituyentes de los aceites esenciales se identificaron comparando el índice de retención relativa y los espectros de masas con los de los compuestos de la biblioteca de espectros de masas NIST08 L. Los análisis fueron ejecutados por triplicado.

Actividad antimicrobiana

La técnica de disco difusión¹⁵ fue empleada para calcular la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Se emplearon dos cultivos bacterianos: uno Gram positivo: *Listeria Monocytogenes* (ATCC 19115) y uno Gram negativo: *Escherichia Coli* (ATCC 8739). Una suspensión de la bacteria analizada (0,1 mL de 10⁶ UFC/mL) fue inoculada en las placas previamente llenadas con medio sólido (Agar Plate Count). Discos de papel filtro (6 mm de diámetro) fueron cargados con 50 µL de aceite, colocados en las placas inoculadas e incubados a 37 °C por 24 h. El aceite esencial se difunde en el agar y evita el crecimiento microbiano en su área de acción¹⁴. Se miden las áreas claras alrededor del disco, que marcan la zona de inhibición, y una mayor área clara muestra una mayor eficacia antimicrobiana del aceite esencial. Los diámetros de las zonas de inhibición fueron medidos en mm. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Análisis estadístico

En la tabla 1 se detallan los tratamientos desarrollados en la presente investigación, los cuales constituyen 4 tratamientos en total. Cada variable de respuesta (rendimiento, composición química y actividad antimicrobiana) fue testeada por triplicado. Se calcularon las medias y desviaciones estándares. Un diseño completamente al azar (DCA) fue empleado para determinar si hay diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (p<0,05) mediante un análisis de varianza (ANOVA), comprobándose los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de residuos, previamente. Posteriormente, para evaluar cuales son los tratamientos diferentes entre sí, el test de Tukey fue aplicado entre las medias de los tratamientos. Se empleó el paquete estadístico Minitab 18 para el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Tabla 1. Tratamientos desarrollados.

Ti (i=1,...,4)	Número de etapas	Condiciones de extracción (Potencia y tiempo)
T1	1	800 W hasta 20 minutos
T2	1	400 W hasta 60 minutos
T3	2	1° Etapa: 800 W por 5 minutos. 2° Etapa: 400 W hasta 30 minutos
T4	2	1° Etapa: 400 W por 25 minutos. 2° Etapa: 800 W hasta 10 minutos

RESULTADOS

Rendimiento de extracción

La figura 1 muestra el rendimiento obtenido de aceite esencial de naranja en función del tiempo para el Tratamiento 2 (800/ 400 W). Se pudieron observar tres fases distintas en las cinéticas de extracción de todos los tratamientos: AB, BC y CD.

Figura 1: Rendimiento de extracción del aceite esencial de naranja a 800/ 400 W en función del tiempo.

En base a lo observado en la tercera etapa CD y dando por concluida la extracción cuando los rendimientos fueron inferiores a 0,1%, se establecieron tiempos de extracción de 20, 30, 35 y 55 minutos para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Respecto a los rendimientos obtenidos de aceite esencial, el menor rendimiento de extracción se observó en el tratamientos 1 (800 W) seguido del tratamiento 3 (400/800 W). Los tratamientos 2 (800/400 W) y 4 (400 W) presentaron rendimientos mayores ($p < 0,05$), y sin diferencia significativa entre sí mismos. Estos resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos de extracción y rendimientos de los aceites esenciales obtenidos.

Tratamiento	Tiempos totales de extracción (min)	Rendimiento (%) en base seca (b.s.)
Trat. 1 (800 W)	20	3,1±0,1 ^c
Trat. 2 (800 W/ 400 W)	30	3,6±0,1 ^a
Trat. 3 (400 W/ 800 W)	35	3,3±0,0 ^b
Trat. 4 (400 W)	55	3,6±0,1 ^a

^{a, b, c} Valores que comparten la misma letra no son significativamente diferentes entre sí. Los valores de rendimiento son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Consumo de energía y emisión de CO₂

En la figura 2 se muestra el consumo de energía y emisión de CO₂ que requirieron y conllevaron los tratamientos estudiados, correspondiendo el mayor consumo de energía al tratamiento 4 (0,367 kW-h), seguido del tratamiento 3 (0,300 kW-h), tratamiento 1 (0,267 kW-h) y tratamiento 2 (0,233 kW-h).

Respecto al impacto ambiental, la cantidad calculada de emisión de dióxido de carbono emitido en la atmósfera presentó la misma tendencia que el consumo de energía. El tratamiento 4 presentó la mayor emisión (293 g CO₂), seguido del tratamiento 3 (240 g CO₂), tratamiento 1 (213 g CO₂), y tratamiento 2 (186 g CO₂).

Composición del aceite esencial

Según los resultados obtenidos y detallados en la tabla 3, la composición de los aceites, según los tratamientos empleados, están constituidos: entre 98,4 y 99,5% de monoterpenos hidrocarburos; 0,47- 1,30% de monoterpenos oxigenados y 0- 0,26% de otros compuestos aldehídos.

Figura 2: Consumo de energía (kW-h) y Emisión de CO2.

Tabla 3. Composición química de los aceites esenciales de naranja.

	TRATAMIENTO							
	Trat. 1 (800 W)		Trat. 2 (800 W/ 400 W)		Trat. 3 (400 W/ 800 W)		Trat. 4 (400 W)	
	t _r (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t _r (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t _r (min.)	% en la muestra (áreas relativas)	t _r (min.)	% en la muestra (áreas relativas)
α- Pineno	12,3	0,42±0,02	12,3	0,38±0,11	12,3	0,37±0,07	12,3	0,59±0,09
Sabineno	-	-	-	-	-	-	13,3	0,23±0,03
β- Mirceno	13,6	1,81±0,07	13,6	1,77±0,10	13,6	1,81±0,04	13,6	2,47±0,29
Octanal	-	-	-	-	-	-	14,0	0,08±0,02
D- Limoneno	14,9	96,83±0,32	14,9	97,33±0,17	14,9	97,32±0,17	14,9	95,11±0,75
Terpinoleno	-	-	-	-	-	-	16,4	0,05±0,01
Linalool	16,6	0,96±0,37	16,6	0,51±0,07	16,6	0,47±0,11	16,6	1,25±0,25
α- Terpineol	-	-	-	-	-	-	19,3	0,05±0,0
Decanal	-	-	-	-	-	-	19,3	0,18±0,06
Monoterpenos		99,22±0,37		99,49±0,07		99,51±0,08		98,44±0,33
hidrocarburos								
Monoterpenos		0,78±0,37		0,51±0,07		0,47±0,11		1,30±0,26
oxigenados								
Otros (aldehidos)	-	-	-	-	-	-		0,26±0,07

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja

En la tabla 4 se muestra la actividad antimicrobiana que cada uno de los aceites exhibió contra *L. Monocytogenes* (Gram positiva) y *E. coli* (Gram negativa).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de naranja obtenidos.

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

a, b, c Valores que comparten la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes entre sí.

DISCUSIÓN

Rendimiento de las extracciones realizadas por SMFE

El mecanismo de extracción por microondas se fundamenta en la fuerte absorción de energía por el agua *in situ*, lo que proporciona el aumento de temperatura al interior de la muestra y, por ende, la ruptura de las células de aceite esencial por el agua *in situ*¹³.

En cuanto a las diferentes etapas de extracción (AB, BC y CD), mostradas en la figura 1, se observa lo siguiente:

- La primera fase AB, está representada por una línea creciente. En esta primera fase se observan las pendientes más inclinadas en todos los tratamientos, lo que indica que la mayor parte de aceite esencial es extraído durante esta etapa. Esto se debe a la facilidad de extracción de las primeras cantidades, ubicadas en la superficie de las células vegetales¹⁶. En general, ésta primera fase, es más prolongada en los tratamientos que inician a 400 W (tratamiento 3 y 4), respecto a los que inician a 800 W (tratamientos 1 y 2). Esto se vincula con el menor tiempo requerido por los tratamientos que inician con alta potencia (800W), para alcanzar la temperatura de ebullición (3,9 y 3,8 minutos para los tratamientos 1 y 2 respectivamente) –definido como tiempo de demora (t_{cut}), donde las primeras gotas de aceite empiezan a aparecer– respecto a los tratamientos que inician

con baja potencia (400W), donde los t_{cut} son 7,6 y 7,7 minutos para los tratamientos 3 y 4 respectivamente. A mayores niveles de potencia, la temperatura se incrementa más rápido, consumiendo menos tiempo¹⁷.

- La segunda fase BC está marcada por una segunda línea en aumento de menor pendiente. Esta fase representa la difusión interna del aceite esencial desde el centro de las partículas hacia el medio externo, involucrado con el calentamiento interno del agua situado en las células de la planta¹⁸.
- La tercera fase CD está representada por una línea de menor inclinación, casi horizontal al final, lo cual marca el final de la extracción.

Los rendimientos obtenidos por SFME (en base seca) se encuentran entre 3,1 y 3,6% (Tabla 2); siendo estos valores mayores que los obtenidos en un estudio al someter tres diferentes variedades de cáscaras naranja a MHG (hidrodifusión por microondas y gravedad), donde los rendimientos estuvieron entre 0,9 y 1,2%¹⁹; y que el rendimiento reportado en otro estudio (1,8% en base seca) de aceite esencial *Navel Navelate* extraído por MAHD⁷.

El menor rendimiento obtenido en el tratamiento 1, el cual se llevó a cabo a 800 W durante toda la extracción. Esto puede relacionarse con el hecho de que la alta potencia de microondas aumenta la temperatura del sistema, lo que resulta en menores rendimientos de extracción de compuestos termo sensibles²⁰. Una potencia alta podría resultar en pérdida de compuestos volátiles¹⁹. Esto podría deberse a que potencias elevadas promueven un aumento de temperatura más rápido, de manera que en algunos casos el sistema de refrigeración no es capaz de condensar todo el vapor a la misma velocidad y puede dar lugar a la pérdida de compuestos volátiles⁹. Así mismo, esta pérdida también podría deberse a que un cambio brusco de temperatura resulta en una descomposición térmica⁸.

Esto último podría relacionarse a su vez con el bajo rendimiento obtenido en el tratamiento 3, debido probablemente, a la descomposición térmica mencionada en el párrafo anterior, en los últimos 10 minutos de extracción, donde el material fue llevado de 400 W a 800 W.

Por otro lado, es en los tratamientos 2 y 4 en donde se obtuvo un mayor rendimiento de extracción. En el primer caso, la extracción inicia a una potencia alta (800 W) durante 5 minutos, de los cuales 3,8 minutos corresponden al tiempo de demora (t_{cut}). Este tiempo es similar al t_{cut} del tratamiento 1 (3,9 minutos).

En un estudio se explicó que el mecanismo de transferencia de masa de aceite esencial de maza de nuez moscada por hidrodestilación asistida por microondas (MAHD por sus siglas en inglés) es controlado por difusión intra- partícula siguiendo la ley de Fick. En este caso, el coeficiente de difusión (D_e) para una potencia de 800 W ($1,65 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$) es mayor que para una de 600 W ($1,39 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$). Consecuentemente, el rendimiento de extracción durante los 10 primeros minutos fue mayor para el proceso llevado a cabo a 800 W, en comparación

al de 600 W. Situación contraria ocurrió a los 15 y 20 minutos, donde el rendimiento fue mayor en el caso de la extracción realizada a 600 W respecto a la de 800 W. A mayor potencia, mayor será la energía absorbida por el material, la cual es convertida en calor, por lo que, en una primera fase, mayores rendimientos se obtendrán²¹.

Esto se relaciona con el hecho de que al iniciar el proceso con una alta potencia (800 W), se haya reducido el tiempo de demora, y obtenido mayores rendimientos durante los primeros 5 minutos, respecto a los tratamientos iniciados con una menor potencia (400 W), en donde la extracción de las primeras gotas aún no iniciaba.

Luego, al reducir la potencia a 400 W, se estaría evitando las pérdidas de compuestos volátiles mencionados anteriormente por lo cual se obtendría un mayor rendimiento de extracción.

En el caso del tratamiento 4, donde se obtuvo un rendimiento de extracción similar al del tratamiento 2, y superior al de los tratamientos 1 (800 W) y 3 (400/ 800 W); se emplea una baja potencia de extracción (400 W) durante todo el proceso, siendo este tratamiento el que requiere mayor tiempo de extracción (55 minutos), ya que, al aplicar una menor potencia, se transfiere energía de forma más lenta al proceso, siendo el $t_{\text{cut}} = 7,7$ minutos.

En un estudio sobre la extracción de aceite esencial de cáscara de pomelo por SFME, se recomendó una baja potencia de extracción por un tiempo prolongado, en donde se tuvo el mayor rendimiento¹¹.

El tiempo es el principal parámetro que incide en la eficiencia de extracción. Aunque extender el tiempo de irradiación conduce a un ligero aumento en el rendimiento del aceite esencial, prolongar aún más este tiempo, resulta en poca volatilización y descomposición⁸. Esto último coincide con lo observado en el tratamiento 4, donde a partir del minuto 55 el rendimiento está por debajo del 0,1%.

Consumo de energía y emisión de CO₂

El tratamiento que requirió mayor consumo de energía y emitió mayor cantidad de CO₂ fue el 4 (400 W), precisamente el tratamiento que resultó en uno de los rendimientos de extracción más altos, similar al rendimiento del tratamiento 2 (800/400 W), con la diferencia que en este último es donde se obtuvo el menor consumo de energía y emisión de CO₂.

Consumos similares de energía fueron mencionados en estudios previos, donde se calcularon consumos de 0,67 kWh por HD y 0,30 kWh por MAHD y SFME, para la producción de aceite esencial de cáscara de limón¹⁰; y donde se refiere un costo reducido de extracción en términos de tiempo y energía para el método de hidrodifusión por microondas y gravedad (MHG por sus siglas en inglés); ya que este requirió 0,2 kWh para llevar a cabo la extracción de aceite esencial de romero, mientras que el mismo proceso de extracción por HD consumió 3 kWh¹⁸.

Respecto al impacto ambiental, se han reportado diferentes valores de emisión de CO₂ dependiendo de la matriz y método de extracción empleado. En uno de ellos

se obtuvo una emisión de 160 g durante la obtención de aceite esencial a partir de cáscara de naranja por MHG¹⁹. A su vez, se ha calculado una emisión de 472 g CO₂ por gramo de aceite esencial de semillas de hinojo, extraído por SFME¹⁶, y un valor de 25 g CO₂ por gramo de aceite esencial de lavanda, extraído por microondas²².

Las técnicas de extracción por microondas como MAHD y SFME son considerados como métodos de extracción "verdes", debido al bajo consumo de energía que requieren¹⁰. Según los resultados obtenidos, variando las condiciones de proceso, se pueden incurrir en aún más ahorros de energía y emisión de CO₂, por lo que se puede afirmar que la reducción de tiempo de extracción usando dos potencias en un mismo proceso es claramente ventajoso.

En un estudio previo se había mencionado que sus resultados llevarían a creer que en lugar de aplicar una potencia constante sobre el tiempo de extracción (lo que conduce a un procedimiento menos eficiente), sería más beneficioso para el proceso de extracción aplicar la energía de microondas en (al menos) dos etapas diferentes para i) Ahorrar costos de energía y ii) aumentar el rendimiento del aceite esencial⁷. Los resultados obtenidos en esta investigación confirmarían esta teoría.

Composición del aceite esencial

En los tratamientos 1, 2 y 3 se identificaron 4 compuestos que constituyen el 100% de los aceites esenciales. En el tratamiento 4 se identificaron 9 compuestos que constituyen el 100% del aceite esencial. Esto podría atribuirse a que este último tratamiento al haber sido llevado a cabo a una baja potencia constante, los efectos térmicos e hidrolíticos fueron menores. La prolongación del tiempo de extracción sería útil para completar la extracción de los compuestos objetivo cuando la potencia de los microondas permanece baja¹¹.

Los principales componentes de los aceites extraídos fueron los mismos en todos los tratamientos: Limoneno (95,11- 97,33%), seguido de β - Mirceno (1,77- 2,47%), Linalool (0,47- 1,25%) y α - Pineno (0,37- 0,59%). Limoneno, linalool y pinenos se encuentran en diversos aceites esenciales, de hecho, muy pocos no contienen ninguno de éstos²³.

Esta composición es similar a la reportada en estudios anteriores, donde al caracterizar aceites esenciales obtenidos de cáscara de tres variedades diferente de naranja por MHG encontraron entre 97,57 y 98,33% de Monoterpenos hidrocarburos (principalmente por: 94,64- 95,20% de Limoneno; 1,64- 1,85% de β -Mirceno; 0,43-0,46% de α - Pineno); entre 0,67- 0,99% de Monoterpenos oxigenados (principalmente: 0,41- 0,88% de Linalool; 0,06-0,09% de α - Terpeneol), Sesquiterpenos (0,11- 0,19%), Sesquiterpenos oxigenados (0-0,08%) y otros compuestos oxigenados (0,23- 0,43%)¹⁹.

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de naranja

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema relevante de Salud Pública por

su incidencia, severidad y costos asociados. Siendo la inocuidad una característica no aplicable a simple vista, el consumidor no tiene modo de conocer esta cualidad en los alimentos sólo basándose en la apariencia del producto²⁴.

En el presente estudio, se emplearon cepas de *Listeria Monocytogenes* (ATCC 19115) y *Escherichia coli* (ATCC 8739). Ambas bacterias están ampliamente difundidas en la industria alimentaria. *L. monocytogenes* es un microorganismo altamente patógeno asociado a enfermedades de transmisión alimentaria en todo el mundo. La presencia de *Escherichia coli* en alimentos refleja ineficiente higiene durante su elaboración o manipulación²⁵.

Basándonos en la escala de medición donde una zona de inhibición ≥ 20 mm es fuertemente inhibitoria; una zona de inhibición <20 -12 mm es moderada/medianamente inhibitoria; y una zona de inhibición < 12 mm es no inhibitoria²⁶; se puede decir que tanto en el caso de *L. Monocytogenes* como de *E. coli*, se obtuvo una actividad antimicrobiana moderada (<20 -12mm) en todos los tratamientos.

Diversos estudios han informado sobre la actividad antibacterial de aceites esenciales contra un amplio espectro de microorganismos. El aceite esencial de *Senecio graveolens* posee actividad antibacterial contra *S. aureus* y *E. coli*, siendo mayor esta actividad contra *S. aureus*²⁷. El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith tiene actividad antibacteriana significativa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*²⁸. Algunos estudios han demostrado inhibición y reducción en el número de patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, y *L. monocytogenes* por aceites esenciales cítricos²⁹. Un aceite esencial de naranja obtenido por hidrodestilación, presenta actividad antibacterial contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. epidermidis*; sin embargo, no obtuvieron actividad contra *E. coli*³⁰.

La actividad antibacterial de los aceites esenciales tiene relación con su característica de hidrofobicidad, lo cual representa su habilidad de reaccionar con lípidos en la membrana bacteriana. Esto incrementa la permeabilidad de la membrana, perturba la estructura original de la célula y rompe homeostasis. Cuando hay una cantidad sustancial de fuga del contenido celular de la bacteria, éstas se convierten susceptibles a la muerte celular¹⁵.

Otros autores sugieren que la actividad antibacteriana es producida por las interacciones provocadas por los aceites esenciales en los sistemas enzimáticos relacionados con la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales de las células bacterianas. Por otra parte, se sugiere que los constituyentes de aceites esenciales cruzan la membrana bacteriana, interactuando sus enzimas y proteínas, produciendo por lo tanto, un flujo de protones hacia el exterior de la célula, lo que provoca cambios celulares y, por último, la muerte celular. También se ha revelado que la actividad antimicrobiana está vinculada a la habilidad de los terpenos de alterar la permeabilidad y

otras funciones de la membrana, estos compuestos podrían cruzar las membranas celulares, ingresando entonces a la célula e interactuando con sitios críticos intracelulares³¹.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor actividad sobre *L. Monocytogenes* en comparación con *E. coli* (Tabla 4). En general, fitoquímicos y aceites esenciales tienen una mejor actividad antimicrobiana en microorganismos Gram- positivos, como *L. Monocytogenes*. Microorganismos Gram- negativos, como *E. coli*, poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que es casi impermeable a componentes lipofílicos, previniendo entonces que varios componentes antimicrobianos del aceite esencial la penetren. Las enzimas hidrolíticas presentes en su espacio periplásmico pueden también ayudar en la hidrolización de sustancias antimicrobianas^{15,32}. Por otro lado, las bacterias Gram-positiva no tienen esta barrera, pudiendo los componentes hidrofóbicos del aceite esencial contactar directamente con la bicapa fosfolípida de la membrana bacteriana y causar el aumento de permeabilidad iónica y fugas de constituyentes intracelulares. Sin embargo, los aceites esenciales pueden aún actuar en las bacterias Gram- negativa debido a la presencia proteínas porina en la membrana externa que crea canales suficientemente largos para permitir el paso de componente de poca masa molecular¹⁵. Otros autores también encontraron que la actividad antibacteriana de aceites esenciales de cítricos en bacterias Gram positiva fue mayor que en las Gram negativas²⁶.

Los tratamientos 2, 3 y 4 exhibieron la mayor actividad contra *L. Monocytogenes*, no presentando diferencias estadísticas entre sí, pero si respecto al aceite correspondiente al tratamiento 1, quien presentó la menor actividad contra esta bacteria. Por otro lado, la mayor actividad contra *E. coli* corresponde a los aceites obtenidos por los tratamientos 1 y 2, seguido de los tratamientos 3 y 4 respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas entre los aceites de los tratamientos 2 y 3.

Según la literatura, hay una correlación entre la actividad antimicrobiana y la composición de los aceites esenciales³³. Respecto al hecho de que los aceites obtenidos por el tratamiento 4 y 1 posean una de las mayores actividades contra *Listeria Monocytogenes* y *E. coli* respectivamente, podría relacionarse con su mayor contenido ligero de monoterpenos oxigenados (Linalool en ambos casos y α -Terpineol adicionalmente en el aceite del tratamiento 4).

Ciertos estudios han demostrado que los monoterpenos oxigenados tienen una mayor actividad antimicrobiana que los hidrocarburos²⁶. Al respecto, algunos autores han relacionado la fuerte actividad antimicrobiana del aceite esencial de betel, con la mayor cantidad de Linalool presente en este aceite; mencionando que el Linalool muestra una fuerte actividad antimicrobiana contra cultivos bacterianos como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*³³. Se ha hecho referencia además a las propiedades antimicrobianas de este compuesto contra *L. monocytogenes*. De igual manera, el α -Terpineol tiene un efecto importante en *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*²⁹.

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

Muchas publicaciones han revelado que los aceites esenciales que poseen limoneno como fitoquímico prominente, tienen actividad antimicrobiana contra varias especies de microorganismos³².

Los resultados de los experimentos realizados en membranas bacterianas artificiales evidencian que el limoneno es capaz de incorporarse en el sistema lipídico y alterar sus propiedades, sin embargo, la fluidización inducida por el aceite esencial es determinada por la concentración de limoneno, modelo de la composición de membrana y sus propiedades³⁴.

Se ha reportado una zona de inhibición de $15 \pm 0,3$ y $25 \pm 0,7$ mm contra *L. Monocytogenes* y *E. coli* respectivamente por parte del Limoneno, partiendo de una inoculación inicial de 5 log UFC/ mL en ambos casos³⁵.

Hay que considerar que la actividad antimicrobiana, si bien está relacionada con los compuestos que forman parte de los aceites esenciales, también lo está con la interacción de los mismos³⁶. Pruebas *in vitro* indican que los terpenos son ineficientes como antimicrobianos cuando son aplicados como compuestos individuales³⁷. De igual manera, diversas investigaciones han demostrado que los aceites esenciales exhiben actividades antimicrobianas más pronunciadas que sus principales constituyentes³¹.

CONCLUSIONES

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

1. Las condiciones de proceso tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción. Los tratamientos 2 (800/ 400 W) y 4 (400 W) presentaron mayores rendimientos (3,6%); siendo el tratamiento 2, que combina dos potencias de extracción, el que conllevó menor consumo de energía (0,233 kW-h) y emisión de CO₂ (187 g).
2. La composición de los aceites esenciales de naranja, presentó en general los mismos compuestos mayoritarios: Limoneno (95,11- 97,33%), seguido de β - Mirceno (1,77- 2,47%), Linalool (0,47- 1,25%) y α - Pineno (0,37- 0,59%). El tratamiento 4 presentó adicionalmente, tres hidrocarburos oxigenados adicionales en menores cantidades (1,30% en total) y dos aldehídos (0,26% en total).
3. Todos los aceites esenciales obtenidos por SFME, presentaron actividad antimicrobiana contra *Listeria*

Monocytogenes (Gram positivo) y *Escherichia Coli* (Gram negativo). Esta actividad fue mayor contra *Listeria Monocytogenes*. Los tratamientos 2, 3 y 4 presentaron actividad similar y significativamente mayor (zona de inhibición= 17,5; 17,5 y 18,2 mm respectivamente) contra *L. Monocytogenes* respecto al tratamiento 1 (15,3 mm); y los tratamientos 1, 2 y 3 (zona de inhibición= 14,7; 14,5 y 13,5 mm) presentaron mayor actividad contra *E. coli* respecto al tratamiento 4 (12,2 mm).

4. El tratamiento 2 (800/ 400 W) mostró en general una mejor performance, ya que el aceite obtenido del mismo fue el de mayor rendimiento, con menor consumo de energía y emisión de CO₂, composición química similar en general a los demás tratamientos y los más altos valores de actividad antimicrobiana contra los dos microorganismos evaluados.

Agradecimientos. Se agradece al Grupo de Investigación en Alimentos, de la Facultad de Ingeniería Química y Textil-Universidad Nacional de Ingeniería (GIA-FIQT-UNI).

Al personal docente, administrativo y comercial que brindó las facilidades para la realización del presente trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kusuma HS, Mahfud M. Kinetic studies on extraction of essential oil from sandalwood (*Santalum album*) by microwave air-hydrodistillation method. *Alex Eng J*. 2018; 57: 1163-1172.
2. Jara-Bermeo A, Peñailillo P, San-Martín A, Malagon O, Gilardoni G, Gutiérrez M. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Azorella Spinosa* (Apiaceae) against wild phytopathogenic bacteria. *J Chil Chem Soc*. 2016; 61: 3246-3249.
3. Valenzuela C, Pérez P. Natural antioxidants obtained from fruits and vegetables and their effect over the shelf life of meat and meat products: an update. *Rev Chil Nutr*. 2016; 43: 188-195.
4. Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem*. 2004; 4: 241-265.
5. Lemus-Mondaca R, Marin J, Rivas J, Sanhueza L, Soto Y, Vera N, Puente-Díaz, L. Pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*). A review of functional attributes and by-products. *Rev Chil Nutr*. 2019; 46: 783-791.
6. FAOSTAT (Statistics Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. <http://www.fao.org/faostat/es>.
7. Bustamante J, Van Stempvoort S, García-Gallarreta M, Houghton JA, Briers HK, Budarin VL, et al. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *J Cleaner Prod*. 2016; 137: 598-605.
8. Li X-J, Wang W, Luo M, Li C-Y, Zu Y-G, Mu P-S, Fu Y-J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem*. 2012; 133: 437-444.
9. Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. Estimation of mass transfer coefficients of the extraction process of essential oil from orange peel using microwave assisted extraction. *J. Food Eng*. 2015; 170: 136-143.
10. Golmakani M-T, Moayyedi M. Comparison of heat and mass transfer of different microwave- assisted extraction methods

- of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel. *Food Sci. Nutr.* 2015; 3: 506-518
11. Chen Q, Hu Z, Yao FY-D, Liang H. Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT-Food Sci Technol.* 2016; 66: 538-545.
 12. AOAC International. *Official Methods of Analysis.* 19th Ed. Maryland- USA, 2012.
 13. Lucchesi ME, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J Food Eng.* 2007; 79: 1079-1086.
 14. Liu Z, Deng B, Li S, Zou Z. Optimization of solvent-free microwave assisted extraction of essential oil from *Cinnamomum camphora* leaves. *Ind. Crops Prod.* 2018; 124: 353-362.
 15. Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk H-G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014; 54: 625-644.
 16. Benmoussa H, Farhat A, Romdhane M, Bouajila J. Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill essential oil seeds using double walled reactor. *Arab J Chem.* 2016; 12: 3863-3870.
 17. Navarrete A, Mato RB, Cocero MJ. A predictive approach in modeling and simulation of heat and mass transfer during microwave heating. Application to SFME of essential oil of lavender. *Chem Eng Sci.* 2012; 68: 192-201.
 18. Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Petitcolas E, Meklati BY, Chemat F. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* 2009; 114: 355-362.
 19. Bousbia N, Vian MA, Ferhat M, Meklati BY, Chemat F. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *J Food Eng.* 2009; 90: 409-413.
 20. Costa SS, Garipey Y, Rocha SCS, Raghavan V. Microwave extraction of mint essential oil- Temperature calibration for the oven. *J Food Eng.* 2014; 126: 1-6.
 21. Megawati, Fardhyanti DS, Sediawan WB, Hisyam A. Kinetics of mace (*Myristica arillata*) essential oil extraction using microwave assisted hydrodistillation: Effect of microwave power. *Ind Crops Prod.* 2019; 131: 315-322.
 22. Chemat F, Lucchesi ME, Smadja J, Favretto L, Colnaghi G, Visinoni F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal Chim. Acta.* 2006; 555: 157-160.
 23. Tisserand R, Young R. *Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals.* 2nd Edition. Churchill Livingstone. El Servier. 2014
 24. Costa M, Retamal J, Rodríguez A, Chavarría P, Parra J, Contreras A, Forsythe S. Microbiological safety of commercial and artisanal fresh cheeses sold in Chillán. *Rev Chil Nutr.* 2016; 43: 172-179.
 25. Merchán N, Zurymar S, Niño L, Urbano E. Determination of the microbiological safety of artisanal cheeses according to Colombian technical standards. *Rev Chil Nutr.* 2019; 46(3): 288-294.
 26. Espina L, Somolinos M, Lorán S, Conchello P, García D, Pagán R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 2011; 22: 896-902.
 27. Ochoa K, Paredes LR, Bejarano DL, Silva RJ. Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Sci Agropecu.* 2012; 3: 291-302.
 28. Segovia IK, Suárez de la Cruz LL, Castro AJ, Suárez S, Ruiz JR. Chemical composition of essential oil from *Tagetes elliptica* Smith "chincho" and antioxidant, antibacterial and antifungal activities. *Cienc Invest.* 2014; 13: 82-87.
 29. Chávez-González M, Rodríguez-Herrera R, Aguilar C. Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance. In book *Antibiotic Resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.* Chapter 11. Editors: Kon K, Rai M. Publisher: Elsevier. 2016; 227-237.
 30. Juárez JR, Castro AJ, Jauregui JF, Lizano JV, Carhuapoma M, Choquesillo FF, et al. Chemical composition, antibacterial activity of essential oil *Citrus sinensis* L. (Sweet orange) and formulation of a pharmaceutical form. *Cienc Invest.* 2014; 13: 9-13.
 31. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control.* 2008; 19: 1130-1138.
 32. Umagiliyage AL, Becerra-Mora N, Kohli P, Fisher DJ, Choudhary R. Antimicrobial efficacy of liposomes containing D-Limonene and its effect on the storage life of blueberries. *Postharvest Biol Technol.* 2016; 128: 130-137.
 33. Madhumita M, Guha P, Nag A. Extraction of betel leaves (*Piper betle* L.) essential oil and its bio-actives identification: Process optimization, GC-MS analysis and anti-microbial activity. *Ind Crops Prod.* 2019; 138: 111578.
 34. Hąc-Wydro K, Flasiński M, Romańczuk K. Essential oils as food eco-preservatives: Model system studies on the effect of temperature on limonene antibacterial activity. *Food Chem.* 2017; 235: 127-135.
 35. Mitropoulou G, Fitsiou E, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Bardouki H, Vamvakias M, Panas P, Chlichlia K, Pappa A, Kourkoutas Y. *Citrus medica* essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. *LWT- Food Sci. Technol.* 2017; 84: 344-352.
 36. Ambrosio CMS, de Alencar SM, de Sousa RLM, Moreno AM, Da Gloria EM. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Ind Crops Prod.* 2017; 97: 128-136.
 37. Verica A, Petar K. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol. Res.* 2014; 169: 240-254.