

TESIS DE MAESTRÍA

Obtención de aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto: estudio de la influencia de variables en el rendimiento y la calidad del aceite

AUTOR

Ing. Qca. Rocío Teresita García

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ester R. Chamorro – Centro de Investigación QUIMOBÍ

CO-DIRECTOR DE TESIS

Bioq. Esp. Gustavo A. Velasco - Centro de Investigación
QUIMOBÍ

LUGAR DE TRABAJO

Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica
(QUIMOBÍ) Facultad Regional Resistencia

Resistencia, Marzo de 2014

AGRADECIMIENTOS

Gracias a **Dios** sobre todas las cosas.

A la **Universidad Tecnológica Nacional** por beneficiarme con una beca Bicentenario de Investigación y Posgrado, por la cual hoy culmino la Maestría en Ingeniería en Calidad y a mi director de beca **Ing. Alfredo Sequeira** quien me impulsó en la convocatoria 2010.

Especialmente agradezco a mis directores de tesis la **Dra. Mandhy Chamorro**, y el **Bioq. Esp. Gustavo Velasco**, por los conocimientos transmitidos y sus esfuerzos y dedicación en este trabajo.

A mis compañeros y amigos del **Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOB)** de la Facultad Regional Resistencia donde llevé a cabo parte de la investigación, especialmente a la **Ing. Silvia Zambón** e **Ing. Esp. Mariel Cáceres**.

Al Director, **Ing. Tortarollo**, y al personal de **INTA - Estación Experimental Agropecuaria Colonia Benítez**, por brindarme la materia prima y la información meteorológica del lugar.

A la Empresa **“Nuestra Esencia”** por darme la posibilidad de trabajar en base a su experiencia y permitirme transferir los conocimientos adquiridos en esta investigación.

Finalmente muchas gracias a todas las personas que de alguna manera hicieron posible la realización de esta tesis.

Dedicado a mamá
Gracias por tu incondicionalidad

INDICE

1.	INTRODUCCION.....	1
1.1	Aspectos generales.....	1
1.2.	Aceites esenciales.....	2
1.2.1.	Definición.....	2
1.2.2.	Características.....	3
1.2.3.	Origen.....	3
1.2.4.	Composición química.....	3
1.2.5.	Especies aromáticas: la citronela.....	4
1.2.6.	Producción y calidad de las esencia.....	6
1.2.6.1.	Variación genética y mejora vegetal.....	7
1.2.6.2.	Variación morfo y ontogénica.....	7
1.2.6.3.	Influencias ambientales.....	8
1.3.	Métodos de extracción.....	9
1.3.1.	Destilación por arrastre con vapor de agua.....	9
1.3.2.	Expresión.....	10
1.3.3.	Extracción con solventes.....	10
1.4.	Destilación por arrastre con vapor.....	11
1.4.1.	Escala laboratorio.....	12
1.4.2.	Escala piloto.....	13
1.4.3.	Escala industrial.....	13
1.5.	Identificación y caracterización de aceites esenciales.....	14
1.6.	Diseño de experimentos.....	15
1.6.1.	Diseño factorial completo 2^k	17
1.6.1.1.	Planteo del problema.....	18
1.6.1.2.	Identificación de los factores y dominio experimental.....	18
1.6.1.3.	Diseño de la matriz de experimentos.....	19
1.6.1.4.	Plan de experimentación y realización de los experimentos.....	19
1.6.1.5.	Interpretación de los resultados.....	20

1.6.2.	Análisis de varianza.....	20
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Objetivo principal.....	21
2.2.	Objetivos secundarios.....	21
2.3.	Tipo de investigación.....	21
3.	MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1.	Identificación botánica y condiciones meteorológicas.....	23
3.2.	Destilación por arrastre con vapor de agua: etapas del proceso.....	23
3.2.1.	Corte del material vegetal.....	23
3.2.2.	Oreado.....	23
3.2.3.	Destilación por arrastre con vapor a escala piloto.....	24
3.3.	Diseño de experimentos factorial 2^3	25
3.3.1.	Planteo del problema.....	25
3.3.2.	Factores y dominio experimental.....	25
3.3.3.	Matriz de experimentos: diseño factorial completo 2^3	27
3.3.4.	Plan de experimentación y realización de los experimentos.....	27
3.3.5.	Interpretación de los resultados.....	28
3.4.	Caracterización fisicoquímica del aceite de citronela.....	28
3.4.1.	Índice de refracción.....	28
3.4.2.	Densidad relativa.....	29
3.4.3.	Rotación óptica.....	30
3.4.4.	Composición relativa.....	30
3.5.	Determinación del rendimiento.....	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
4.1.	Identificación botánica de la materia prima.....	33
4.2.	Condiciones meteorológicas.....	33
4.3.	Diseño de experimentos factorial 2^3	36
4.4.	Caracterización fisicoquímica del aceite de citronela.....	44
5.	CONCLUSIONES.....	47
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros fisicoquímicos del aceite esencial de citronela según IRAM SAIPA 18520: 2006.....	15
Tabla 2	Matriz de experimentos del diseño factorial 2^3	19
Tabla 3	Dominio experimental del diseño factorial 2^3	26
Tabla 4	Matriz de experimentos y plan de experimentación para el diseño factorial 2^3	27
Tabla 5	Promedios por estación de temperaturas máximas y mínimas a dos niveles del suelo.....	34
Tabla 6	Matriz del plan de experimentos y respuestas obtenidas.....	36
Tabla 7	Ajuste del modelo estadístico, valores p, respuesta %CAL.....	38
Tabla 8	Ajuste del modelo estadístico, valores p, respuesta Rto.....	38
Tabla 9	Referencias del cromatograma de la Figura 18.....	44
Tabla 10	Resultados de la caracterización fisicoquímica con valores de referencia según IRAM-SAIPA 18520: 2006.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Molécula del isopreno.....	4
Figura 2	Principales terpenoides del aceite esencial de citronela.....	6
Figura 3	Equipo de destilación por arrastre con vapor de agua a escala laboratorio.....	12
Figura 4	Fotografía del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua a escala piloto.....	25
Figura 5	Dominio experimental para dos factores cuantitativos y uno cualitativo.....	27
Figura 6	Promedios mensuales de temperaturas máximas y mínimas a dos niveles del suelo, registrados en Colonia Benítez.....	34
Figura 7	Promedio mensual de heliofanía efectiva, registrada en Colonia Benítez.....	35
Figura 8	Total mensual de precipitaciones, registradas en Colonia Benítez...	35
Figura 9	Gráfica de probabilidad normal, respuesta %CAL.....	37
Figura 10	Gráfica de probabilidad normal, respuesta Rto.....	37
Figura 11	Gráfica de efectos principales, respuesta %CAL.....	39
Figura 12	Gráfica de interacción, respuesta %CAL.....	40
Figura 13	Gráfica de contorno invierno, respuesta %CAL.....	41
Figura 14	Gráfica de contorno verano, respuesta %CAL.....	41
Figura 15	Gráfica de efectos principales, respuesta Rto.....	42
Figura 16	Gráfica de contorno invierno, respuesta Rto.....	43
Figura 17	Gráfica de contorno verano, respuesta Rto.....	43
Figura 18	Cromatografía de gases del aceite esencial de citronela.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%CAL	Porcentaje Relativo de Citronelal
°C	Grados Celsius
ANOVA	Análisis de Varianza
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BPH	Buenas Prácticas de Higiene
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Reino de España
$d^{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}}$	Densidad Relativa al Agua a 4°C
DEE	Diseño de Experimentos
E	Estación Experimental Agropecuaria
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Food and Drug Administration
FRRre	Facultad Regional Resistencia
GC-MS	Mass Spectrometry coupled to Gas Chromatography
GRAS	Generally Regarded As Safe
ha	Hectárea
IBONE	Instituto de Botánica del Nordeste
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación
k	kilo (prefijo)
Kg	kilogramo/s
l	litro/s
<i>m</i>	Masa
m	Metro, mili (prefijo)
Max	Máxima/s
min, Min	Minuto/s, Mínima
MP	Materia Prima
$n_D^{20^{\circ}\text{C}}$	Índice de Refracción a 20°C
Pt	Presión total
Px	Tensión de vapor de x
QUIMOB	Química Orgánica Biológica
<i>Rto</i>	Rendimiento
SAGPYA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
SAIPA	Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
t	Tonelada, tiempo
Temp	Temperatura
UTN	Universidad Tecnológica Nacional
vol	Volumen
α_D^t	Rotación Óptica a 20°C para la línea D del Sodio

RESUMEN

Son innumerables los antecedentes de la relación entre el hombre y las plantas aromáticas. Son los aceites esenciales, mezclas complejas de compuestos volátiles que se originan en el metabolismo secundario de las plantas, los responsables de su aroma característico.

En particular, el cultivo de citronela tiene su importancia económica y está ampliamente distribuido en las regiones tropicales por sus propiedades aromáticas. Su esencia está compuesta principalmente por citronelal, citronelol y geraniol, que se utilizan en perfumería, jabonería, preparación de insecticidas y repelentes. El citronelal, componente mayoritario, es además un importante producto de partida para la síntesis de terpenoides de mayor importancia comercial.

En el presente trabajo se estudió la influencia de las variables cantidad de materia prima, tiempo de proceso y la estación del año en el rendimiento y la calidad del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto. Se determinó las mejores condiciones de trabajo para el proceso de obtención de aceite de citronela, mayor rendimiento y calidad, medidos como porcentaje de aceite extraído y de citronelal presente en mismo.

El aceite esencial se extrajo por arrastre con vapor de agua a escala piloto, su composición relativa se determinó por medio de GC-MS y además se realizó la caracterización fisicoquímica según las normas IRAM-SAIPA correspondientes. Las condiciones meteorológicas de la localidad fueron proporcionadas por el INTA-EEA Colonia Benítez.

Se realizó un diseño de experimentos factorial a dos niveles para identificar los efectos que tienen las variables (materia prima, tiempo y estación) y sus interacciones en la calidad y rendimiento del aceite de citronela.

El análisis estadístico de los resultados permitió identificar las condiciones de proceso para cada estación que favorecen la obtención de mayor porcentaje relativo de citronelal y mayor rendimiento en aceite.

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. Aspectos generales

Toda la historia del hombre discurre en una íntima relación con las plantas aromáticas y sus componentes olorosos. Desde que el *homo sapiens* discriminó el alimento benéfico del tóxico, el aire limpio del contaminado, reconoció las virtudes del aroma de una flor o un fruto, comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su hábitat, comportamiento, costumbres, medicinas, placeres, vicios, recuerdos y deseos. La vida era para él, entre otras cosas, una experiencia que se generaba desde el olfato y el paladar. Es así que el niño gusta del sabor dulce, reconoce el olor de su madre y rechaza con el estornudo o la tos el olor o el sabor extraño (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003).

Son innumerables los antecedentes de la relación entre el hombre y las plantas aromáticas. Desde el momento del desarrollo de la escritura en los valles del Indo, hay referencias del uso de hierbas y especias (Rowe, 2005). Son estas hierbas aromáticas las que poseen los llamados aceites esenciales, mezclas de compuestos volátiles responsables de sus fragancias y sabores.

Se han encontrado restos de un equipo parecido a los destiladores de esencias actuales en la cultura Mesopotámica de hace 5.000 años. Restos prehistóricos de vasijas conteniendo resinas y bálsamos vegetales hablan de una significación medicinal o tal vez cosmética otorgada a estos productos. La Biblia y los presentes de los Reyes Magos al Dios niño nos indican el valor de la mirra y el incienso en aquellas épocas. En todas las épocas grandes viajeros y expedicionarios como Alejandro Magno, Marco Polo, Colón, Cook o Vasco da Gama fueron los descubridores de extrañas especias, riquísimas fragancias y preciosas plantas que ofrecían novedosos aromas y virtudes medicinales y culinarias, como la canela de China, la pimienta de India o el cacao de América.

Toda esta tradición ha evolucionado en lo que es hoy la agroindustria de las plantas aromáticas, con sus innumerables aplicaciones y su cada vez mayor importancia comercial. Pasada ya la época de oro de la síntesis química, cuando parecía que todo podía lograrse en el laboratorio y la independencia de los

productos naturales se consideraba un hecho, en la actualidad hay una tendencia por lo natural y ecológico, por lo que estas plantas resurgen como una alternativa, ni mejor ni peor que los sintéticos, simplemente otra opción (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003).

Teniendo en cuenta que entre lo que el mercado exige y lo que la naturaleza ofrece, existe una enorme versatilidad en la calidad del producto final, debido a la compleja relación que existe entre los cientos de componentes que conforman un aceite esencial y la influencia del medio en su metabolismo, se considera una fortaleza no solo la identificación del material genético sino también el estudio de las variables que hacen al proceso de extracción de las esencias (Bandoni & Dellacasa, 2010).

1.2. Aceites Esenciales

1.2.1. Definición

Las plantas aromáticas se definen como aquéllas que pueden generar por algún proceso fisicoquímico un producto aromático, entendiéndose por productos aromáticos a los que tienen un olor o un sabor determinado, sin evaluar su calidad comercial o estética (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por organismos vivos y aislados por medios físicos (presión y destilación) a partir de una planta aromática entera o parte de ella (Franz & Novak, 2010). Estas mezclas son las responsables del aroma de las plantas y tienen diversas funciones biológicas como ser: mensajeros internos, sustancias de defensa contra los herbívoros o también atraer a los insectos polinizadores para su multiplicación. (Harrewijn, Van Oosten, & Piron, 2001). En general, los aceites esenciales tienen un olor agradable, es por eso que se los utiliza en diferentes industrias especialmente en los perfumes como fragancias y lociones, en los productos alimenticios como aromatizantes y conservantes y en la farmacéutica como principios terapéuticos (Zygadlo & Juliani, 2000).

1.2.2. Características

Los aceites esenciales son inflamables, no tóxicos, sufren degradación química en presencia de la luz, el oxígeno, el calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes y casi inmiscibles en disolventes polares. Son aceptados como sustancias seguras GRAS (Generally Regarded as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) (Code of Federal Regulation, 2014).

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales pueden ser esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son generalmente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012).

1.2.3. Origen

Según su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia en uno o varios de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos son producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012).

1.2.4. Composición química

Los aceites esenciales son mezclas complejas, constituidas por hidrocarburos terpénicos oxigenados, terpenos y sesquiterpenos. Se originan en el metabolismo secundario de las plantas y son los responsables de su aroma característico (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003). Los terpenos son compuestos de fórmula general $(C_5H_8)_n$, que pueden o no llevar oxígeno. Se encuentran repartidos en todo el reino vegetal y en menor grado, se los pueden encontrar en animales.

El nombre de terpeno se usa, generalmente, para los hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$ y con los terpenoides se engloban a todos los demás. Los terpenos y terpenoides son derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato y farnesilpirofosfato respectivamente.

Se clasifican según el número de unidades de cinco átomos de carbonos o grupos C_5H_8 en: monoterpenos $C_{10}H_{16}$, sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$, diterpenos $C_{20}H_{32}$ que son las resinas de la trementina, triterpenos $C_{30}H_{48}$ como el escualeno que se encuentra en el aceite de hígado de especies de tiburón, tetraterpenos $C_{40}H_{64}$ son los carotenoides y politerpenos $(C_5H_8)_n$ son gomas de caucho y gutapercha.

Además los monoterpenos se clasifican según el número de ciclos como: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc. Al mismo tiempo en cada grupo existen derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas (Carey, 2003).

La mayor parte de los terpenoides puede considerarse como derivados del 2 metil – 1,3- butadieno o isopreno que se observa en la Figura 1.

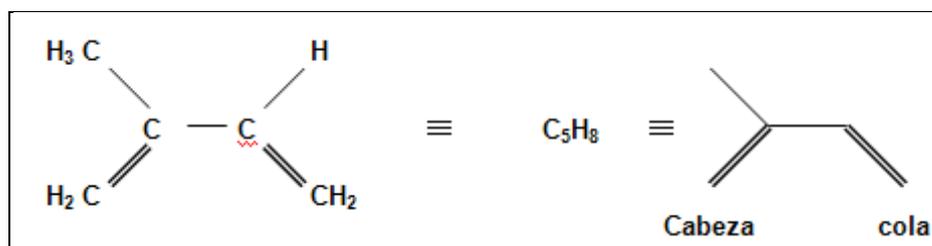


Figura 1: Molécula de isopreno.

La divisibilidad de las cadenas carbonadas de los terpenos en unidades isoprénicas se conoce como “Regla del Isopreno”, formándose generalmente las uniones entre las unidades de isopreno “cabeza-cola”. Esta regla fue formulada por Wallach en el año 1887 y se cumple en la mayoría de los terpenoides.

Existen algunas excepciones en el número de átomos de carbono, por ejemplo las iononas y a la regla del isopreno unión cabeza-cola, por ejemplo el β -caroteno (Morrison & Boyd, 1990).

1.2.5. Especies aromáticas: la citronela

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en distintas familias de plantas que incluyen las Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas,

Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, Gramíneas, Geraniáceas, Burseráceas, etc. Se los puede hallar en diferentes partes de la planta: en la raíz del pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides*), en los tallos como el de la madera Peteribí (*Cordia trichotoma*) e incienso, en hojas como la de los árboles de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), la Citronela (*Cymbopogon nardus*), Chinchilla (*Tagetes minuta*) y la hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), en las flores como lavandas (*Lavandula officinalis*), en frutos como el limón, la naranja (*Citrus spp.*) e incluso en las semillas como en el caso del anís (*Pimpinella anisum*), Cilantro (*Coriandrum sativum*) y pimienta (*Piper nigrum*), entre otros (Guenther, 1960), (Hüsni & Buchbauer, 2010).

Las características morfológicas de las especies productoras de aceites en el género *Cymbopogon* son muy similares en sus partes vegetativas. Son gramíneas perennes de macollas compactas, con rizomas cortos y sin tallos aéreos, con hojas duras y erectas que en la madurez tienden a doblarse (León, 2000). Los aceites se hallan en el mesofilo, como productos de acumulación, y ocupan bandas de células de varias capas de espesor que pueden ser percibidas en el lado superior de la hoja por su color más claro. La acumulación del aceite es más activa en las hojas jóvenes. Estas plantas presentan una tendencia a florecer tardía e irregular y producen semilla normal en raras ocasiones, por esto su propagación se hace por cepas cortadas de macollas. Es una hierba de múltiples cosechas, resistente a las variaciones climáticas y las plagas, (Akhila, 2010), (Cassel & Vargas, 2006).

El género *Cymbopogon* tiene su importancia económica y es ampliamente cultivada en las regiones tropicales del planeta en función de sus propiedades aromáticas, especialmente la citronela (*C. winterianum*), cuyo aceite está compuesto en su mayoría por monoterpenos (\pm 80%), y también se encuentran sesquiterpenos (Marco, Innecco, Mattos, Borges, & Nagao, 2007), (Rocha, Ming, & Marques, 2000). Los principales terpenoides encontrados en el aceite esencial de citronela son el citronelal, citronelol y geraniol (Figura 2), que se utilizan en perfumería, jabonería, preparación de insecticidas y repelentes (Guenther, 1960), (Nunes, Moura Linck, Lourenço da Silva, Figueiró, & Elisabetsky, 2010). Su componente mayoritario, el citronelal, es un importante intermediario o producto de partida para la síntesis de terpenoides de mayor importancia comercial (Lenardao, Botteselle, Azambja, & Jacob, 2007).

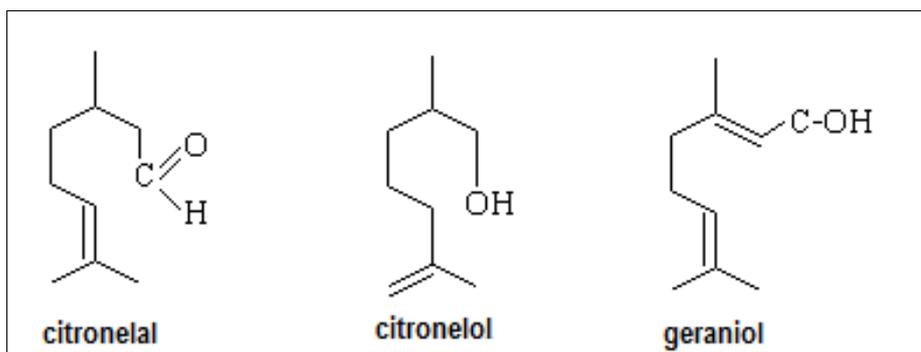


Figura 2: Principales terpenoides del aceite esencial de citronela.

1.2.6. Producción y calidad de las esencias

La producción de aceites esenciales a partir de especies aromáticas y medicinales debe responder, a los requerimientos del mercado donde cada vez se exige mayor calidad a los productos para poder competir.

El concepto de calidad tiene muchas definiciones e interpretaciones, aunque todas se refieren a la satisfacción del cliente. Además, este concepto se extiende más allá del producto, debe estar acompañado de un proceso productivo que implique conservación de los recursos naturales, sustentabilidad en el tiempo y cuidado del medio ambiente.

En los productos obtenidos a partir de especies aromáticas destinados a la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, perfumística, tabacalera u otras, debe ponerse especial cuidado en todas las etapas, desde la plantación del cultivo hasta la colocación de dicho producto frente al consumidor final.

Para garantizar el cumplimiento de estos requisitos se han redactado con fines de recomendación diversos códigos nacionales y/o internacionales denominados en general Buenas Prácticas, que según a qué se refieran específicamente pueden ser Agrícolas (BPA), de Manufactura (BPM), de Higiene (BPH) o de Laboratorio (BPL).

En Argentina, la Resolución 530/2001 dictada por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), hace referencia a normas relativas a las Buenas Prácticas de Higiene y Agrícolas para la producción primaria (cultivo-cosecha), acondicionamiento, almacenamiento y transporte de productos aromáticos (SAGPYA, 2001).

Puesto que el material vegetal es el producto de un proceso predominantemente biológico, existen factores que influyen en la producción y calidad de la esencia como por ejemplo la selección y mejora genética, la variación morfo y ontogenética consecuencia de la variación intraindividual entre las partes de la planta y su desarrollo, las condiciones ambientales y la intervención del hombre (Ringuelet & Cerimele, 2010).

1.2.6.1. Variación genética y mejora vegetal

La variación fenotípica en los aceites esenciales se detecta muy pronto gracias a sus propiedades sensoriales. Debido a la alta diversidad química es necesaria una selección continua de los quimiotipos deseados para obtener poblaciones homogéneas (Akhila & Rani, 2002).

Los estudios de la genética y la mejora vegetal se aplican con los objetivos de homogeneizar el contenido en aceite esencial y su composición, obtener mayores rendimientos y resistencia a plagas y enfermedades, así como también bajos requerimientos nutricionales que disminuyen los costos de producción y homogeneidad en el cultivo que faciliten los procesos tecnológicos de cosecha y post-cosecha (Pank, 2007).

Se encuentran clones de especies conocidas de mentas, citronela y orégano, con mejores calidades de esencia o mejoras en el manejo agronómico y post-cosecha, para lograr mayor rendimiento (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003).

Algunos autores colocan a *C. winterianus* como una especie muy trabajada en mejoramiento genético para aumentar los valores de aceite esencial. El rendimiento de las hojas se encuentra entre 14,7 y 20 t/ha año. Algunos clones pueden presentar de 60 a 70% de citronelal, con 0,6 a 0,8% de aceite sobre materia seca y 60 a 70 t/ha año de hojas (Panda, 2005).

1.2.6.2. Variación morfo y ontogenética

En cuanto a las diferencias entre las partes de la planta, la etapa de desarrollo y los órganos de la misma, la formación de aceites esenciales es dependiente de esta fase y se pueden observar cambios notables en el rendimiento en aceite y su composición (Franz & Novak, 2010).

Se registran grandes diferencias en el contenido y la composición del aceite esencial de las hojas jóvenes, maduras y flores. Por lo general, hay un significativo aumento en la producción de aceite esencial durante el desarrollo vegetativo, las hojas jóvenes muestran un mayor contenido de aceite esencial, en comparación con las hojas viejas. El mayor rendimiento de aceite se alcanza en la fase generativa entre la formación de yemas y la floración completa, o hasta la producción de frutos o semillas, por esta razón la mayoría de los aceites son producidos a partir de plantas en floración. Por ejemplo la composición del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. varía según las diferentes partes de la planta y de su estadio de crecimiento, el aceite de hojas de plantas no florecidas contiene principalmente dehidrotagetona, mientras que el aceite de hojas de plantas florecidas al igual que el aceite de flores es rico en β -ocimeno y tagetenona (Chamorro, Ballerini, Sequeira, Velasco, & Zalazar, 2008).

1.2.6.3. Influencias ambientales

La formación de aceite esencial en las plantas es altamente dependiente de las condiciones climáticas, especialmente de la temperatura, el suministro de agua, la longitud del día y la heliofanía efectiva (*helio* = sol y *fanis* = resplandor) que es el período de tiempo, expresado en horas, durante el cual la planta ha recibido radiación solar directa.

Las especies tropicales siguen su ciclo de vegetación según la estación seca y lluviosa, las especies de las zonas templadas reaccionan más con la duración del día. Por ejemplo, la menta peperina necesita un mínimo de duración del día (horas de luz) para cambiar de la fase vegetativa a la generativa. Esto es seguido por un cambio en la composición de aceite esencial de mentona a acetato de mentol y mentilo.

En otras especies, en cambio, se puede observar que cuanto más corta es la fase de floración, menor es el tiempo disponible para la formación del aceite, y por lo tanto menor es el contenido de aceite. Aunque la composición del aceite esencial, no muestra ningún cambio cualitativo debido a factores ecológicos o climáticos (Franz & Novak, 2010).

Otros factores ambientales son las propiedades del suelo y el estrés por el agua o la temperatura que tienen influencia en la productividad de las especies y de este modo el rendimiento de aceite, pero tienen poco efecto en la composición de aceite esencial. Es aquí donde interviene el hombre mediante la fertilización del suelo, abastecimiento de agua de riego y manejo de plagas (Figueiredo, Barroso, Pedro, & Scheffer, 1997), (Salamon, 2007).

1.3. Métodos de extracción

Hay diversos métodos de extracción de aceites esenciales que dependerán del tipo de material vegetal. Los mismos son: destilación por arrastre con vapor de agua, expresión y extracción con solventes sólidos, líquidos y supercríticos.

1.3.1. Destilación por arrastre con vapor de agua

Es una de las técnicas más comunes que permite la separación de sustancias ligeramente volátiles e inmiscibles en agua por medio de una destilación a baja temperatura. Es particularmente útil cuando la sustancia hierve a una temperatura superior a los 100°C y se descompone por debajo de su punto de ebullición o cuando se quiere separar una cantidad relativamente pequeña de una sustancia que se encuentra mezclada con gran cantidad de sólidos o productos alquitranosos y donde la destilación, filtración y extracción son difíciles o impracticables. Se usa generalmente en el aislamiento de productos naturales y de productos de reacción que están impurificados con productos resinosos (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012), (Schmidt, 2010).

El proceso consiste, en resumen, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce las funciones de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adición de la tensión del vapor que se inyecta a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del destilador se enfrían en un refrigerante donde regresan a la fase líquida, agua y aceite esencial, y finalmente se separan en un decantador o vaso florentino.

1.3.2. Expresión

Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas, a partir de las cáscaras, las cuales son exprimidas mecánicamente para liberar el aceite, que es recolectado y filtrado. Se aplica debido a que los componentes de los aceites cítricos se degradan por acción del oxígeno y el calor.

El aceite esencial de los cítricos se encuentra justo debajo de la superficie en las células del epicarpio, también llamados flavedo, en el área de color de la fruta. También está presente en las células del jugo, sin embargo, la cantidad de aceite presente en el jugo es mucho menor que la cantidad presente en el flavedo; la composición también difiere.

A lo largo del tiempo han surgido varios métodos para la extracción de este aceite. El método más antiguo llamado de *la esponja*, se realizaba a mano con esponjas marinas que absorbían el aceite esencial de los estomas dañados al pelar la fruta y dar vuelta las cáscaras. El inconveniente de este método es que también extraía impurezas de las cáscaras (cumarinas).

Luego se incorporó tecnología al proceso, al principio fueron máquinas ralladoras que extraían la esencia y restos de material vegetal (celulosa, flavonoides y ceras) lo que disminuía la calidad del aceite. En la industria de jugos, cítricos donde el aceite esencial se obtiene como subproducto, se usan procesos con la fruta entera o "FMC" que simultáneamente exprimen el jugo y rallan la cáscara. El jugo va por una línea de proceso mientras que el aceite es arrastrado por una corriente de agua en otra dirección, finalmente la emulsión de agua y aceite se centrifuga. Otros procesos utilizan prensas normales o hidráulicas, sobre moldes porosos donde el aceite fluye por los poros y queda el residuo en forma de torta (Schmidt, 2010).

1.3.3. Extracción con solventes

La extracción con solventes sólidos también llamada *enfleurage* o enflorado se emplea para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.). Consiste en colocar los pétalos de las flores sobre una superficie de grasa que se satura con el aceite, constituyendo la "pomada", de donde luego se extrae el aceite con alcohol y se separa este por destilación.

La extracción por solventes líquidos orgánicos se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta muy costosa por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias. Extrae no solo terpenos, sino también toda sustancia que sea soluble en el solvente utilizado.

La extracción por fluidos supercrítico es una operación unitaria que aprovecha el poder disolvente de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos. Un fluido supercrítico tiene propiedades entre un líquido y un gas y le proporcionan mayor poder penetrante en el material a extraer. El dióxido de carbono es considerado el solvente supercrítico ideal porque no es tóxico, ni inflamable, tiene bajo costo y con una temperatura crítica baja.

El material vegetal, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de él un fluido en estado supercrítico. Las esencias se solubilizan y arrastran mientras que el fluido supercrítico, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012), (Schmidt, 2010).

1.4. Destilación por arrastre con vapor

La extracción por arrastre con vapor es el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica.

Los aceites esenciales se ubican en los estomas odoríferos de la planta por lo que el vapor de agua tiene que entrar al material vegetal, romper las estomas y finalmente destilar. La industria aromática utiliza este método por su menor costo cuando se lo compara con métodos avanzados como la extracción con fluidos supercríticos (Bandoni, Las Plantas Aromáticas, 2003).

La técnica se basa en la ley de las presiones parciales de Dalton que dice que en una mezcla de dos líquidos X e Y completamente inmiscibles entre sí, cada líquido ejerce su propia tensión de vapor característico e independiente de la del otro.

La presión total (P_t) será:

$$P_t = P_x + P_y \quad (\text{a } T \text{ } ^\circ\text{C})$$

P_x : tensión de vapor de x a $T \text{ } ^\circ\text{C}$

P_y : tensión de vapor de y a $T \text{ } ^\circ\text{C}$

Estas tensiones de vapor son independientes de las cantidades relativas de los componentes de la mezcla (x e y).

El punto de ebullición de la mezcla será aquella temperatura en la que la tensión de vapor total iguale a la presión de confinamiento. A menos que P_x o P_y sean iguales a cero (que no estén presentes), esta temperatura será más baja que los puntos de ebullición de x e y , y la mezcla destilará a una temperatura constante en tanto exista por lo menos algo de cada uno de los componentes (Elder, 2010).

1.4.1. Escala laboratorio

Los equipos a esta escala son una miniaturización de los equipos piloto, donde el material vegetal forma un lecho fijo y el vapor de agua es alimentado continuamente desde un balón con agua a ebullición, que funciona como un generador de vapor (Figura 3). Estos equipos poseen la ventaja adicional de trabajar en un modo similar al de los equipos mayores. Sus limitaciones son la capacidad del balón y la dependencia del flujo de vapor generado con la potencia de la fuente de energía, lo que le resta flexibilidad en el control de este parámetro (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012).

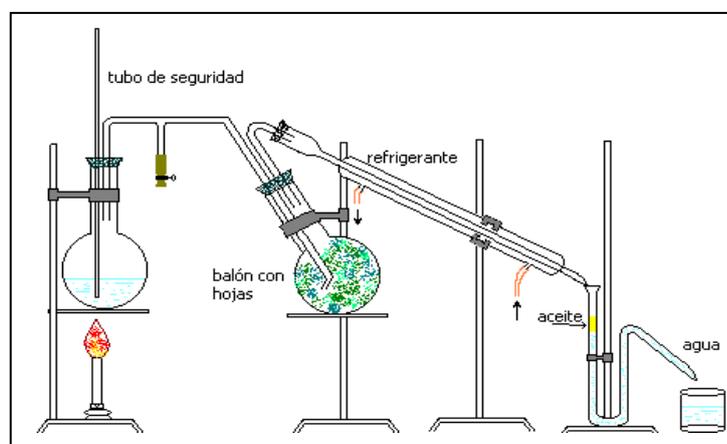


Figura 3: Equipo de destilación por arrastre con vapor de agua a escala laboratorio.

1.4.2. Escala piloto

Estos equipos poseen mayor capacidad. Son construidos en acero comercial, inoxidable o cobre. Pueden ser de dos tipos: con generador externo o acoplado al hidrodestilador. Están conformados de un hidrodestilador cilíndrico donde el vapor de agua es inyectado por la parte inferior del generador o generado en esa sección. La materia prima suele estar compactada y almacenada en una cesta para su mejor carga y descarga. Los condensadores pueden ser de distintos tipos (coraza y varios tubos internos, serpentín, etc.). El aceite esencial es recogido en un vaso florentino.

Las ventajas son la mayor confiabilidad en los datos experimentales generados, con respecto a los obtenidos a menores escalas, y que se esperan conseguir en una planta industrial. Además son procesos por lotes los cuales son flexibles, versátiles y permiten operar con pequeños volúmenes, realizando pruebas antes de su transformación a gran escala.

Como desventajas hay que mencionar que no son fáciles de trasladar ni están aislados térmicamente. Los equipos piloto suelen usarse con propósitos de producción semi-industrial y como centro de ensayos de una planta industrial (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012).

1.4.3. Escala industrial

Estos equipos poseen capacidad mayor a 10 litros. Están construidos en acero inoxidable de fácil limpieza. Pueden ser de dos tipos: móviles (remolques-alambiques) o estáticos (hidrodestiladores verticales). Los de remolques, más usados en EUA y Europa, responden a la mecanización de la agricultura y a la gran producción de algunos aceites, así como la búsqueda de minimizar costos de operación y aumentar la eficiencia de la obtención. El uso de equipos verticales responde a otras necesidades, cosecha atomizada en varias regiones cercanas, mayor mano de obra disponible, menores niveles de producción y el interés en agotar completamente el aceite contenido en la planta, estos equipos suelen encontrarse en Asia, África y Latinoamérica (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, Real, & Sergio, 2012).

1.5. Identificación y caracterización de aceites esenciales

Para la identificación cuali y cuantitativa se utiliza la técnica acoplada de Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (GC-MS). Esta técnica, gracias al desarrollo de columnas capilares de alta resolución, permite analizar mezclas complejas presentes en aceites esenciales e identificar los componentes, a partir de los tiempos de retención, que son característicos para cada uno de ellos, y del espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Asimismo existen bases de datos con los espectros de masas que sirven de criterio para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales (Chamorro, Zambón, Morales, Sequeira, & Velasco, 2012).

Los aceites deben cumplir una serie de características físicas y químicas que dependerán de cada aceite en particular. Estas propiedades están fijadas en las normas IRAM-SAIPA para cada aceite.

La norma IRAM-SAIPA 18520 "Aceite de citronela de Argentina tipo Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)" define al aceite de citronela como el producto obtenido por arrastre con vapor de agua, de las partes aéreas del *Cymbopogon winterianus* Jowitt, obtenido de plantas cultivadas en la Argentina, con características organolépticas de líquido límpido, incoloro o amarillento, de color característico (IRAM-SAIPA, Norma 18520, 2006).

Los requisitos que debe cumplir son los presentados en la Tabla 1.

Tabla 1: *Parámetros fisicoquímicos del aceite esencial de citronela según IRAM-SAIPA 18520: 2006.*

Requisitos	Unidad	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Densidad a 20°C/ 4°C	-	0,881	0,900	IRAM-SAIPA N° 18504: 2002
Índice de refracción a 20°C	-	1,4630	1,4750	IRAM-SAIPA N° 18505: 2002
Rotación óptica a 20°C	Grado	-0,5	-6,0	IRAM-SAIPA N° 18507: 2002
Alcoholes totales, expresados como geraniol	g/100g	85,0	-	IRAM-SAIPA N° 18513-1: 1992 y 6.1
Compuestos carbonílicos, expresados como citronelal	g/100g	30,0	45,0	IRAM-SAIPA N° 18515: 1984 y 6.2
Ensayo de solubilidad en etanol de 80ml/100ml	-	1 volumen de muestra debe disolverse totalmente en 2 volúmenes de etanol		IRAM-SAIPA N° 18510: 2003
Evaluación olfatoria	-	Olor igual al de la muestra convenida		IRAM-SAIPA N° 18601: 1970

1.6. Diseño de experimentos

La experimentación juega un papel fundamental en todos los campos de la investigación y el desarrollo. El objetivo que persigue es obtener información confiable que brinde el conocimiento inicial sobre un nuevo sistema en estudio, determinar la influencia de los factores sobre la respuesta observada, optimizar las respuestas y determinar la robustez del sistema (Devore, 2009).

Un aspecto importante de la experimentación que se debe considerar es que es normalmente cara y está limitada a los costos en tiempo y recursos. Por lo tanto, la organización óptima de la experimentación deberá contemplar el menor número de experimentos que permita obtener la información buscada (Montgomery & Runger, 2002). Además, el resultado observado de un experimento, y , tiene un error experimental: $y = n + e$, donde n es el resultado verdadero del experimento y e es una contribución aleatoria, que varía cada vez que se repite el experimento.

Para la elección de los experimentos y la evaluación de los resultados es necesario utilizar una metodología matemática y estadística que indique cómo planificar la secuencia de experimentos a fin de minimizar tanto el costo como la influencia del error experimental sobre la información buscada (Eriksson, Johansson, Kettaneh-Wold, Wilström, & Wold, 2008).

El uso de modelos de probabilidad y métodos estadísticos para analizar datos se ha convertido en una práctica común en todas las disciplinas científicas. Además todas las actividades asociadas con planear y realizar una investigación tienen implicaciones estadísticas. Los principios estadísticos son los asociados con la recolección de aquellas observaciones que proporcionen la mayor cantidad de información para el estudio e investigación de una manera eficiente (Kuehl, 2000).

La técnica de diseño de experimentos (DEE) es el vínculo entre lo experimental y el modelado teórico. Su objetivo es obtener la máxima información del experimento que está siendo estudiado mediante el diseño estadístico (Walter & Pronzato, 1990).

Las situaciones en las que se puede aplicar el DEE son numerosas, de forma general, se aplica a sistemas en los cuales se observa una o más variables cuyo valor depende de una o más variables independientes llamadas factores. Además, las respuestas pueden estar influidas por otras variables que no son controladas.

El método tradicional de experimentación consiste en variar un factor cada vez. A partir de unas condiciones iniciales se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir a la variación del factor y por lo tanto, revela el efecto de ese factor. El procedimiento se repite para los otros factores. El razonamiento para esta forma de actuar es que si se variaran dos o más factores entre dos experimentos consecutivos, no sería posible conocer si el cambio en la respuesta ha sido debido al cambio de un factor, al de otro, o al de todos a la vez.

La estrategia experimental del método tradicional presenta inconvenientes importantes cuando existe interacción entre factores. Existe interacción entre dos factores A y B cuando el efecto del factor A es diferente según qué valor tome el factor B, y viceversa. Esta situación se presenta muy a menudo en química, física, biología, etc. Para estos casos este procedimiento no informa sobre como un factor interactúa con los otros o como estas interacciones afectan a la respuesta, con lo cual sólo se obtiene una comprensión limitada de los efectos. Tampoco proporciona la posición del óptimo. El experimentador percibe que se ha llegado al óptimo porque cambiando un factor cada vez la respuesta no mejora, pero se puede

encontrar lejos del óptimo real. Aunque se puede reiniciar la experimentación partiendo del óptimo encontrado, esta solución es extremadamente ineficiente cuando se deben estudiar muchos factores a muchos valores distintos, ya que requeriría demasiados experimentos y demasiado tiempo.

La solución consiste en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento. Ello permite mejorar la eficiencia del experimentador y obtener información sobre las interacciones. La dificultad se encuentra en diseñar una experimentación reducida, donde estos cambios simultáneos se complementen entre sí y permitan obtener la información buscada al combinar los resultados de todos los experimentos.

El DEE proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente, y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. El DEE conduce a una planificación con menos experimentos que el método tradicional para obtener un conocimiento equivalente (Box & Hunter, 1989), (Eriksson, Johansson, Kettaneh-Wold, Wilström, & Wold, 2008), (Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, & Lewi, 1997).

1.6.1. Diseño factorial completo 2^k

El diseño factorial completo describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen k factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. El número 2 de la base indica que cada factor toma solo dos valores.

Estos experimentos están planeados de forma que se varían simultáneamente varios factores pero se evita que cambien siempre en la misma dirección. Al no haber factores correlacionados no hay experimentos redundantes. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos. Esto permite obtener la información con el mínimo número de experimentos y con la menor incertidumbre posible.

La aplicación del método puede realizarse en varias etapas, las cuales son: planteamiento del problema, identificación de los factores y dominio experimental, diseño de la matriz de experimentos, plan de experimentación, realización de los

mismos e interpretación de los resultados (Berti, Monti, & Salmaso, 2002), (Montgomery D. , 2004).

1.6.1.1. Planteo del problema

Es necesario comprender el problema y definir claramente el objetivo. El DEE es una herramienta para encontrar respuestas a problemas perfectamente identificados y especificados. Para obtener una comprensión profunda del sistema y del problema es necesario recopilar toda la información disponible sobre el sistema en estudio y que pueda ser relevante para la experimentación que se realizará. En este punto se debe definir qué respuesta experimental o característica de interés de un producto se va a observar.

1.6.1.2. Identificación de los factores y dominio experimental

Para identificar los factores y el dominio experimental de interés es muy importante listar todos los factores (las variables independientes) que pueden tener influencia en el proceso y en la respuesta, aunque sean de poca importancia. Se debe considerar si cada factor especificado se mantendrá constante, se variará controladamente, si es incontrolable pero se pueden conocer sus valores o si es incontrolable e imposible de medir. Los factores no controlados pueden introducir variaciones en la respuesta que dificultan el análisis de los resultados experimentales.

Para cada factor se debe definir el intervalo de valores que puede tomar (dominio). La combinación del dominio de todos los factores configura el dominio experimental posible. Este contiene los experimentos que, en principio, se podrían realizar.

No siempre cualquier combinación de valores de factores es posible o deseable. Pueden existir restricciones experimentales, técnicas o económicas por las cuales el dominio experimental inicial se reduce a un dominio experimental de interés.

La elección de los factores y de su dominio experimental no suele ser fácil, es el experimentador quien decide donde es interesante estudiar dichos factores. Esta

decisión requiere un conocimiento previo del sistema, obtenido de referencias bibliográficas, experiencias en el laboratorio, etc.

1.6.1.3. Diseño de la matriz de experimentos

Las series de experimentos se agrupan en diseños denominados matrices de experimentos. La selección de una matriz dependerá del objetivo. Para el estudio de los factores, una vez identificados los más importantes, el siguiente paso es estudiar cuantitativamente su efecto sobre la respuesta y sus interacciones, para lo cual se utilizan los diseños factoriales completos a dos niveles 2^k .

Para conocer el efecto de un factor es suficiente con hacerlo variar entre dos valores. Los más adecuados son los extremos de su dominio experimental entre el nivel menor (-) y mayor (+). Además, esta variación se realiza para cada combinación de los demás factores, lo que permitirá descubrir si el efecto depende del valor tomen estos factores. Por ejemplo, para un diseño factorial completo a dos niveles con tres factores, 2^3 , se tiene la matriz de experimentos que se muestra a continuación (Tabla 2).

Tabla 2: *Matriz de experimentos de diseño factorial 2^3 .*

N°	Matriz de experimentos		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

1.6.1.4. Plan de experimentación y realización de los experimentos

La matriz del plan de experimentación se obtiene reemplazando los valores (-) y (+) por los valores reales de las variables. Las respuestas se obtienen al realizar los experimentos en orden aleatorio, asegurando que los factores no contemplados no introduzcan confusión y sesgo en los resultados.

1.6.1.5. Interpretación de los resultados

Para la interpretación de los resultados hay que considerar si existen efectos de interacción significativos, si es así no se puede interpretar individualmente el valor de cada efecto principal. Caso contrario, la interpretación de los resultados se reduce a analizar sólo los efectos principales.

Es habitual que los efectos de interacción sean cada vez menos importantes cuando más factores se consideran en la interacción (Box & Hunter, 1989), (Carlson, 1992), (Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, & Lewi, 1997), (Montgomery D. , 2004).

1.6.2. Análisis de varianza

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos.

En los casos donde tenemos dos o más factores que influyen en una determinada respuesta, se realizan los experimentos para todas las combinaciones de los factores estudiados, seguido del ANOVA con lo que se puede deducir si cada uno de los factores o una interacción entre ellos tienen influencia significativa en el resultado (Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, & Lewi, 1997).

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres requisitos: los errores deben seguir una distribución normal, con una media de cero, la varianza de error debe ser constante para diferentes niveles de un factor y los errores deben ser independientes unos de otros (Massart, Vandeginste, Buydens, De Jong, & Lewi, 1997).

Para evaluar estas condiciones se utilizan las gráficas de residuos: de probabilidad normal, histograma, residuos versus valores ajustados y residuos versus orden de datos (Montgomery D. , 2004).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Estudiar la influencia de las variables cantidad de materia prima, tiempo de proceso y la estación del año en el rendimiento y la calidad del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto.

2.2. Objetivos secundarios

Obtener aceite esencial de citronela y caracterizar el aceite obtenido.

Modelar estadísticamente el proceso de obtención del aceite en base a las variables estudiadas.

Determinar las mejores condiciones de trabajo para el proceso de obtención de aceite de citronela.

2.3. Tipo de investigación a realizar

El tipo de investigación es aplicada, donde se explorará un único caso: la extracción por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) a escala piloto.

MATERIALES
Y
METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Identificación botánica y condiciones meteorológicas

La identificación y clasificación taxonómica, se realizó en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE).

La Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA de Colonia Benítez proporcionó la información referida a las condiciones meteorológicas de esa localidad (temperaturas, heliofanía efectiva y precipitaciones) para cada día de los años 2012 y 2013. A fin de evaluar su influencia sobre el material vegetal recolectado, se tomaron sólo los valores de estos parámetros en los meses de abril a septiembre para el invierno y de octubre a marzo para el verano.

La temperatura del aire a 1,5 metros se midió con un termómetro de mercurio, en posición vertical, graduado hasta la décima de grados y situado en el centro de una garita de madera, pintada de blanco y bien ventilada. La temperatura a 0,05 metros correspondiente al suelo se midió con un geotermómetro cuyo bulbo se encuentra enterrado en el mismo. La heliofanía efectiva se midió con un heliógrafo y las precipitaciones se determinaron con un pluviómetro.

3.2. Destilación por arrastre con vapor de agua: etapas del proceso

3.2.1. Corte del material vegetal

El material vegetal se obtuvo de un lote de plantación de citronela de la EEA – Colonia Benítez. El mismo se cortó manualmente y se llevó al lugar de oreado.

3.2.2. Oreado

El oreado se realizó a temperatura ambiente durante 36 horas, extendiendo el material vegetal sobre el piso limpio, bajo techo en una galería con suficiente intercambio de aire.

3.2.3. Destilación por arrastre con vapor a escala piloto

El aceite se obtuvo en un equipo de destilación por arrastre con vapor a escala piloto. El mismo constaba de cuatro cuerpos principales: generador de vapor, extractor, condensador y separador-decantador (Figura 4).

El generador de vapor era un recipiente cilíndrico de acero inoxidable de 15 litros de capacidad que se cerraba herméticamente con una tapa bridada y juntas de goma para evitar pérdidas de vapor. Se conectaba al extractor, también cilíndrico, de acero inoxidable y de 20 litros de capacidad, por medio de una unión lateral que conducía a un distribuidor de vapor en forma de anillo situado en el fondo de extractor. Una prolongación curvada en la parte superior del extractor conectaba el mismo con el condensador de tipo casco y tubos que desagotaba los condensados en una ampolla de decantación de 2 litros de capacidad.

El procedimiento para la extracción consistió en cargar el generador de vapor con agua de red, cerrarlo herméticamente y suministrarle calor por medio de una hornalla con conexión a gas en la parte inferior. Se pesó el material oreado (1 o 2 Kg según el ensayo) directamente en un cesto metálico con una balanza digital, luego se colocó el cesto en el cuerpo extractor del equipo y se cerró también herméticamente. Se verificaron las conexiones entre el generador de vapor, el extractor y el condensador y se suministró agua de red al condensador como fluido refrigerante.

Una vez que se observó salir vapor por la válvula situada en el fondo del extractor, se cerró la misma y se dio inicio al tiempo de proceso (45 o 90 minutos según el ensayo). El aceite esencial y el vapor se condensaban y recogían en una ampolla de decantación de 2 litros de capacidad cargada con solución saturada de cloruro de sodio que facilitó la separación de las fases.

Finalizado el tiempo de proceso se interrumpió la generación de vapor, se abrió la válvula de pasaje de vapor del fondo del extractor, se retiró la ampolla con el aceite esencial obtenido y cuando el equipo perdió temperatura se abrió el extractor para retirar y reemplazar el material vegetal para un siguiente ensayo.

El aceite se separó del agua con ayuda de la ampolla de decantación, se secó con sulfato de sodio anhidro, agregando éste hasta cristalización del exceso de

sulfato hidratado, luego se almacenó en frascos de vidrio color caramelo que se guardaron en heladera para su posterior caracterización fisicoquímica.



Figura 4: Fotografía del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua a escala piloto.

3.3. Diseño de experimentos factorial 2^3

3.3.1. Planteo del problema

Se planteó el objetivo de conocer si los factores cantidad de materia prima, tiempo de proceso, estación del año y sus interacciones influyen significativamente en la calidad del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), medida como porcentaje de composición relativa de citronelal, y en el rendimiento del aceite extraído por arrastre con vapor de agua a escala piloto.

3.3.2. Factores y dominio experimental

Se analizaron las causas de variación en la composición relativa de citronelal obtenido por extracción por arrastre con vapor de agua y se ponderaron las mismas

en base a información bibliográfica, antecedentes del Centro de Investigación UTN QUIMOBÍ, consulta con expertos, criterios de rentabilidad y limitaciones del equipo donde se lleva a cabo el estudio, se determinó el dominio experimental (Tabla 3).

Tabla 3: *Dominio experimental del diseño factorial 2³.*

Factores	Dominio experimental	
	Nivel -	Nivel +
x ₁ : tiempo (min)	45	90
x ₂ : materia prima (Kg)	1	2
x ₃ : estación	Invierno	Verano

Los factores x₁ (tiempo) y x₂ (materia prima) son variables cuantitativas y sus notaciones habituales se indican con (-) al extremo inferior y (+) al extremo superior, por lo que sus dominios experimentales se expresan con los valores mínimos y máximos mientras que el factor x₃ (estación) es una variable atributo cualitativa y se expresa con los nombres de los valores que toma, ya que en este caso son irrelevantes los niveles (-) y (+).

El tiempo de extracción debió ser inferior a 90 minutos para que no se degrade el aceite esencial por exceso de calentamiento y superior a 45 minutos para asegurar un rendimiento suficiente. La cantidad de materia prima de 1 y 2 Kg se eligió teniendo en cuenta la capacidad del equipo a escala piloto donde se realizaron los ensayos. A mayor cantidad de material vegetal, mayor aceite obtenido pero hay que asegurar que el mismo no se apelmace en el cesto del extractor para que el vapor pueda circular a través de él y lograr un buen arrastre de esencia. Los períodos del año que se eligieron para evaluar la influencia de las condiciones del clima en la calidad del aceite esencial, fueron luego del invierno (agosto y septiembre) y finalizado el verano (marzo y abril).

La Figura 5 muestra el dominio experimental para dos factores cuantitativos y uno cualitativo. Cada círculo indica un posible experimento, los experimentos de los vértices fueron los utilizados en el diseño factorial completo.

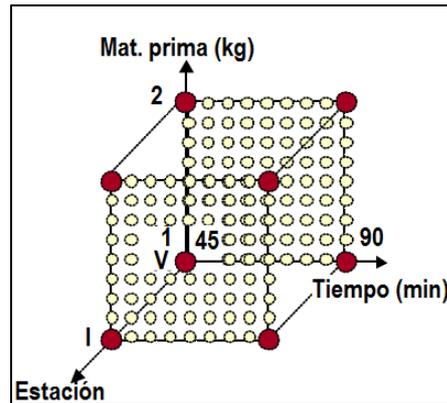


Figura 5: Dominio experimental para dos factores cuantitativos y uno cualitativo.

3.3.3. Matriz de experimentos: diseño factorial completo 2^3

Para diseñar el experimento se tomaron los valores de los extremos del dominio experimental, niveles (-) y (+). Además esta variación se realiza para cada posible combinación de los valores de los demás factores lo que permite descubrir si el efecto depende de qué valor toman los mismos. Todas estas combinaciones están contempladas en el diseño factorial completo 2^3 que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Matriz de experimentos y Plan de experimentación para el diseño factorial 2^3 .

N°	Matriz de experimentos			Plan de experimentación		
	x_1	x_2	x_3	MP(Kg)	Tiempo (min)	Estación
1	-	-	-	1	45	Invierno
2	+	-	-	2	45	Invierno
3	-	+	-	1	90	Invierno
4	+	+	-	2	90	Invierno
5	-	-	+	1	45	Verano
6	+	-	+	2	45	Verano
7	-	+	+	1	90	Verano
8	+	+	+	2	90	Verano

3.3.4. Plan de experimentación y realización de los experimentos

Se utilizó el software MINITAB 15® para diseñar los experimentos y aleatorizar el orden de los mismos.

Cada ensayo del diseño se realizó en la planta piloto de la UTN-FRRe con el equipo de destilación antes descripto.

3.3.5. Interpretación de los resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con MINTAB 15®. Este software utiliza el test de ANOVA para comparar las medias de los datos obtenidos en cada experimento. Primeramente se supone una hipótesis nula, de igualdad de medias, y la hipótesis alternativa de que al menos una media es distinta a la de los demás. Si los promedios son iguales se decide que el factor no influye significativamente en la variación de la respuesta. Un resultado es estadísticamente significativo cuando las variaciones de los promedios son diferentes. Se decide que un valor tiene efecto significativo en la variable de salida cuando su probabilidad p, es menor que 0,05 (α), lo que significa un error menor al 5% de rechazar la hipótesis nula siendo esta verdadera.

Para el análisis de los efectos se utilizaron las gráficas de efectos principales y de interacciones para la respuesta de composición relativa de citronelal.

3.4. Caracterización fisicoquímica del aceite de citronela

La caracterización e identificación cuali - cuantitativa del aceite de citronela obtenido por arrastre con vapor de agua en los distintos tratamientos del diseño factorial se llevó a cabo mediante la determinación de las siguientes propiedades: índice de refracción, densidad relativa, rotación óptica, como así también mediante el estudio de la composición relativa.

3.4.1. Índice de refracción ($n_D^{20^\circ C}$)

El índice de refracción se realizó según la Norma IRAM- SAIPA 18505. Para ello se utilizó un refractómetro de Abbe con control termostático de temperatura de trabajo mediante camisa de circulación de agua entre los prismas. La precisión del instrumento es 0,0001, para un intervalo dinámico de $n_D^{20^\circ C} = 1,300 - 1,700$. El procedimiento se basó en la determinación del ángulo crítico de reflexión total entre el aceite y el vidrio Flint del prisma. La observación del ángulo crítico se visualizó en el campo de observación como una separación nítida entre dos campos

(claro y oscuro) centrado en el cruce de dos pelos cruzados. La lectura en la escala se realizó manteniendo la temperatura a 20°C. Para verificar el correcto funcionamiento del instrumento se realizó previamente la determinación del índice de refracción del agua destilada (IRAM-SAIPA, Norma 18505, 2002).

3.4.2. Densidad relativa ($d^{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}}$)

La técnica de densidad relativa se llevó a cabo según recomendaciones de la Norma IRAM- SAIPA 18504 mediante un método picnométrico. Se utilizó a tal fin una balanza Mettler Modelo AJ150 con precisión de 0,1 miligramos. El procedimiento consistió en la determinación de la masa de agua contenida en el picnómetro a la temperatura de referencia. Para ello se pesó el picnómetro perfectamente limpio y seco y se estabilizó a la temperatura 20°C ± 0,2°C. A continuación se lo llenó con agua destilada, se lo colocó en un baño a 20°C ± 0,2°C hasta su estabilización, se lo enrasó y luego de retirado del baño, se secó cuidadosamente. Finalmente se pesó el picnómetro enrasado con agua. La masa de agua (m_{H_2O}) se determinó por diferencia entre la masa del picnómetro con agua y la masa del picnómetro vacío. Luego se realizó la determinación de la masa del aceite utilizando el mismo picnómetro limpio y seco. Se estabilizó la muestra de aceite a 20°C ± 0,2°C en un baño, a continuación se llenó el picnómetro con el aceite, se dejó unos minutos en el baño y luego se enrasó. Se retiró del baño, se secó exteriormente con suma precaución evitando tocar el picnómetro. La masa de aceite (m_{aceite}) se determinó por diferencia entre la masa del picnómetro con aceite y la masa del picnómetro vacío (IRAM-SAIPA, Norma 18504, 2002).

La densidad relativa del aceite se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$d^{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}} = m_{aceite} / m_{H_2O}$$

Donde,

$d^{20^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}}$: densidad del aceite a 20°C, relativa a la del agua a 4°C.

m_{aceite} : masa de aceite en el picnómetro lleno a 20°C, en gramos.

m_{H_2O} : masa de agua calculada en la calibración del picnómetro, en gramos.

3.4.3. Rotación óptica $[\alpha]_D^t$

Para la determinación de la rotación óptica se siguió la Norma IRAM-SAIPA 18507, utilizando un polarímetro del disco Tipo WXG-4, rango de medición $\pm 180^\circ$ y precisión de $0,05^\circ$. El procedimiento se basó en la observación del ángulo de desviación de la luz polarizada plana, de longitud de onda 589 nm (línea D del Sodio), por el aceite esencial colocado en un portamuestras de 1 dm de longitud a $20^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$. Para ello, la muestra de aceite se estabilizó a la temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ en un baño, luego se cargó en el portamuestras cuidando que no queden burbujas que interfieran en la trayectoria del haz de luz. La observación del ángulo se visualizó en el campo de observación como el intermedio entre dos campos (un círculo oscuro con una línea clara en el centro y el otro círculo claro con la línea oscura en el centro) y la lectura se realizó en la escala externa ($\alpha_{\text{observado}}$) (IRAM-SAIPA, Norma 18507, 2002).

La rotación óptica del aceite se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$[\alpha]_D^t = \alpha_{\text{observado}} / l * C$$

Donde,

$[\alpha]_D^t$: rotación óptica a 20°C para la línea D del sodio, en grados.

$\alpha_{\text{observado}}$: ángulo de rotación óptica observada, en grados.

l : longitud del tubo portamuestras, en decímetros.

C : concentración de la muestra, en gramos/mililitros.

3.4.4. Composición relativa

La composición relativa del aceite esencial de citronela se obtuvo por cromatografía gaseosa en un equipo SHIMADZU modelo GC 14B, con una columna Mega Bore DB-WAX P/N 125-7032 (30m de longitud x 0,53mm de diámetro interno x $1\mu\text{m}$) y detector de ionización de llama (FID). Se trabajó con $0,2\mu\text{l}$ de muestra y la programación de temperatura fue de 60°C por 5 minutos, luego un aumento de 10°C por minuto hasta alcanzar la temperatura final de 200°C , que se mantuvo durante 10 minutos, la temperatura del FID fue 220°C y la del inyector 180°C .

La identificación de los componentes principales del aceite de citronela se realizó por comparación con un GC-MS realizado a una muestra del mismo aceite

en el Instituto de Química Orgánica General, CSIC, España. El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de gases Agilent 7890 con columna de metilsilicona (30m de longitud x 0,25mm diámetro interno x 0,2µm) acoplado a un MS Agilent 5975, con detector selectivo de masas seguido de un electrodo de ionización con modo de escaneo de voltaje EM 1923 V, rango de barrido de 50-550 uma y muestreador automático. La programación de temperatura fue de 70°C por 5 minutos, luego un incremento de 5°C por minuto hasta alcanzar 280°C. La biblioteca utilizada fue F.W. McLafferty, D.B. Stauffe, Wiley/NBS Registry Registro de datos de espectros de masas Wiley, New York, 1989.

3.5. Determinación del rendimiento

La determinación del rendimiento del aceite esencial obtenido se calculó mediante la siguiente expresión:

$$R_{to} = vol_{aceite} * d^{20^{\circ}C/4^{\circ}C} / m_{MP} * 100$$

Donde,

R: Rendimiento de aceite, en %.

vol_{aceite}: volumen de aceite, en mililitros.

d^{20°C/4°C}: densidad relativa del aceite a 20°C.

m_{MP}: masa de materia prima vegetal, en gramos.

Para los cálculos se utilizó la densidad relativa del aceite a 20°C promedio de todos los tratamientos del diseño de experimentos.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación botánica de la materia prima

La identificación y clasificación taxonómica proporcionada por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) fue:

Cymbopogon nardus (L.) Rendle (winterianus)

Localidad: ARGENTINA, Chaco, Dep. 1º de Mayo. Estación Experimental INTA, "Reserva Natural Colonia Benítez", 20 km NE de Resistencia.

Fecha de colección: 21/11/2012.

Nº y acrónimo del herbario donde se encuentra depositado: Escobar & Arribillaga Nº 3, CTES0043467 (CTES).

4.2. Condiciones meteorológicas

Los valores promedios de temperaturas máximas y mínimas (expresada en °C) tomadas a dos niveles de altura del suelo se muestran en la Figura 6. En ella se observa que desde abril a julio de 2012 las temperaturas fueron disminuyendo hasta alcanzar el mínimo en ese mes, luego aumentaron progresivamente hasta el mes de diciembre donde se registraron las máximas temperaturas que se mantuvieron hasta febrero. No se aprecian las temperaturas negativas correspondientes a las heladas que se registraron en los meses de junio (Temp. Mín. 1,50 m = -2,5 °C y Temp. Mín. 0,05 m = -6,7 °C) y julio (Temp. Mín. 1,50 m = -0,4 °C y Temp. Mín. 0,05 m = -2,6 °C).

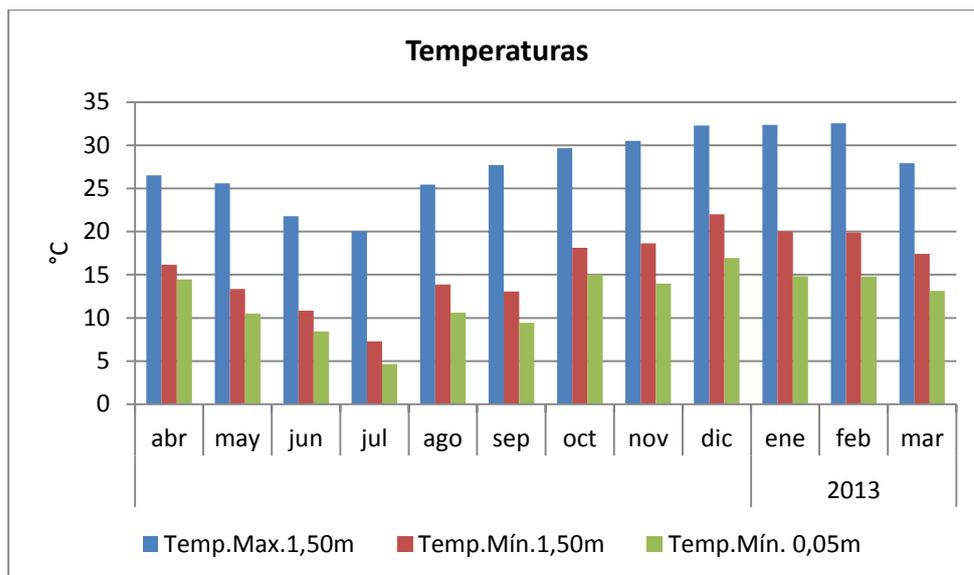


Figura 6: Promedios mensuales de temperaturas máximas y mínimas a dos niveles del suelo, registradas en Colonia Benítez.

En la Tabla 5 se muestran los valores promedios por estación de las temperaturas, a distintas alturas del suelo.

Tabla 5: Promedios por estación de temperaturas máximas y mínimas a dos niveles del suelo.

Elemento	Invierno	Verano
Temp. Max. 1,50m (°C)	24,5	30,9
Temp. Mín. 1,50m (°C)	12,4	19,3
Temp. Mín. 0,05m (°C)	9,7	14,8

En la Figura 7 de promedio mensual de heliofanía efectiva se aprecia que la radiación solar durante los meses de invierno promedió las 6,1 horas y en el mes de junio se registró la mínima de 4,6 horas. Mientras que en los meses de verano este parámetro promedió 8,5 horas y el mes de enero presentó el valor máximo de 10,1 horas.

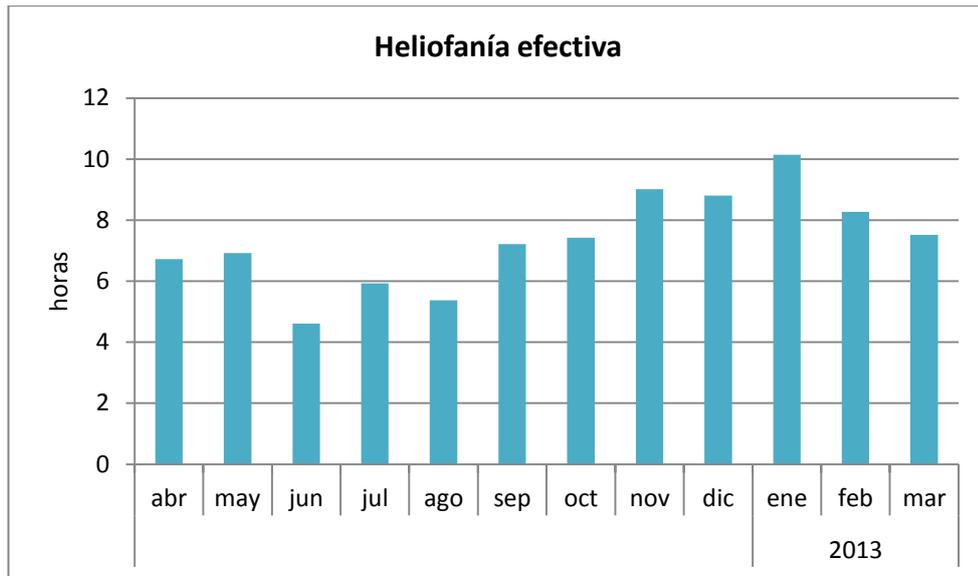


Figura 7: Promedio mensual de heliofanía efectiva, registrada en Colonia Benítez.

Observando la Figura 8 de total de precipitaciones mensuales, es evidente que en el período invernal las mismas fueron menores promediando un total de 58 mm y registrando un mínimo de 9,8 mm en el mes de julio. En la temporada de verano las lluvias promediaron en 165 mm y las máximas se registraron en octubre y marzo con 265,7 y 270,2 mm respectivamente.

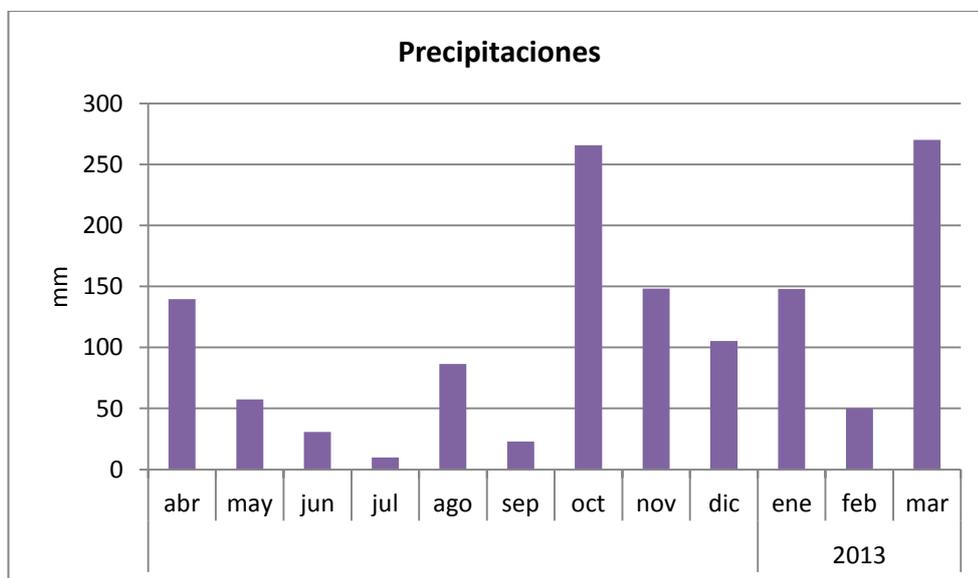


Figura 8: Total mensual de precipitaciones, registradas en Colonia Benítez.

4.3. Diseño de experimentos factorial 2³

En la Tabla 6 se observa la matriz del plan de experimentos para el diseño factorial aplicado, los factores, sus respectivos niveles y las respuestas obtenidas.

Tabla 6: Matriz del plan de experimentos y respuestas obtenidas.

Ensayo	Materia Prima (Kg)	Tiempo (min)	Estación	%CAL	Rto (%)
1	2	45	invierno	47,6	0,54
2	2	45	verano	43,8	0,81
3	2	90	invierno	47,5	0,63
4	1	90	invierno	41,4	0,76
5	1	45	invierno	45,7	0,67
6	2	90	verano	40,7	0,90
7	1	90	invierno	36,2	0,73
8	1	90	verano	49,5	1,05
9	2	45	verano	46,1	0,85
10	2	90	verano	43,9	0,98
11	1	45	verano	43,0	0,94
12	1	45	invierno	47,9	0,67
13	2	90	invierno	39,8	0,59
14	2	45	invierno	45,6	0,52
15	1	90	verano	50,0	0,99
16	1	45	verano	45,1	1,06

Nota: Composición relativa de citronelal (%CAL) y Rendimiento (Rto).

Analizando las gráficas de probabilidad normal de residuos para las respuestas %CAL y Rto de las Figuras 9 y 10 respectivamente, se verifica que el modelo se ajustó a los requisitos de implementación de ANOVA, ya que los residuos se distribuyen aproximadamente sobre la línea recta para ambas respuestas del diseño de experimentos.

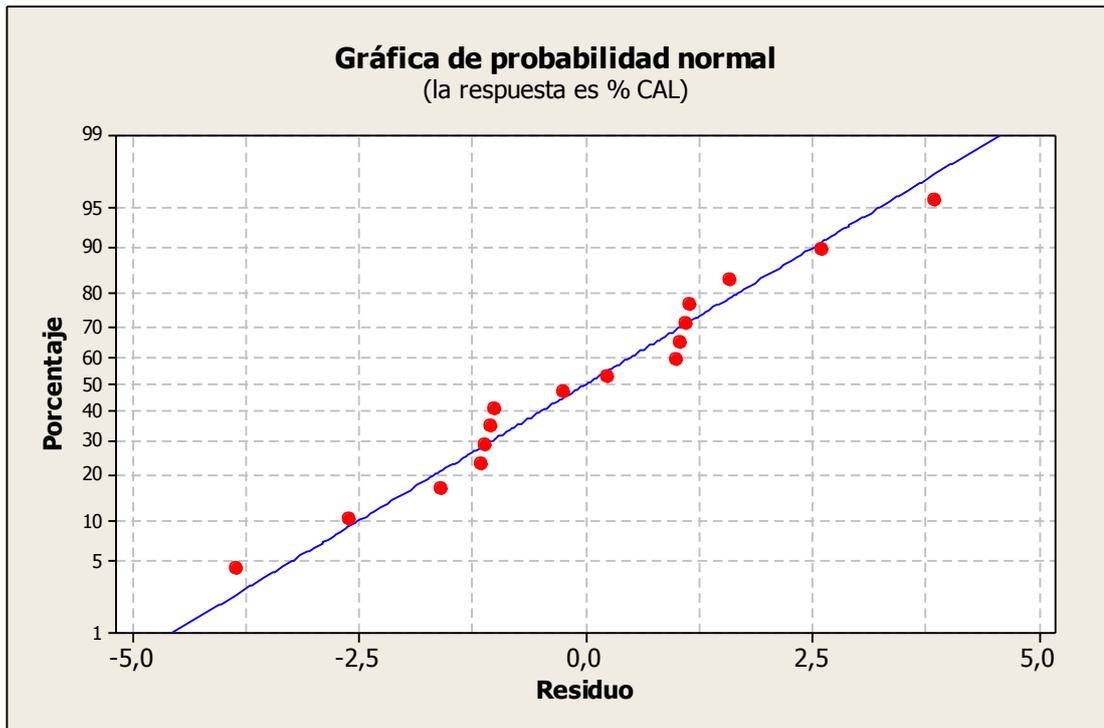


Figura 9: Gráficas de probabilidad normal para respuesta %CAL.

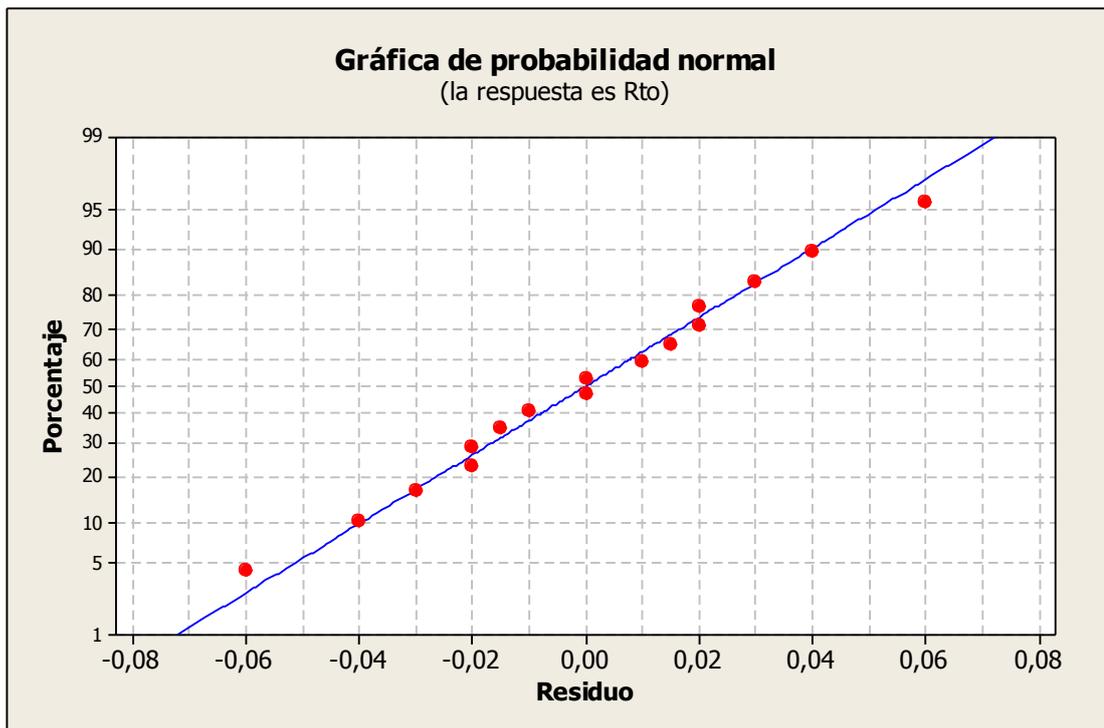


Figura 10: Gráficas de probabilidad normal para respuesta Rto.

Los resultados del ajuste del modelo para la respuesta %CAL de la Tabla 7, mostraron que los efectos de los factores principales y algunas interacciones no son

estadísticamente significativos, mientras que las interacciones de los factores tiempo*Estación y Materia Prima*tiempo*Estación sí lo son.

Tabla 7: Ajuste del modelo estadístico, valores p, respuesta %CAL.

Término	Valor p
Materia Prima (MP)	0,733
Tiempo (t)	0,179
Estación (E)	0,361
Materia Prima * tiempo	0,556
Materia Prima * Estación	0,071
Tiempo * Estación	0,031
Materia Prima * tiempo * Estación	0,037

Para el caso de la respuesta Rto de la Tabla 8, los resultados del ajuste del modelo indicaron que únicamente los efectos principales son estadísticamente significativos. Siendo además, la estación y la materia prima, las más influyentes ya que la precisión del software arrojó el valor p=0,000.

Tabla 8: Ajuste del modelo estadístico, valores p, respuesta Rto.

Término	Valor p
Materia Prima (MP)	0,000
Tiempo (t)	0,010
Estación (E)	0,000
Materia Prima * tiempo	0,296
Materia Prima * Estación	0,776
Tiempo * Estación	0,776
Materia Prima * tiempo * Estación	0,347

Estudio de los efectos:

Analizando la gráfica de efectos principales para la respuesta %CAL, Figura 11, se puede afirmar que los ensayos realizados con 1 Kg de materia prima, 45 minutos de proceso y en el verano produjeron mayor porcentaje de concentración relativa de citronelal en el aceite esencial de citronela.

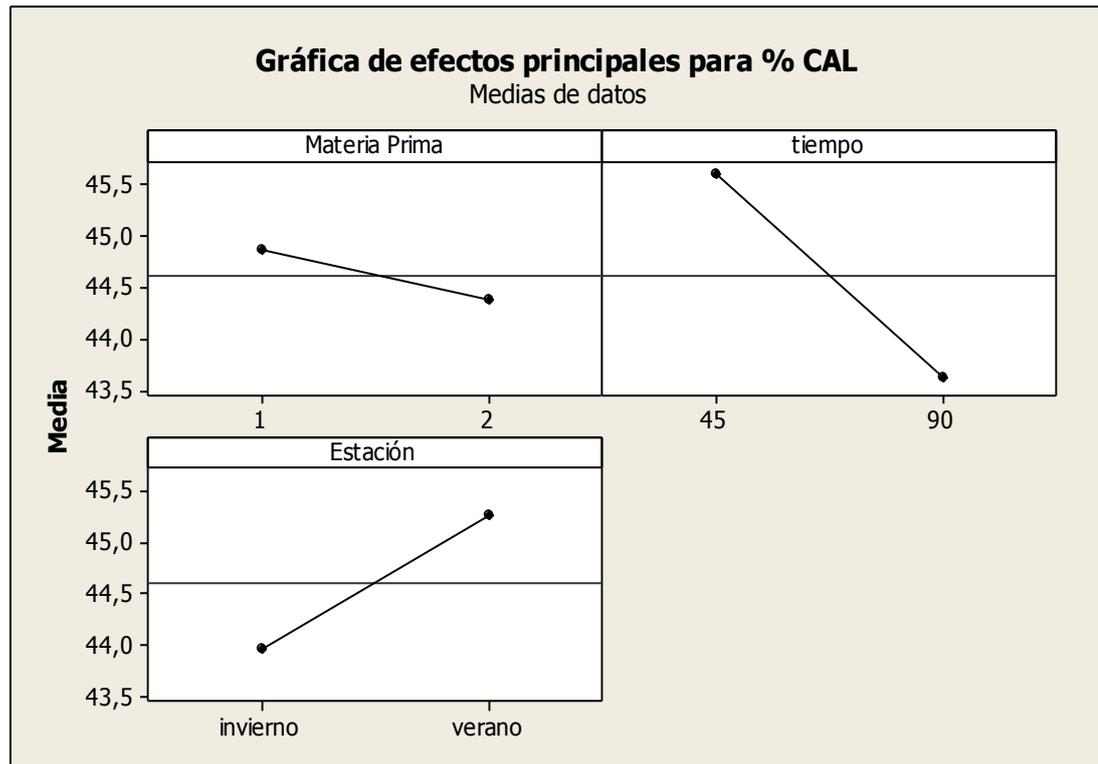


Figura 11: Gráfica de efectos principales, respuesta %CAL.

Debido a que en este experimento las interacciones fueron significativas para la respuesta de %CAL, hay que examinar las mismas ya que afectan la interpretación de los efectos principales.

En las gráficas de la Figura 12 se observó que los efectos más significativos se encontraron en las interacciones de materia prima*estación y tiempo*estación ya que las líneas de las gráficas son más perpendiculares.

Para la interacción Materia Prima*tiempo es evidente que con 45 minutos de ensayo la composición de citronelal en el aceite fue similar para 1 o 2 Kg de materia prima utilizada. Mientras que con 90 minutos de ensayo la composición de citronelal fue mayor para ensayos con 1 Kg.

En la interacción Materia Prima*Estación se observa que en invierno se obtuvo más citronelal trabajando con 2 Kg de materia prima, siendo que verano la cantidad de citronelal se benefició en la extracción con 1 Kg de materia prima.

La interacción tiempo*Estación muestra que en invierno se obtuvo mayor cantidad de citronelal con tratamientos de 45 minutos en vez de 90 minutos y en verano la composición de citronelal se vio favorecida a mayores tiempos de proceso.

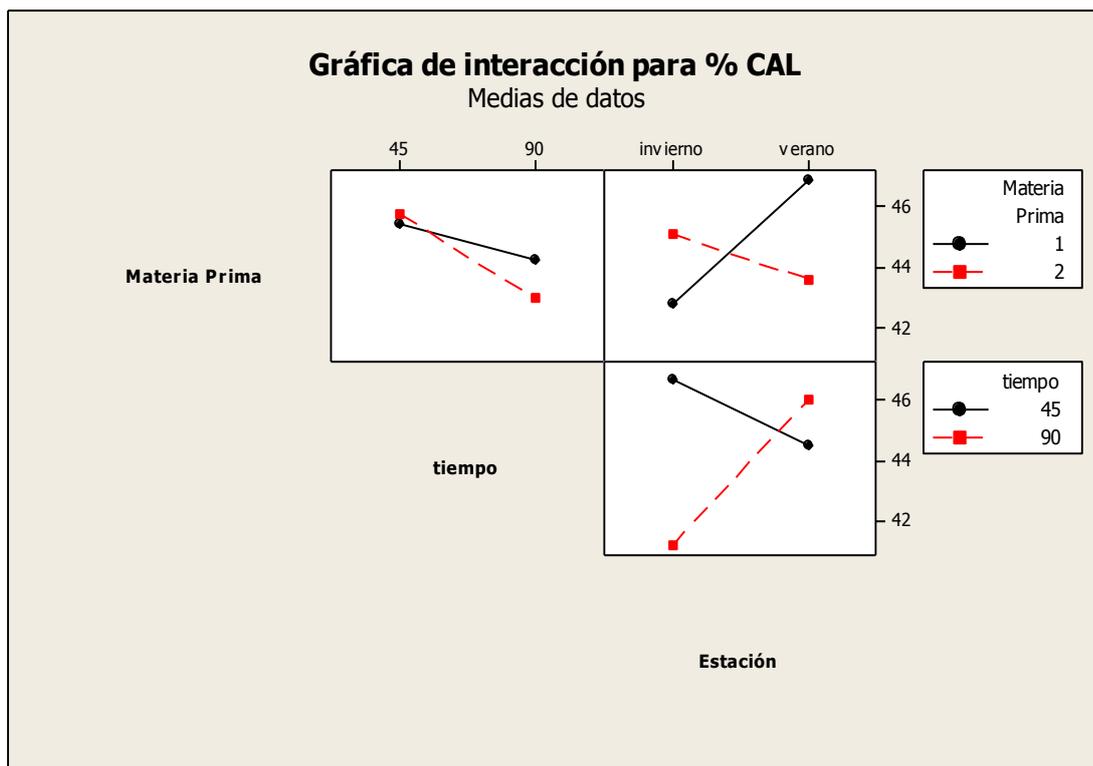


Figura 12: Gráfica de interacción, respuesta %CAL.

Estudios similares se realizaron en plantas de *C. winterianus* en la India, para evaluar el contenido y la composición del aceite esencial en relación con el período de cosecha y las condiciones del tiempo, los resultados determinaron que se obtiene un contenido de citronelal mayor en verano (Sastry Kakaraparthi, y otros, 2014).

También, investigaciones realizadas con geranio rosa perfumado (*Pelargonium spp.*), con el objeto de evaluar la composición de terpenoides bajo variaciones climáticas, mostraron que las condiciones del tiempo influyen en la composición del aceite esencial de estas plantas, obteniéndose mínimas concentraciones de linalol, geraniol y sus ésteres y máximas concentraciones de citronelol y sus ésteres durante los meses de verano (Rao, Kaul, Mallavarapu, & Ramesh, 1996).

En la gráfica de contorno para la respuesta %CAL de invierno, Figura 13, se observó que las condiciones de proceso que favorecen la obtención de un porcentaje relativo de citronelal > 46 % son: cantidad de materia prima entre 1 y 2 Kg y tiempo de proceso hasta 50 minutos. Para el verano, Figura 14, la de gráfica de contorno indicó que se obtiene un porcentaje relativo de citronelal > 47 % cuando

la cantidad de materia prima se encuentra entre 1 y 1,3 Kg y el tiempo de proceso entre 70 y 90 minutos. Pudiéndose superar el 49 % en la zona de trabajo con 1 kilo de materia vegetal y 85 a 90 minutos.

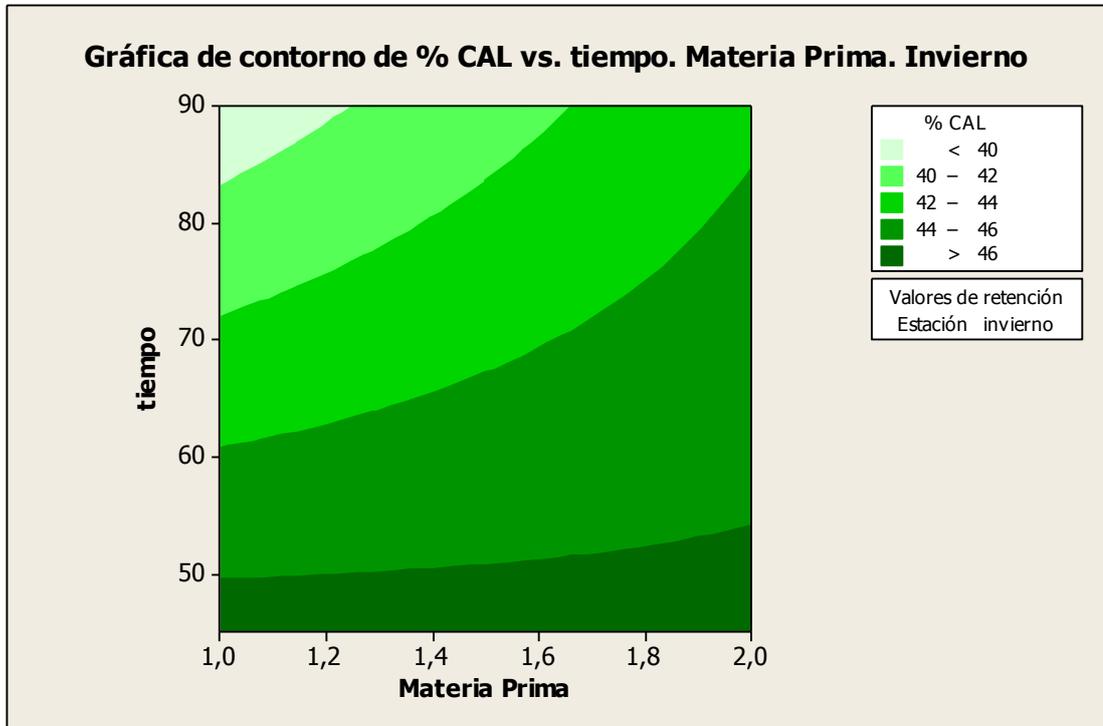


Figura 13: Gráfica de contorno Invierno, respuesta %CAL.

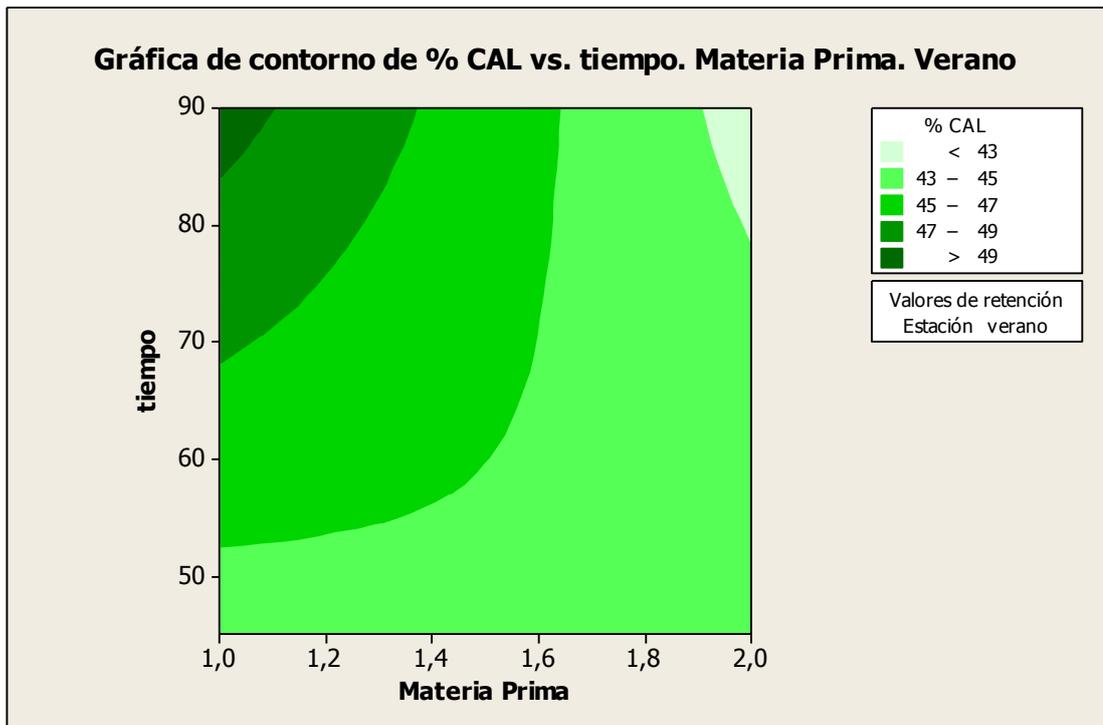


Figura 14: Gráfica de contorno Verano, respuesta %CAL.

Estudiando la Figura 15 de efectos principales para la respuesta Rto, se puede afirmar que los ensayos realizados con 1 Kg de materia prima, 90 minutos de proceso y en el verano produjeron mayor rendimiento de aceite esencial de citronela.

En ensayos similares realizados con *Eucalyptus citriodora* Hook del Norte de India, se observa que el rendimiento de aceite varía de 1 a 2,1% a lo largo del año. El mismo es alto cuando la temperatura es alta (mínimas temperaturas de 18 a 27°C y máximas de 31 a 40°C) y disminuye cuando la temperatura es relativamente baja (mínimas de 7 a 16°C y máximas de 23 a 30°C). Además, durante la temporada de lluvias, cuando la temperatura y la humedad son elevadas, se observa un rendimiento de aceite alto entre 1,8 y 2,1% (Manika, Mishra, Kumar, Chanotiya, & Bagchi, 2012).

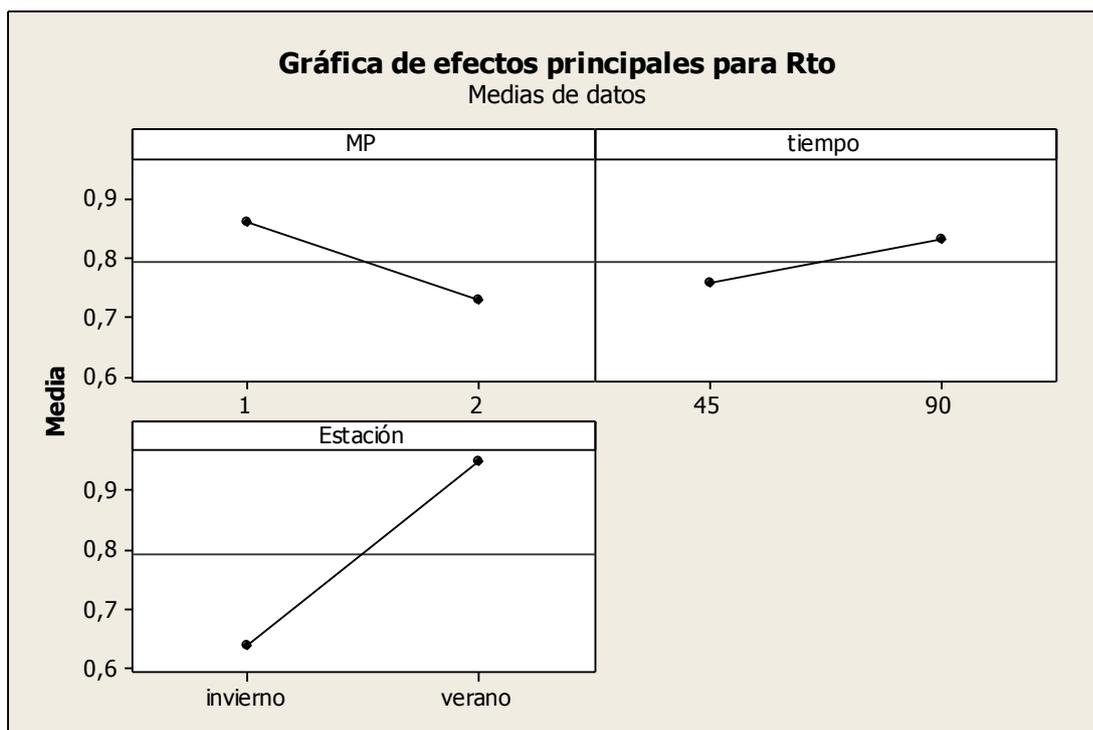


Figura 15: Gráfica de efectos principales, respuesta Rto.

Observando la gráfica de contorno de la figura 16, para el Rto de invierno, se determinó que las condiciones de proceso que producen un rendimiento de aceite esencial > 0,7 % son de 1 a 1,2 Kg de materia prima y tiempos de proceso entre 60 y 90 minutos. Mientras que la Figura 17, de la respuesta en verano, mostró que para

obtener rendimientos superiores a 0,95% hay que operar en la zona de materia vegetal hasta 1,8 Kg y tiempo hasta 90 minutos.

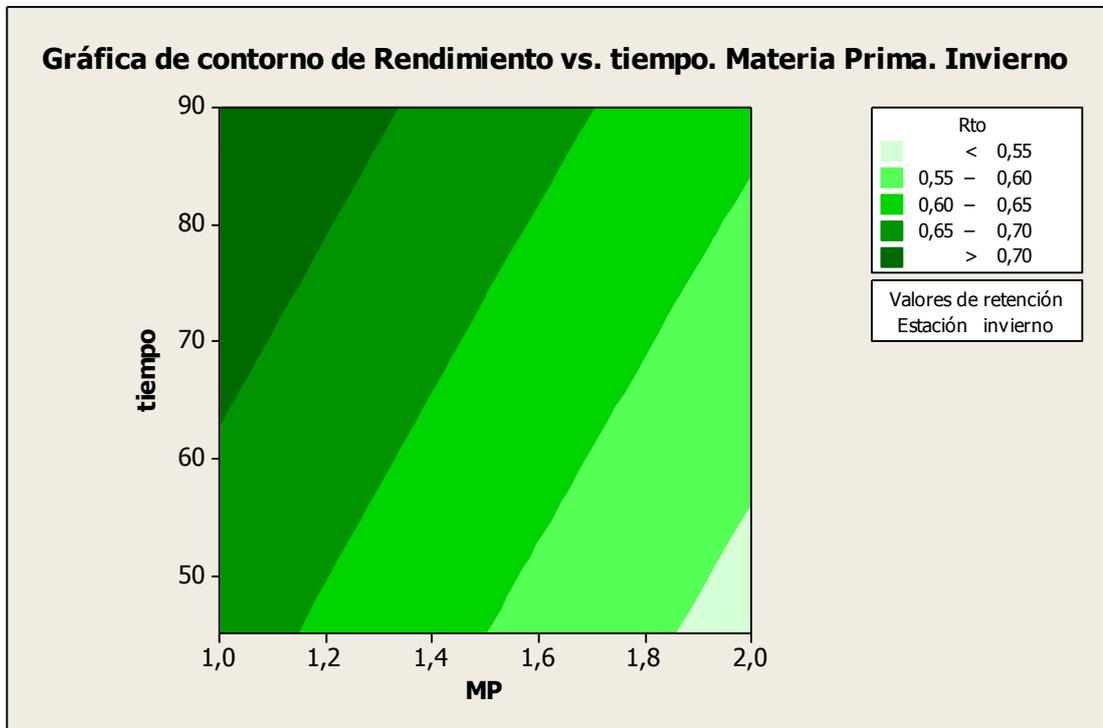


Figura 16: Gráfica de contorno Invierno, respuesta Rto.

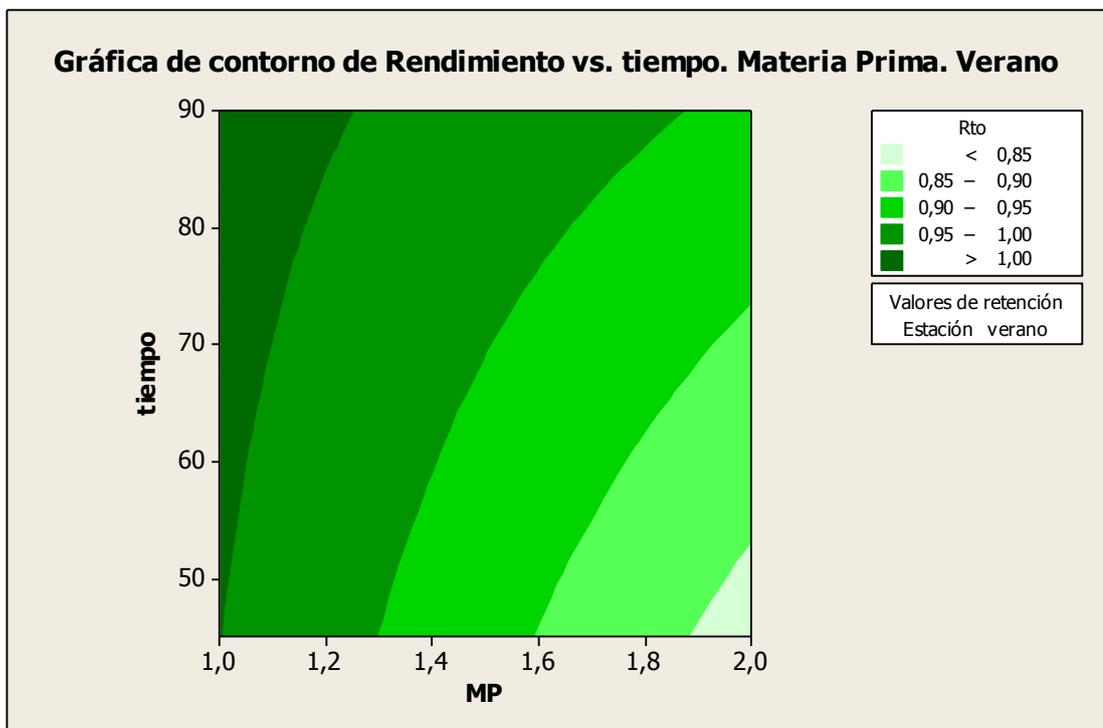


Figura 17: Gráfica de contorno Verano, respuesta Rto.

4.4. Caracterización físico-química del aceite de citronela

El análisis por CG del aceite de citronela, Figura 18, reveló la presencia de componentes principales: limoneno, citronelal, citronelol y geraniol. Siendo el citronelal el de mayor contribución relativa porcentual. En la Tabla 9 se presentan los tiempos de retención en minutos, los porcentajes relativos y la identificación de los componentes principales del aceite esencial de citronela. De forma similar se procedió con todas las muestras (n= 16).

Tabla 9: Referencias del cromatograma de la Figura 18.

Tiempo (min)	Cantidad relativa (%)	Identificación
1,992	6,76	limoneno
8,055	43,84	citronelal
12,047	8,61	citronelol
12,96	11,41	geraniol

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del aceite obtenido en cada ensayo del diseño de experimentos y los rendimientos se presentan en la Tabla 10. Se observa que los valores de densidad relativa, rotación óptica e índice de refracción son comparables con los valores de referencia de la Norma IRAM-SAIPA 18520: 2006 "Aceite de citronela de Argentina tipo Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)".

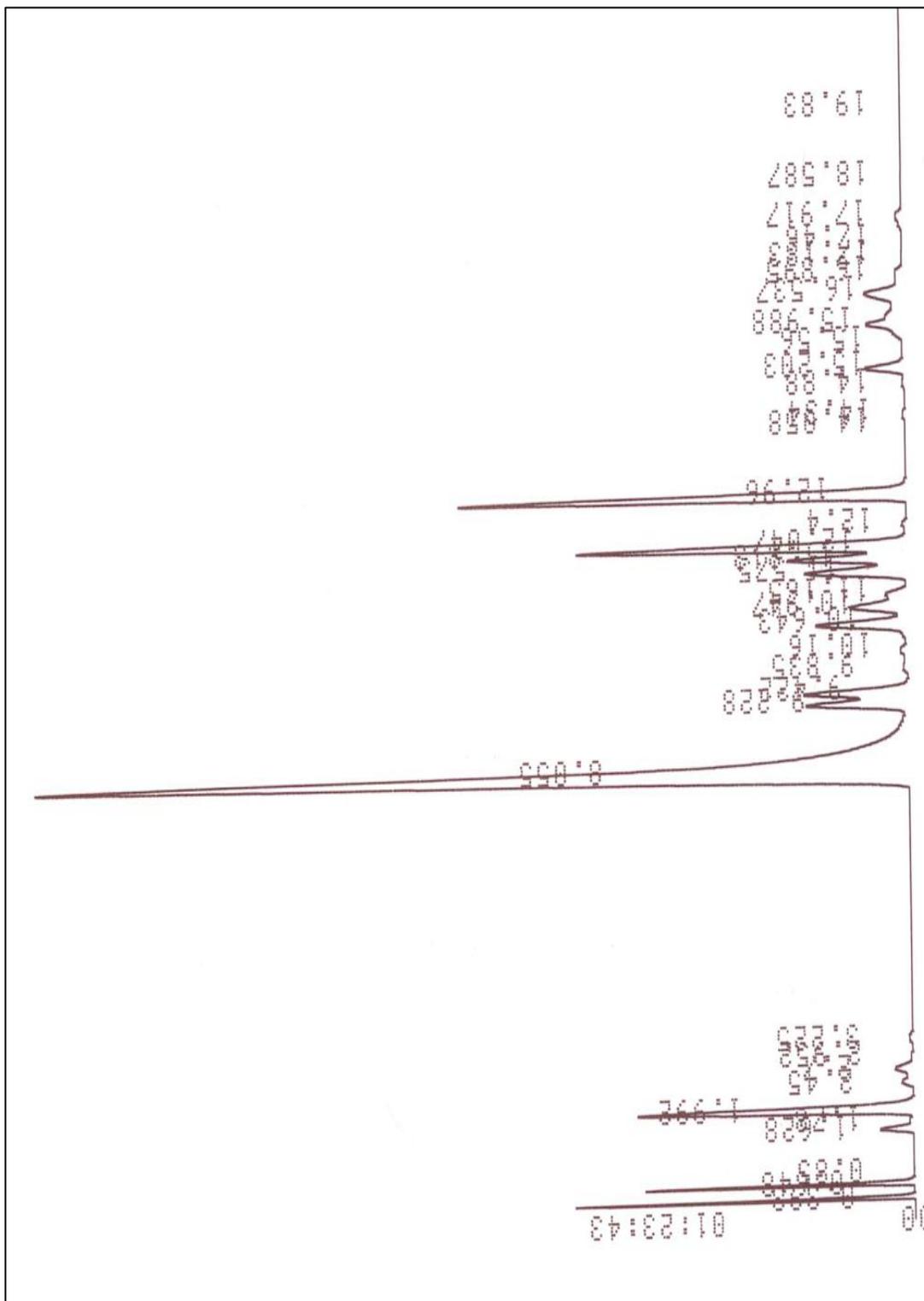


Tabla 10: Resultados de caracterización fisicoquímica y rendimientos con valores de referencia según IRAM-SAIPA 18520: 2006.

Ensayo	% CAL	Vol. (ml)	Densidad $d^{20^{\circ}\text{C}}_{4^{\circ}\text{C}}$ 0,881 a 0,900	R. Óptica $[\alpha]_D^t$ -0,5° a -6,0°	I. Refracción n_D 1,4630 a 1,4750
1	47,6	12,1	0,890	-1,73	1,4750
2	43,8	18,1	0,892	-2,75	1,4650
3	47,5	14,0	0,893	-1,25	1,4750
4	41,4	8,5	-	-	1,4655
5	45,7	7,5	-	-	1,4750
6	40,7	20,2	0,900	-2,08	1,4750
7	36,2	8,2	-	-	1,4700
8	49,5	11,7	0,897	-2,58	1,4700
9	46,1	18,9	0,900	-1,02	1,4655
10	43,9	22,0	0,892	-1,33	1,4750
11	43,0	10,5	0,894	-1,23	1,4750
12	47,9	7,5	-	-	1,4700
13	39,8	13,1	0,892	-1,63	1,4750
14	45,6	11,6	0,896	-1,55	1,4750
15	50,0	11,1	0,899	-1,47	1,4655
16	45,1	11,8	0,895	-1,60	1,4700

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

La metodología del diseño de experimentos seguida de un análisis ANOVA es una potente herramienta para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, tanto en la industria como en el laboratorio de análisis, ya que la aplicación del método científico permite obtener conclusiones válidas y objetivas.

El diseño factorial aplicado en esta tesis permitió identificar los efectos que tienen las variables (cantidad de materia prima, tiempo de proceso y estación del año) y sus interacciones en la calidad y rendimiento del aceite de citronela, extraído por arrastre con vapor de agua a escala piloto.

En cuanto a la calidad del aceite esencial, se pudo comprobar que debido a las interacciones entre las variables, para cada estación quedan determinadas las condiciones que favorecen la obtención de mayor porcentaje relativo de citronelal. En el invierno, el porcentaje relativo de citronelal supera el 46 % cuando la cantidad de materia prima varía entre 1 y 2 Kg y el tiempo de proceso llega a 50 minutos; mientras que en el verano, el porcentaje relativo de citronelal alcanza el 47 % cuando la cantidad de materia prima se encuentra entre 1 y 1,3 Kg y el tiempo de proceso entre 70 y 90 minutos. Además, se puede superar el 49 % de concentración relativa de citronelal trabajando con 1 kilo de materia vegetal y 85 a 90 minutos.

Para el rendimiento, fue posible establecer el verano como la estación que beneficia el alto porcentaje de esencia obtenida, por sus características de altas temperaturas, mayor radiación solar debido a la longitud del día, abundantes precipitaciones y material vegetal con hojas de mayor superficie y totalmente verdes.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akhila, A. (2010). *Essential Oil-Bearing Grasses -The genus Cymbopogon*. Florida: Taylor & Francis Group.
- Akhila, A., & Rani, M. (2002). Chemical constituents and essential oil biogenesis in *Vetiveria zizanioides*. In M. Maffei, *Vetiveria: The genus Vetiveria* (pp. 73-109). Nueva York: Taylor & Francis.
- Bandoni, A. (2003). Las Plantas Aromáticas. In A. Bandoni, *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica* (p. 13). Buenos Aires: CYTED.
- Bandoni, A., & Dellacasa, E. (2010). Importancia de las Plantas Aromáticas en el Contexto Internacional. In E. Dellacasa, *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana* (pp. 11-14). Puerto Alegre: EDIPUCRS.
- Beneti, S., Rosset, E., Corazza, M., Frizzo, C., Di Luccio, M., & Oliveira, V. (2011). Fractionation of citronella (*C. winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. *Journal of Food Engineering*, (pp. 348-354).
- Berti, G., Monti, M., & Salmaso, L. (2002). *Introduzione alla Metodologia DOE nella Sperimentazione Meccanica*. Italia: Cleup.
- Box, G., & Hunter, J. (1989). *Estadística para Experimentadores*. Barcelona: Reverté SA.
- Carey, F. (2003). *Organic Chemistry*. EUA: Mc Graw Hill.
- Carlson, R. (1992). *Desing and Optimization in Organic Synthesis*. Paises Bajos: Elsevier.
- Cassel, E., & Vargas, R. (2006). Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus*. Essential Oil Extraction by Steam Distillation. *Sociedad Química de México*, (pp. 126-129).
- Chamorro, E., Ballerini, G., Sequeira, A., Velasco, G., & Zalazar, F. (2008). Chemical Composition of Essential Oils from *Tagetes Minuta L.* Leaves and Flowers. *Journal of the Argentine Chemical Society*, (pp. 80-86).
- Chamorro, E., Zambón, S., Morales, W., Sequeira, A., & Velasco, G. (2012). Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. In B. S. Çelikbıçak, *Gas Chromatography in Plant Science, wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications* (pp. 15/1-19). InTech.

-
- Code of Federal Regulation. (2014). Food and Drug Administration. EUA: Government Printing Office.
- Devore, J. (2009). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. México: Cengage Learning.
- Elder, H. (2010). Optimización de los Procesos Extractivos Aplicados a Especies Aromáticas y Medicinales. In E. Dellacasa, *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana* (pp. 37-62). Puerto Alegre: EDIPUCRS.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wilström, C., & Wold, S. (2008). *Desing of Experiments: Principles and Applications*. Suecia: Umetrics AB.
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., & Scheffer, J. (1997). Physiological Aspects of Essential Oil. In C. Franz, A. Máthé, & G. Buchbauer, *Essential Oils: Basic and Applied Research* (pp. 95-107). Viena: Allured Publishing.
- Franz, C., & Novak, J. (2010). Sources of Essential Oils. In K. Hüsnü Can Baser, & G. Buchbauer, *Handbook of Essential Oils - Science Technology and Applications* (pp. 39-81). Florida: Taylor & Francis Group.
- Guenther, E. (1960). *The Essential Oils*. Toronto: Van Nostrand Company.
- Harrewijn, P., Van Oosten, A., & Piron, P. (2001). *Natural Terpenoids as Messengers*. EUA: Kluwer Academic Publishers.
- Hüsnü, K., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. EUA: Taylor & Francis Group.
- IRAM-SAIPA. (2002). Norma 18504. *Productos Aromatizantes. Determinación de la Densidad Relativa a 20°C. Método de Referencia*. Argentina: IRAM.
- IRAM-SAIPA. (2002). Norma 18505. *Productos Aromatizantes. Determinación del Índice de Refracción*. . Argentina: IRAM.
- IRAM-SAIPA. (2002). Norma 18507. *Productos Aromatizantes. Determinación de la Rotación Óptica*. . Argentina: IRAM.
- IRAM-SAIPA. (2006). Norma 18520. *Productos Aromatizantes. Aceites Esenciales. Aceite de Citronela de Argentina, tipo Java (Cymbopogon winterianus Jowitt)*. Argentina: IRAM.
- Kuehl, R. (2000). *Diseño de Experimentos*. México: Thompson Learning.
- Lenardao, E., Botteselle, G., Azambja, G., & Jacob, R. (2007). Citronelal as Key Compound in Organic Synthesis. *Tetrahedron*,(pp. 6671-6712).

- León, J. (2000). *Botánica de Cultivos Tropicales*. San José: Agroamérica del HCA.
- Manika, N., Mishra, P., Kumar, N., Chanotiya, C., & Bagchi, G. (2012). Effect of season on yield and composition of the essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook leaf grown in sub tropical conditions of North India. *Medicinal Plants Research*, (pp.2875-2879).
- Marco, C., Innecco, R., Mattos, S., Borges, N., & Nagao, E. (2007). Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Revista de Horticultura Brasileira*, (pp. 429-432).
- Massart, L., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., & Lewi, P. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Amsterdam: Elsevier.
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. EUA: Limusa Wiley.
- Montgomery, D., & Runger, G. (2002). *Probabilidad y Estadística Aplicada a la Ingeniería*. México: Mc Graw Hill.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1990). *Química Orgánica*. México: Fondo Educativo Interamericano S.A.
- Nunes, D., Moura Linck, V., Lourenço da Silva, A., Figueiró, M., & Elisabetsky, E. (2010). Psychopharmacology of Essential Oils. In K. Hüsnu Can Baser, & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils : science, technology, and applications* (pp. 297-306). Florida: Taylor & Francis.
- Panda, H. (2005). *Cultivation and Utilization of Aromatics Plants*. New Delhi: Asia Pacific Business Press Inc.
- Pank, F. (2007). Use of breeding to customise characteristics of medicinal and aromatic plants to postharvest. *Stewart Postharvest Review*, (pp. 1-4).
- Rao, B., Kaul, P., Mallavarapu, G., & Ramesh, S. (1996). Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scented geranium (*Pelargonium species*). *Biochemical Systematics and Ecology*, (pp. 627-635).
- Ringuelet, J., & Cerimele, E. (2010). Buenas Prácticas Agrícolas para Cultivos Aromáticos. Su incidencia en la Calidad. In E. Dellacasa, *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana* (pp. 15-36). Puerto Alegre: EDIPUCRS.
- Rocha, S., Ming, L., & Marques, M. (2000). Influencia de Cinco Temperaturas de Secagem no Rendimento e Composição do Óleo Essencial de Citronela

-
- Cymbopogon winterianus* Jowitt. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, (pp. 73-78).
- Rodríguez Álvarez, M., Alcaraz Meléndez, L., Real, C., & Sergio, M. (2012). Procedimientos para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Rowe, D. (2005). *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- SAGPYA. (2001). Resolución 530. *Normas de Buenas Prácticas de Higiene y Agrícolas para la Producción Primaria (cultivo-cosecha), Acondicionamiento, Almacenamiento y Transporte de Productos Aromáticos*. Buenos Aires.
- Salamon, I. (2007). Effect of the internal and external factors on yield and qualitative–quantitative characteristics. *Acta Horticulturae* 749, (pp. 45-64).
- Sastry Kakaraparathi, P., Srinivas, K., Kotesk Kumar, J., Niranjana Kumar, A., Rajput, K., & Maheswara Sarma, U. (2014). Variation in the essential oil content and composition of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) in relation to time of harvest and weather conditions. *Industrial Crops and Products*, (pp. 240-248).
- Schmidt, E. (2010). Production of Essential Oils. In K. Hüsnü Can Baser, & G. Buchbauer, *Handbook of essential oils : science, technology, and applications* (pp. 83-120). Florida: Taylor & Francis Group.
- Tejero García, I. (2009). *Estadística Práctica Aplicada a la Calidad: Análisis de Varianza y Diseño de Experimentos*. Madrid: Cyan.
- Walter, E., & Pronzato, L. (1990). *Qualitative and Quantitative Experiment Desing for Phenomenological Models*. Francia: Automatica.
- Zygadlo, J., & Juliani, H. (2000). Bioactivity of Essential Oils Components. *Curr Top Phytochem*, 203-214.