

**ESTUDIO DE LA HIDRODESTILACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia*
alba (Mill.) N.E.Br., EN UN DESTILADOR A ESCALA PILOTO**

LILIAN ANDREA TORRES TORRES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FÍSICO QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**ESTUDIO DE LA HIDRODESTILACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia
alba* (Mill.) N.E.Br., EN UN DESTILADOR A ESCALA PILOTO**

LILIAN ANDREA TORRES TORRES

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
INGENIERO QUÍMICO**

Director:

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ

Químico PhD.

Escuela de Química

Codirector:

RAMIRO MARTÍNEZ REY

Ingeniero Químico PhD.

Escuela de Ingeniería Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

A Dios por darme la vida y la oportunidad de realizar este sueño.

A mi padre que desde el cielo me ha dado fortaleza.

A mi mami y hermanito por su cariño y apoyo incondicional.

A mi esposo Andrés por su amor, compañía y paciencia

A mi hija Isabella por llenar mi vida de ternura y amor.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jairo René Martínez, director del proyecto y a la doctora Elena Stashenko por compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de trabajar en el centro de investigación CENIVAM.

Al doctor Ramiro Martínez Rey, co-director del proyecto por su colaboración.

A Andrea Juliana Agudelo, quien amablemente me oriento en el análisis de los datos.

A Carlos Alberto Ruiz Nova, estudiante de maestría por su paciencia en la orientación de este trabajo.

A Carlos Alberto Rueda, quien siempre me dio animo e hizo más agradable el tiempo en el que se desarrolló este trabajo.

A mi hija Isabella quien es el motor de mi vida, a mi esposo por su apoyo incondicional y a toda mi familia, por creer en mí, en especial a mis primas Claudia Rodríguez y Leonor Sanabria por hospedarme un su hogar.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 LOS ACEITES ESENCIALES	18
2.2 PRINCIPALES USOS DE LOS ACEITES ESENCIALES	18
2.3 TECNICAS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	19
2.3.1 Destilación por arrastre con vapor	19
2.3.2 Destilación agua-vapor	19
2.3.3 Hidrodestilación o destilación con agua	19
2.4 <i>LIPPIA ALBA</i> (MILL) N.E. BROWN	20
2.4.1 Componentes Mayoritarios del Aceite Esencial de <i>LIPPIA ALBA</i>	21
2.4.1.1 La Carvona	21
2.4.1.2 Limoneno	22
2.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL	23
2.5.1 Cromatografía de gases	23
2.5.2 Espectrometría de masas	23
2.6 DISEÑOS EXPERIMENTALES	24
2.6.1 Diseño central compuesto más estrella	24
2.6.1.1 Variables a considerar en el proceso de hidrodestilación del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	25
3. METODOLOGÍA	27
3.1 TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL VEGETAL	27

3.1.1 Cosecha y traslado del material vegetal	27
3.1.2 Picado del material vegetal	27
3.1.3 Secado del material vegetal	27
3.2 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN	28
3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS	29
3.4 ANALISIS DE LAS MUESTRAS POR GC- MS	29
3.4.1 Cromatografía de gases en columna en fase estacionaria apolar	30
3.4.2 Identificación y cuantificación	31
3.5 APLICACIÓN DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO MAS ESTRELLA	32
3.6 BALANCE DE MASA Y ENERGÍA	34
3.6.1 Balance de masa	34
3.6.2 Balance de energía	35
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	38
4.1 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i> .	38
4.1.1 Rendimiento de los aceites esenciales	38
4.1.2 Identificación y cuantificación	40
4.1.3 composición de los aceites esenciales	41
4.1.3.1 Componente Carvona	41
4.1.3.2 Componente Limoneno	42
4.2 BALANCE DE MASA Y ENERGÍA	46
4.2.1 Balance de masa	46
4.2.2 Balance de energía	47
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Niveles para el diseño experimental.	34

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de <i>Lippia alba</i> .	21
Figura 2. Estructura del isómero de la carvona (-)R-carvona	22
Figura 3. Estructura del isómero del R-(+) limoneno.	22
Figura 4. A. corridas factoriales 2^k , B. corridas axiales $2k$, C. punto central.	25
Figura 5. Equipo piloto de hidrodestilación	28
Figura 6. Graficas del rendimiento de AE en función de los efectos de: a. T y b. H, y de c. la interacción TH.	39
Figura 7. Graficas de la cantidad de carvona como función de: a. T y b. H y de c. la interacción HD	41
Figura 8. Grafica para los efectos T, H y D del componente Limoneno	43
Figura 9. Graficas de la cantidad de limoneno en función de las interacciones de: a. TH, b. TD y c. HD.	45

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Análisis Cienciométrico	55
Anexo B. Tratamiento del material vegetal antes de la destilación	57
Anexo C. Secado del material vegetal	58
Anexo D. Balance de masa	59
Anexo E. Rendimientos y cantidades de carvona y limoneno en los AE obtenidos en cada uno de los experimentos realizados	61
Anexo F. Tablas del análisis de varianza, ANOVA, para las respuestas rendimiento, cantidad de carvona y cantidad de limoneno	63
Anexo G. Identificación de los componentes del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	65
Anexo H. Tablas de los modelos elaborados para cada variable de respuesta	66

ABREVIATURAS

% p/p	Porcentaje peso a peso.
°C	Grado (s) Celsius.
μL	Microlitro (s).
AE	Aceite esencial.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de investigación en Biomoléculas.
cm	Centímetro (s).
FID	<i>Flame ionization detector</i> (Detector de ionización en llama).
g	Gramo (s).
GC-MS	Gas chromatograph(y) - mass spectrometry (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas).
h	Hora.
kg	Kilogramo.
L	Litro.
m	Metro (s).
m³	Metro (s) cúbicos (s).
min	Minuto (s).
mm	Milímetro (s).
MSD	<i>Mass selective detector</i> (Detector selectivo de masas).
s	Segundo (s).

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DE LA HIDRODESTILACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., EN UN DESTILADOR A ESCALA PILOTO*

AUTOR(A): LILIAN ANDREA TORRES TORRES**

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial, hidrodestilación, *Lippia alba*, Diseño central compuesto, GC-MS.

DESCRIPCIÓN

La *Lippia alba* es un arbusto que por sus características químicas resulta muy apropiado para usos botánicos y etnofarmacológicos.

En este trabajo se estudió el proceso de hidrodestilación del aceite esencial de *Lippia alba* en un destilador a escala piloto y el efecto de las condiciones de operación sobre el rendimiento y la composición de dicho aceite. Los factores estudiados en el proceso de hidrodestilación fueron el tamaño de partícula, la humedad del material vegetal y la densidad de carga. Las variables de respuesta consideradas fueron el rendimiento y la composición del aceite esencial obtenido. El aceite fue obtenido por hidrodestilación en un destilador a escala piloto, analizado e identificado por cromatografía de gases y espectrometría de masas con base en sus índices de retención y espectros de masa. Los principales componentes mayoritarios identificados en el aceite fueron la carvona (388.208 g/kg_{AE}) y el limoneno (491.722 g/kg_{AE}).

Se determinó que las variables que tuvieron un efecto significativo sobre el rendimiento fueron el tamaño de partícula y la humedad y la interacción entre ellas. Los mayores rendimientos de aceite esencial se obtuvieron usando la humedad del 17% y el valor medio para el tamaño de partícula (6.5mm). Las variables que afectaron la cantidad de carvona en el aceite esencial fueron el tamaño de partícula y el porcentaje de humedad, las mayores cantidades de este componente se obtuvieron empleando un tamaño de 9 mm y una humedad del 45%. El limoneno fue el componente que se obtuvo en mayor cantidad (492 g limoneno/kg de aceite), utilizando un tamaño de partícula de 9 mm, una humedad del 16% y una densidad de carga de 227.5 kg/m³.

* Trabajo de grado.

** Facultad de fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Químico PhD Jairo René Martínez. Codirector: Ingeniero Químico PhD Ramiro Martínez Rey.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE ESSENTIAL OIL HYDRODESTILLATION *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., DISTILLER TO PILOT SCALE*

AUTHORS: LILIAN ANDREA TORRES TORRES**

KEY WORDS: Essential Oil, hydro-distillation, *Lippia alba*, Central composite design, GC-MS.

DESCRIPTION

The *Lippia alba* is a bush that by its chemical characteristics turns out to be very appropriate for botanical and ethno- pharmacological uses.

In this work the hydro-distillation of the essential oil of *Lippia alba* process was studied in a distiller to pilot scale and the effect of the conditions of operation on the performance and the composition of this oil. The factors studied in the process of hydro-distillation were the size of particle, the humidity of the vegetable material and the density of load. The obtained variables considered were the performance and the composition of the essential oil. The oil was obtained by hydro-distillation in a distiller to pilot scale, analyzed and identifying by chromatography of gases and spectrometry of masses based on its spectra and indices of retention. The main and majority identified components in the oil were the carvone (388.208 g/kg_{AE}) and the limonene (491.722 g/kg_{AE}).

It was determined that the variables that had a significant effect on the performance were the size of particle and the humidity and the interaction among them. The greater performances of essential oil were obtained using the humidity of the 17% and the medium value for the size of particle (6.5mm). The variables that affected the quantity of carvone in the essential oil were the size of particle and the percentage of humidity; the greater quantities of this component were obtained utilizing a size of 9 mm and a humidity of the 45%. The limonene was the component obtained in greater quantity (492 g limonene/kg of oil), utilizing a size of particle of 9 mm, a humidity of the 16% and a density of load of 227.5 kg/m³.

* Graduation Project.

** Physicochemical faculty. Chemical Engineering School. Director: Chemical PhD Jairo René Martínez. Codirector: Chemical Engineer PhD Ramiro Martínez Rey.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales han sido fundamentales, tanto como fuente alimenticia como materia prima para la elaboración de saborizantes, perfumes, preparaciones médicas y farmacéuticas, productos de higiene personal y doméstica; siendo entonces, su procesamiento, industrialización y comercialización factor influyente para el desarrollo económico y social a través de la historia de la humanidad. Al ser Colombia el segundo país más rico del mundo en diversidad biológica, pues cuenta con más de 55.000 especies vegetales, existe un potencial prometedor en el mercado internacional de las plantas aromáticas y aceites esenciales que pueden encontrarse en el país; como por ejemplo la *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) la cual es una de las especies promisorias del país, que se caracteriza por su alto contenido de carvona (>50%). Aunque este contenido de carvona en la planta puede variar dependiendo de muchos factores edafoclimáticos, la edad de la planta y la hora de colecta. La calidad y el precio de un aceite esencial dependen principalmente de la presencia en el aceite de compuestos activos de interés particular.

Es por esta razón que se crea la necesidad de estudiar los factores que afectan la obtención de un aceite esencial de buena calidad; este estudio hace parte de la línea de investigación sobre aceites esenciales del Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander y del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. En esta línea se han venido estudiando diferentes plantas tropicales con posible potencial para la extracción de aceites esenciales, incluyendo la especie *Lippia alba*.

Por medio del presente trabajo se desea establecer el mejor resultado de humedad, tamaño del material vegetal y densidad de la carga y su influencia en el

rendimiento y composición de los aceites esenciales obtenidos por medio de la hidrodestilación en un equipo a escala piloto.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las variables, densidad de la carga, humedad, y tamaño del material vegetal para determinar el efecto sobre el rendimiento y composición del aceite esencial de *Lippia alba*, obtenido por medio de hidrodestilación en un equipo a escala piloto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los valores máximo y mínimo de los niveles de las variables, tamaño de partícula, humedad del material vegetal y densidad de carga mediante algunas pruebas preliminares.
- Analizar las variables que afectan la concentración de los componentes mayoritarios y el rendimiento de los aceites esenciales de *Lippia alba*, obtenidos por hidrodestilación a escala piloto.
- Identificar y cuantificar (por técnicas cromatográficas y espectroscópicas) los principales componentes mayoritarios (carvona y limoneno) en el aceite esencial obtenido.
- Realizar un balance de masa y energía para establecer las pérdidas materiales y energéticas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LOS ACEITES ESENCIALES

Los AE o esencias vegetales son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales. Estos aceites esenciales son mezclas de compuestos químicos orgánicos provenientes de una misma familia química, los terpenoides, [1] los cuales mediante la asociación o no a otros componentes, generalmente volátiles, generan el olor o aroma de la planta. [2] En su mayoría son insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter y aceites vegetales y minerales; a condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos, poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos; sufren degradación química en presencia de la luz solar, del calor, de ácidos y álcalis fuertes. [1]

2.2 PRINCIPALES USOS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales no se consumen de una forma pura o directa. Se utilizan como insumos o materias primas en la industria cosmética, de perfumes, de aseo y limpieza, de plásticos, de pinturas, entre otras, dándole la fragancia a los diferentes productos. En las industrias de alimentos, licores, medicamentos, tabacos y cigarrillos, aportan aromas y sabores, y en la industria de biocidas, disolventes y petroquímica, contribuyen con diferentes actividades químicas [3].

2.3 TECNICAS DE OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Para obtener aceites esenciales los procesos más empleados son: destilación por arrastre con vapor, destilación agua-vapor y destilación con agua o hidrodestilación, gracias al mínimo impacto generado, contribuir a cerrar el ciclo de producción-consumo de materiales renovables y por el uso del agua, como insumo del proceso [1]. Otro método es la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas [2].

A continuación se describen brevemente estos métodos, haciendo mayor énfasis en la técnica que fue utilizada en este estudio, la hidrodestilación o destilación con agua, método por el cual se obtuvo el aceite esencial de *Lippia alba*.

2.3.1 Destilación por arrastre con vapor. Las plantas se colocan sobre una malla o criba ubicada a cierta distancia del fondo del destilador. El vapor saturado o sobrecalentado es provisto por una caldera a una mayor presión que la atmosférica, y atraviesa el material vegetal. Los componentes se volatilizan, y condensan en un refrigerante, siendo recogidos en un vaso florentino, donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad [2, 4].

2.3.2 Destilación agua-vapor. Al igual que en el proceso anterior, el material vegetal se coloca sobre la malla, pero en este método el fondo del destilador contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal [2, 4].

2.3.3 Hidrodestilación o destilación con agua. En este método como en los nombrados anteriormente, el material vegetal es cargado sobre una rejilla; sin embargo en este caso, el agua adicionada, siempre está en contacto con dicho

material; luego se deja en presencia de calor hasta el punto de ebullición, el vapor penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras. Esta solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie; el proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta.

Los vapores salen del destilador a través del cuello de cisne, por medio de una manguera, pasando luego a un sistema de condensación (condensador de serpentín) el cual utiliza agua como refrigerante, que es recirculada hacia el condensador por medio de una bomba, a continuación, éste vapor condensado y el aceite esencial, se recolectan en un separador de fases ó florentino. El destilador es calentado a fuego directo en su parte inferior por una fuente de calor de gas natural. Estos sistemas son muy utilizados en zonas rurales, debido a múltiples ventajas tales como: son fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro, son económicos, seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo [2,4]. (**Ver Anexo 4**).

2.4 LIPPIA ALBA (MILL) N.E. BROWN

La especie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, conocida en Colombia con el nombre de “Prontoalivio”, es un arbusto ramificado perteneciente a la familia (*Verbenaceae*), crece en forma erecta y en ambientes con alta luminosidad, su altura no es mayor de 1.5 m. El tallo es leñoso y con ramas largas, las hojas crecen de manera ternada y finamente dentadas, las flores son pequeñas y agrupadas, de color rosado, lila a violeta [2,5].

Figura 1. Planta de *Lippia alba*.



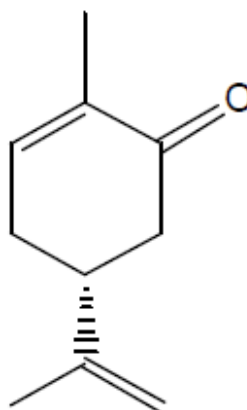
Fuente: Autor

En el **Anexo 1** se encuentra un análisis cuantitativo de la especie *Lippia alba* y sus componentes mayoritarios; se reportan las publicaciones realizadas por algunos países y los años de su publicación.

2.4.1 Componentes Mayoritarios del Aceite Esencial de *LIPPIA ALBA*:

2.4.1.1 La Carvona. La carvona $C_{10}H_{14}O$, es una cetona terpenoide, con dos enantiómeros (-)R-carvona y (+)S-carvona. El aceite esencial de la *Lippia alba* que se encuentra en nuestro país, contiene cerca del 50% de (-)R-carvona. La carvona, es utilizada principalmente en la síntesis orgánica fina, en la fabricación de pastas dentífricas, como agente antimicrobiano y como saborizante y aromatizante [9, 10, 2].

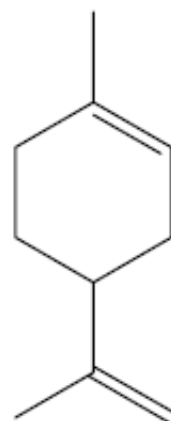
Figura 2. Estructura del isómero de la carvona (-)R-carvona



Fuente: Autor

2.4.1.2 Limoneno. El limoneno $C_{10}H_{16}$ es un monoterpeno ópticamente activo, es empleado como solvente en champús y jabones para mascotas, como disolvente en la elaboración de pinturas, y ha sido empleado como ingrediente activo de formulaciones pesticidas [10].

Figura 3. Estructura del isómero del R-(+) limoneno.



Fuente: Autor

2.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL

La identificación de la composición química de los aceites esenciales, actualmente está basada en métodos modernos como la cromatografía de gases capilar, empleando detectores convencionales, por ejemplo, selectivos de masas (MSD) y de ionización en llama (FID) [9].

2.5.1 Cromatografía de gases. La cromatografía es una técnica analítica utilizada para separar los componentes de una sustancia. Esta técnica está consiste en la repartición de los componentes de una muestra llamados solutos o analitos, entre dos fases: una estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido con un área superficial relativamente grande, y una fase móvil gaseosa la cual se percola o filtra a través de la fase estacionaria. La muestra es arrastrada por la fase móvil a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La distribución de las sustancias entre las fases estacionaria y móvil (equilibrio), se presenta de acuerdo con sus solubilidades a determinada temperatura, sus presiones de vapor relativas y la afinidad por la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se llama elución [9, 10].

2.5.2 Espectrometría de masas. Es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración) de las moléculas analizadas, previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el

sistema informático y representado en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z [2, 9, 11, 12].

2.6 DISEÑOS EXPERIMENTALES

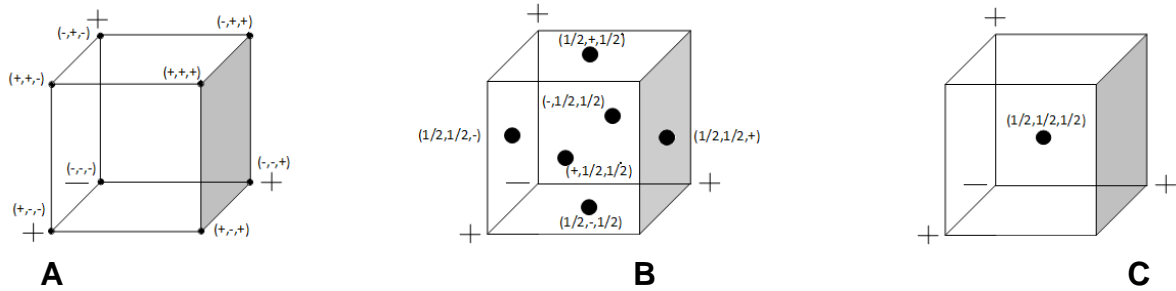
La calidad de los resultados analíticos depende de la confiabilidad de los números usados y obtenidos durante la marcha analítica; estos números pueden ser el resultado de una ecuación en la que se combinan valores de las diferentes variables usadas en el proceso.

Los diseños experimentales proporcionan un procedimiento eficiente para planificar experimentos, de forma que los datos obtenidos puedan ser analizados para alcanzar conclusiones y objetivos válidos [13].

2.6.1 Diseño central compuesto más estrella. La búsqueda de las mejores combinaciones de las variables de entrada utiliza el diseño experimental, que es un conjunto de pruebas en las que se realizan cambios sistemáticos y controlados a las variables de entrada para medir el efecto sobre la variable de salida. El diseño experimental aprovecha técnicas como la regresión múltiple, la superficie de respuesta y varias extensiones del análisis de varianza (ANOVA) [12, 13].

El diseño central compuesto más estrella consiste en un factorial o corridas factoriales 2^k , $2k$ corridas axiales y al menos un punto central (lo más común es usar entre 3 y 5 puntos centrales) además, cuatro puntos axiales que están a la misma distancia del centro del diseño [12].

Figura 4. **A.** corridas factoriales 2^k , **B.** corridas axiales $2k$, **C.** punto central.



Fuente: Autor

2.6.1.1 Variables a considerar en el proceso de hidrodestilación del aceite esencial de *Lippia alba*. Es necesario estudiar las variables que afectan el proceso para determinar los valores en los cuales se presentan altos rendimientos y mayor aprovechamiento del material vegetal.

- Tamaño del material vegetal: El objeto principal de reducir el tamaño de la planta es el de aumentar el área superficial de contacto entre el material vegetal y el vapor de agua para facilitar la mejor y mayor disolución de principios activos [14, 15]
- Densidad de la carga: Al ser cargada la materia prima vegetal se forma un lecho fijo el cual es el más usado en todas las escalas de producción de aceites esenciales, porque ofrece un mayor contacto entre la materia prima y el vapor de agua. Este lecho no debe ser demasiado compacto ya que se pueden presentar aglomeraciones del material vegetal que disminuyen la transferencia de masa [14, 15].
- Humedad del material vegetal: La razón más importante por la que se somete a secado el material vegetal es porque esta operación es una de las mejores alternativas para su conservación, ya que este proceso promueve el

mantenimiento y calidad de los componentes del material y reduce la proliferación de microorganismos [15,17]

3. METODOLOGÍA

3.1 TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Cosecha y traslado del material vegetal. Se recolectó el material vegetal de las fincas¹ del municipio del Socorro Santander. Esta recolección se hizo en horas de la mañana, de manera manual; luego el material vegetal recolectado se transportó en costales de fibra de polietileno hasta las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander sede Socorro para su posterior picado.

3.1.2 Picado del material vegetal. Después de recolectado, el material vegetal fue picado en promedio, 2 horas después de cosechado en una picadora Penagos Hermanos & CIA. Ltda., modelo PE- 800, rpm rotor 1400 – 1800, con número de serie 1141, potencia de 5 - 7.5 HP, obteniendo tamaños del material vegetal promedio (trozos) de 5 - 6.5 y 9 mm.

3.1.3 Secado del material vegetal. El secado del material vegetal se realizó extendiéndolo sobre mallas de polietileno, en un vivero construido con malla de polisombra el cual permite regular la luz que incide en el material vegetal; se extendió según el tamaño de partícula. El secado se llevó a cabo durante 1, 2, 4, 6 y 7 días.

En los **Anexos 2 y 3** se puede observar el tratamiento que se le hace al material vegetal antes de la destilación y la importancia del secado y picado del material vegetal.

¹ Villa Sonia, de la vereda El Naranjal, La Quinta, de la vereda La Culebra, Quebradas, de la vereda Quebradas, Villa Caldas, de la vereda Árbol Solo, Zuansinca, de la vereda Agua Buena y Santa Rosita, de la vereda el Naranjal

3.2 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN

Para este estudio se utilizó un destilador a escala piloto (que consiste de un destilador, una parrilla de falso fondo, un cuello de cisne, un condensador y un recipiente recolector o florentino), que emplea un quemador de gas como sistema de calentamiento, el cual no forma parte del recipiente donde se almacena la materia prima, es externo y suministra un flujo de calor constante. Para cada destilación se cargaron al destilador 10 kg de material vegetal previamente picado y secado formando un lecho fijo compacto, se adicionaron 50L de agua de manera que cubriera aproximadamente una tercera parte del material vegetal, siguiendo la metodología descrita en [2]. Esta mezcla acuosa se lleva a ebullición generando el vapor que entra en contacto con el lecho liberando el aceite esencial contenido, el cual debido a su alta volatilidad se va evaporando, siendo arrastrado hacia el tope del destilador. En la **Figura 5** se muestra el equipo empleado para llevar a cabo la hidrodestilación.

Figura 5. Equipo piloto de hidrodestilación.



Fuente: Autor

La mezcla vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un cuello de cisne. En el condensador la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiente. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, la cual es separada en un decantador dinámico llamado florentino. Este está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando debido a la inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. La temperatura del destilador después de la primera gota se mantuvo constante en 93°C. Este proceso termina, cuando el volumen de aceite esencial acumulado en el florentino no varía con el tiempo. En este estudio el tiempo de destilación fue de 3h. El aceite esencial es retirado del florentino y almacenado en un recipiente de vidrio ámbar y en una nevera a 4 °C. Finalmente se descarga y se limpia el destilador, siendo cargado para iniciar una nueva operación [1,2]

3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS

Para realizar el análisis cromatográfico, los AE de *Lippia alba* se separaron y secaron agregando sulfato de sodio anhidro. Ya libres de humedad los AE se pesaron en una balanza Mettler Toledo (PB 1502-S); Max: 1510 g, e= 0,1 g; Min: 0.5 g, d= 0.01 g, y se calculó el rendimiento con relación al peso inicial del materia vegetal. Luego se tomaron 50 μ L del aceite y se aforó a 1 mL con diclorometano, disolviendo la muestra. Se inyectó 1 μ L de la muestra al equipo de GC-MS para realizar el análisis.

3.4 ANALISIS DE LAS MUESTRAS POR GC- MS

Las muestras del aceite esencial de *Lippia alba* se analizaron por cromatografía de gases capilar en un cromatógrafo con columna de fase estacionaria apolar,

acoplada a un detector selectivo de masas, con el fin de identificar su composición química.

3.4.1 Cromatografía de gases en columna en fase estacionaria apolar.

Después de la preparación de las muestras, éstas se sometieron a un análisis por cromatografía de gases, en un equipo *Agilent Technologies 6890 plus* acoplado en un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*, equipado con puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split*, 1:30), e inyector automático *agilent 7863*. Para la determinación de los índices de retención se empleó una columna capilar DB-5MS de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). Como fase móvil se utilizó helio (99.9995%, AGA Fano, S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad lineal de 26 cm s⁻¹. La temperatura del horno fue programada desde 45°C (5 min) hasta 250°C a 5°C min⁻¹.

En la identificación de los componentes del aceite, el MSD fue usado con un sistema de datos HP-MS ChemStation. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV. Las temperaturas de cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes electrónicas reconstituidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 scan⁻¹, en el rango de *m/z* 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto.

3.4.2 Identificación y cuantificación. Para la identificación de los componentes se usaron criterios cromatográficos como espectrométricos.

- **Parámetros cromatográficos.** Utilizando los tiempos de retención t_R de los compuestos se calcularon los índices de retención, I_R . Éstos se obtuvieron teniendo en cuenta los tiempos de retención t_R , de una serie homóloga de sustancias de referencia y los hidrocarburos lineales desde C_{10} hasta C_{25} . Para su cálculo se utilizó la siguiente **Ecuación**. [1]

$$I_k = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

n = Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés.

N = Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés.

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto de interés (min).

t_{Rn} = Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés (min).

t_{RN} = Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés. (min).

Los I_R calculados para la fase estacionaria apolar se compararon con los reportados en la literatura [19].

- **Parámetro espectrométrico.** Los espectros de masas obtenidos de cada uno de los compuestos presentes en los aceites esenciales, se compararon con los almacenados en las bases de datos NIST 02, Willey 138K y Adams2005.

La cuantificación de los componentes identificados en el aceite esencial de *Lippia alba* se realizó mediante una curva de calibración teniendo en cuenta el área del estándar externo, ISTD, *n*-tetradecano (*Merck, Reference Substance for Gas Chromatography*).

3.5 APLICACIÓN DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO MAS ESTRELLA

Para el estudio de la influencia de cada una de las variables del proceso densidad de la carga (kg/m^3), tamaño (mm) y humedad del material vegetal (%) en la obtención del AE de *Lippia alba*, se evaluaron diferentes tamaños del material vegetal (5, 6.5, y 9 mm), combinados con distintas densidades de la carga (227.5, 248, y 268.5 kg/m^3) y la humedad del material vegetal (16, 17, 45 %); para ello se utilizó un diseño experimental central compuesto más estrella. Las variables de respuesta fueron el rendimiento y los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba*, limoneno y carvona. Para cada caso se elaboraron graficas de cada una de las variables y de sus interacciones, con los valores normalizados de las variables utilizando la aplicación Excel, además se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para mostrar los efectos que tienen significancia estadística; para esto se tomaron como variables de entrada:

- Tamaño del material vegetal (mm): Se tomaron los tamaños 5, 6.5 y 9 mm que están establecidos en la herramienta utilizada, (picadora Penagos Hermanos & CIA. Ltda., modelo PE- 800, rpm rotor 1400-1800, con número de serie 1141, potencia de 5-7.5 HP).

- Densidad de la carga (kg/m³): La densidad es la relación que existe entre el volumen y la masa de una sustancia o un objeto.

Los valores de la densidad de carga fueron calculados empleando la ecuación 2.

$$\rho = \frac{M}{V} = \frac{M}{\pi hr^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde M es la masa del material vegetal empleado en la destilación, h es la altura del espacio ocupado por el material vegetal y r es el radio del destilador.

- Humedad del material vegetal (%): El concepto de base húmeda se define como la relación de la masa de la humedad y la masa del material húmedo (material seco + humedad). (ver **Ecuación 3**).

$$W_H = \frac{M_H}{M_H + M_S} = \frac{\text{kg de humedad}}{\text{kg de humedad} + \text{kg de material seco}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para el cálculo de la humedad se pesaron aproximadamente 100 g de material vegetal y se eliminó totalmente la humedad, realizando el secado en una estufa *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia) durante un día a 105 °C. Finalmente se pesó la muestra nuevamente y se obtuvieron los datos para calcular la humedad.

Variables de salida

- Rendimiento (%)
- Composición (g compuesto/kg aceite esencial) del aceite esencial de *Lippia alba*.

Los niveles empleados para cada variable se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Niveles para el diseño experimental.

Variables de entrada	Niveles		
	-1	0	1
Tamaño del material vegetal (mm)	5	6,5	9
Humedad del material vegetal (%)	16	17	45
Densidad de la carga (kg/m ³)	227,5	248	268,5

Fuente: Autor

Se elaboraron modelos matemáticos empleando los datos obtenidos con el fin de analizar las interacciones entre las variables del proceso y las variables de respuesta, estos modelos se pueden ver en las **Tablas 10, 11, y 12** del **Anexo 8**.

3.6 BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

3.6.1 Balance de masa. Se realizó un balance de masa general al proceso, con base en los datos correspondientes al experimento en el cual se obtuvo el mayor rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba*. En el **Anexo 4** se encuentran las condiciones y los flujos correspondientes al balance de masa.

Balance de agua

$$M_{1\text{agua}} + M_{2\text{agua}} = M_{3\text{agua}^*} + M_{4\text{agua}} + M_{5\text{agua}} + M_{6\text{agua } v}$$

$$1,7 \text{ kg} + 50 \text{ kg} = 31,5 \text{ kg} + 5,6 \text{ kg} + 14 \text{ kg} + M_{6\text{agua } v}$$

$$M_{6\text{agua } v} = 0,6 \text{ kg}$$

Balance de aceite esencial

$$M_{1\text{aceite}} = M_{4\text{aceite}} + M_{5\text{aceite}} + M_{6\text{aceite}}$$

$$0,0560 \text{ kg} = 0,01572 \text{ kg} + 0,0266 \text{ kg} + M_{6\text{aceite}}$$

$$M_{6\text{aceite}} = 0,01368 \text{ kg}$$

Balance General

$$F_1 + F_2 = F_3 + F_4 + F_5 + F_6$$

$$10 \text{ kg} + 50 \text{ kg} = 31,5 \text{ kg} + 13,85972 \text{ kg} + 14,0266 \text{ kg} + 0,61368 \text{ kg}$$

3.6.2 Balance de energía. Con el fin de calcular la pérdida energética para una operación, se hizo un balance de energía global al proceso de hidrodestilación.

Calor Suministrado – Calor Aprovechado = Calor Perdido

Calor Suministrado:

Para calcular la energía suministrada se tomó la cantidad de gas natural empleado en el experimento en que se obtuvo el mayor rendimiento. Gas natural = 27m^3

$$Q_s = 491400 \text{ kJ}$$

Calor Aprovechado:

- Energía para el calentamiento del material vegetal (Q_1):

$$Q_1 = M^{mv} C_p^{mv} (T_f - T_i)$$

Ecuación 3

$$Q_1 = 750.4 \text{ kJ}$$

La masa de material vegetal es de 10 kg. $(T_f - T_i) = 67 \text{ }^\circ\text{C}$;

La capacidad calorífica de la planta es 1.12 kJ/kgK.

La capacidad calorífica de la *Lippia alba* fue calculada por la expresión de Siebel (1982) [16].

- Energía para el calentamiento del hidroddestilador (Q_2):

$$Q_2 = M^{hd} C_p^{hd} (T_f - T_i) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$Q_2 = 1273 \text{ kJ}$$

La masa estimada del equipo es de 47.5 kg;

La capacidad calorífica del acero AISI 304 es de 400 J/kgK.

- Energía para vaporizar el aceite esencial, considerado como un líquido en la película superficial (Q_3):

$$Q_3(T) = M^{aceite} \Delta H_{vap}^{aceite}(T) \quad \text{Ecuación 5}$$

$$M^{aceite} = 0.0266 \text{ kg}$$

$$\Delta H_{vap}^{aceite}(T) = 426 \text{ KJ/kg [18]}$$

$$Q_3 = 11.33 \text{ KJ}$$

La masa del aceite esencial es la obtenida en el experimento en el que se obtuvo mayor rendimiento.

- Energía para el calentamiento del agua (Q_4):

$$Q_4 = M^{H_2O} C_p^{H_2O} (T_f - T_i) \quad \text{Ecuación 6}$$

$$M^{H_2O} = 50 \text{ kg}$$

$$C_p^{H_2O} = 4.1813 \text{ kJ/kgk}$$

$$Q_4 = 14007.35 \text{ kJ}$$

- Energía para vaporizar el agua (Q_5):

$$Q_5(T) = M^{H_2O} \Delta H_{vap}^{H_2O}(T) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$M^{H_2O} = 14.6 \text{ kg}$$

$$\Delta H_{vap}^{H_2O}(T) = 2259.36 \text{ kJ/kg [18]}$$

$$Q_5 = 32986.656 \text{ kJ}$$

Calor Aprovechado:

$$Q_A = Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4 + Q_5$$

$$Q_A = 49028.74 \text{ KJ}$$

Calor Pérdido:

$$Q_s - Q_A = Q_p$$

$$Q_p = 491400 - 49028.74$$

$$Q_p = 442371,26 \text{ KJ.}$$

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

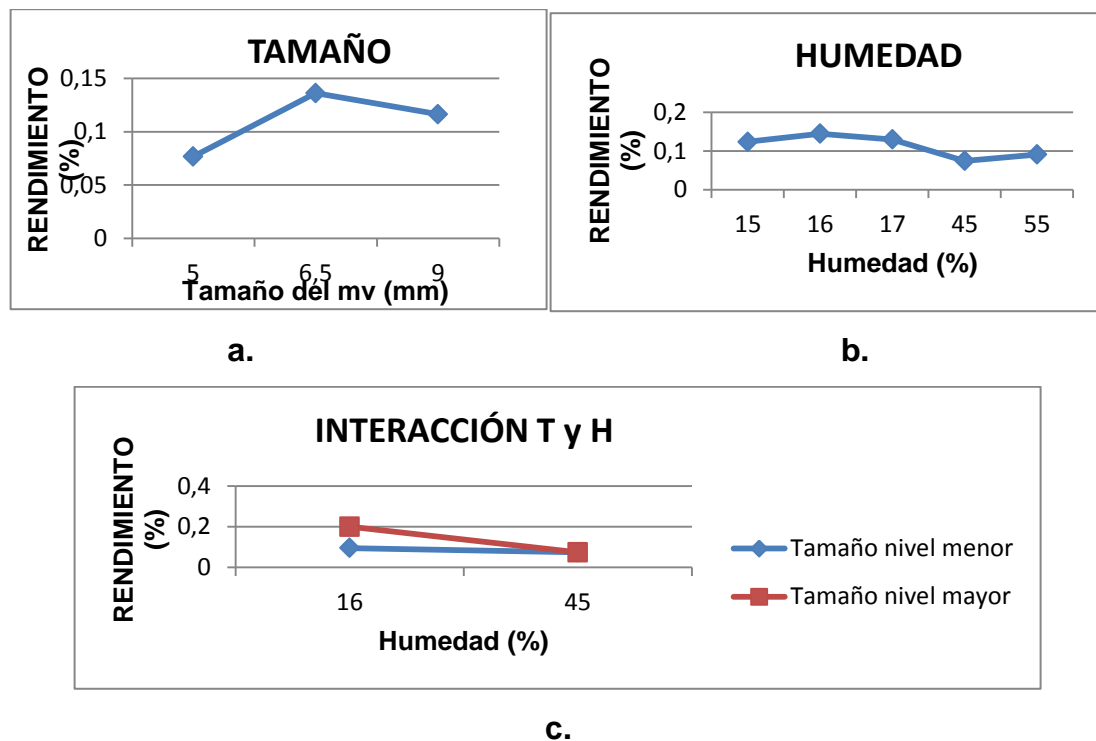
4.1 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*.

Las destilaciones correspondientes a los experimentos propuestos, se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 2.5. En las **Tablas 4 y 5** se presentan el rendimiento y las cantidades de limoneno y carvona, en los aceites esenciales de cada uno de los experimentos, (**ver Anexo 5**).

En las **Tablas 10, 11, y 12** del **Anexo 8**, se pueden ver los modelos matemáticos que se elaboraron empleando los datos obtenidos. Tomando como criterio de aceptación el valor del R^2 ajustado se determinó que no hubo una relación lineal entre las variables dependientes e independientes ya que no se obtuvieron valores cercanos a 1.

4.1.1 Rendimiento de los aceites esenciales. En la **Tabla 6** del **Anexo 6** correspondiente al análisis de varianza, ANOVA, se identificó que las variables, tamaño del material vegetal, porcentaje de humedad y la interacción entre ellas, tienen una influencia significativa sobre la respuesta, rendimiento del aceite esencial. A continuación se muestran las gráficas de las variables que tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento.

Figura 6. Graficas del rendimiento de AE en función de los efectos de: **a.** T y **b.** H, y de **c.** la interacción TH.



En **La Figura 6** se muestra el comportamiento del rendimiento como una función del tamaño del material vegetal, la humedad y de la interacción entre dichas variables, estas graficas se construyeron con base en los promedios de las respuestas cuando las variables o interacciones entre ellas se encontraban en determinado nivel, por ejemplo, para obtener el rendimiento promedio cuando el tamaño se encontraba en el nivel 5mm, se promediaron los experimentos número 2, 4, 10, 12, 15, (**ver Anexo 5**). Dichas figuras por lo tanto nos ayudan a observar más fácilmente el nivel de una variable en el cual el rendimiento es mayor suponiendo las demás variables constantes. **La Figura 6a.**, indica que cuando el material vegetal tuvo como tamaño 6.5 mm, se obtuvo un mayor rendimiento de AE, lo cual, se atribuye a que cuando se realizó el picado y se seleccionó 5 mm, las cuchillas de la picadora giraban a mayor velocidad produciendo un

calentamiento excesivo en el material vegetal aumentando la volatilización [20]. Para el tamaño de 9 mm hubo una disminución del rendimiento, debido a que a mayor tamaño del material vegetal hay menor área superficial para la transferencia de masa desde la matriz vegetal hacia la fase de vapor [1, 21]. Por otra parte, la **Figura 6b.**, indica que se obtuvo más aceite esencial cuando el material vegetal tenía menos humedad debido principalmente a que se pudo cargar más cantidad de material vegetal que agua en el destilador.

En **La Figura 6c.**, se muestra que cuando se compara el factor tamaño del material vegetal en el nivel menor con el nivel mayor a una humedad del 16%, el rendimiento de aceite esencial aumenta, pero cuando la humedad es del 45%, no se observa ninguna variación en el rendimiento. El rendimiento disminuye cuando el porcentaje de humedad aumenta en los dos niveles de tamaño del material vegetal haciéndose más notorio cuando el tamaño del material vegetal es de 9 mm.

Al verificar el experimento en el cual el tamaño del material vegetal fue de 6,5 mm y la humedad fue de 16% se obtuvo una respuesta del 0,13% que fue uno de los 10 experimentos con mayor rendimiento de aceite esencial. Adicionalmente si observamos los experimentos con tamaño del material vegetal 6,5 mm y humedad del 17%, que corresponden a los niveles centrales de las variables, estos fueron los que presentaron mayor rendimiento, (**ver Anexo 5**).

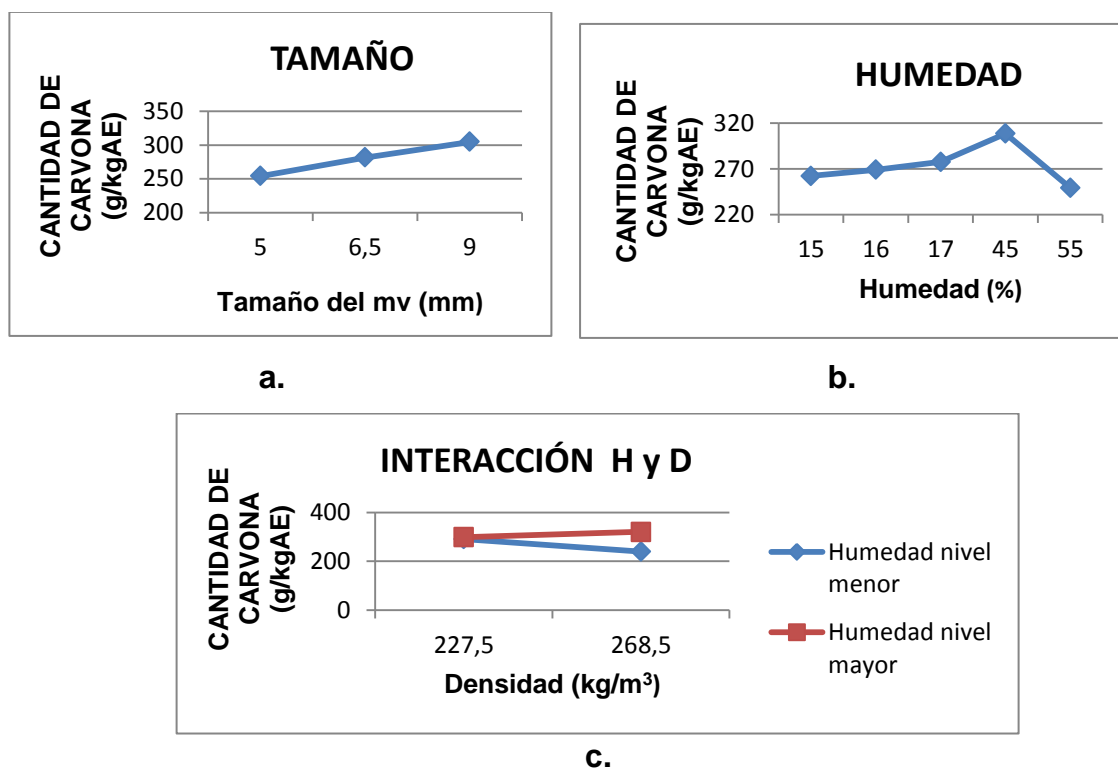
4.1.2 Identificación y cuantificación. Los componentes mayoritarios separados e identificados por GC-MS, se registran en la **Tabla 9** del **Anexo 7** según el orden de elución en la columna DB-5MS (f. e. apolar), con sus índices de retención y cantidades relativas, %, para tres experimentos seleccionados al azar de los veintitrés realizados. Se identificaron 20 compuestos con base en la comparación de los índices de retención y espectros de masas (EI, 70 eV) experimentales con

los disponibles en la literatura científica [20]. La cuantificación se realizó empleando la técnica de estándar externo.

4.1.3 composición de los aceites esenciales. El limoneno y la carvona fueron los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de *Lippia alba* obtenido por hidrodestilación a escala piloto.

4.1.3.1 Componente Carvona. En la **Tabla 7** del **Anexo 6** se muestra la tabla del análisis de varianza, ANOVA, en donde se pueden observar las variables que afectan la cantidad de carvona en el aceite esencial. En la **Figura 7** se observan las gráficas de las variables que tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta cantidad de carvona.

Figura 7. Graficas de la cantidad de carvona como función de: **a.** T y **b.** H y de **c.** la interacción HD.



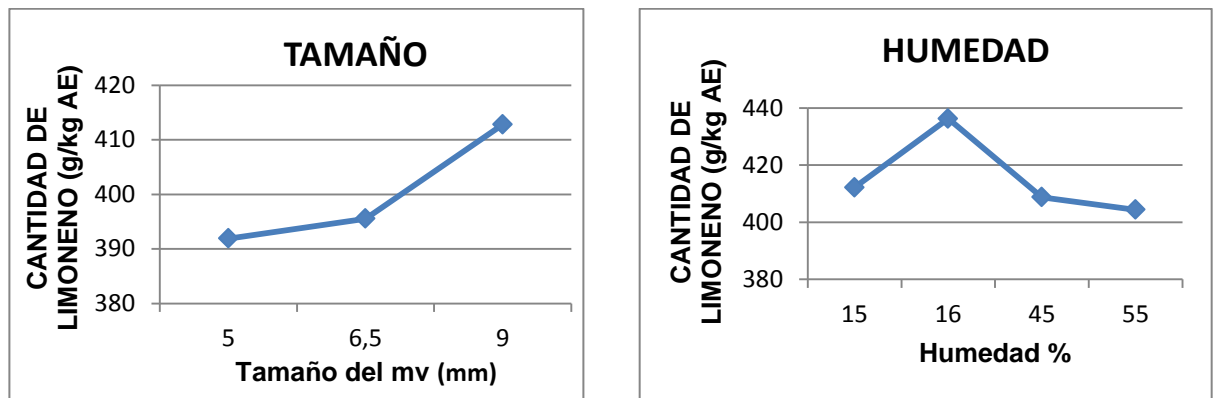
La Figura 7a., muestra que a medida que aumenta el tamaño del material vegetal, aumenta el contenido de carvona en el aceite esencial, posiblemente debido a que a 9 mm no se presentó una volatilización de este componente tan marcadamente como a 6.5 mm y 5 mm en el proceso de picado y transporte del material vegetal [2]. En **La Figura 7b.**, la composición de carvona es mayor cuando el material vegetal tiene un 45% de humedad que corresponde a 2 días de secado, se puede ver que la cantidad de carvona aumenta levemente al aumentar la humedad desde 15% al 45%, esto se puede deber a que en el tiempo de secado no solo se evaporó el agua sino que también se volatilizaron algunos componentes volátiles entre ellos la carvona. Cuando la humedad aumentó del 45% al 55% disminuyó notablemente la cantidad de carvona debido a que posiblemente esta cantidad de agua remanente en la planta solubilizó éste componente, considerando que la carvona tiene un átomo de oxígeno en su estructura, sin embargo, una disminución tan drástica del contenido de carvona en el AE, se explique mejor por otras razones como los errores experimentales y el tratamiento pos-cosecha. [9,10].

La Figura 7c., indica que cuando la densidad era de 268.5 kg/m^3 y la humedad cambió del nivel menor al nivel mayor, la cantidad de carvona en el aceite esencial aumentó, pero cuando la densidad fue de 227.5 kg/m^3 , esta no varió con respecto al cambio del nivel de la humedad. En los experimentos con tamaño de partícula de 9 mm y humedad del 45% se obtuvieron composiciones de $335.7 \text{ gcarvona/kgAE}$ y $355.8 \text{ gcarvona/kgAE}$, estando estos valores entre los ocho más altos que se obtuvieron (**ver Anexo 7**).

4.1.3.2 Componente Limoneno. El análisis de varianza ANOVA considerando como respuesta la cantidad de limoneno se muestra en la **Tabla 8** del **Anexo 6**. Este señala que todas las variables estudiadas y sus interacciones ejercen un efecto significativo sobre la cantidad de limoneno. La **Figura 8** muestra la

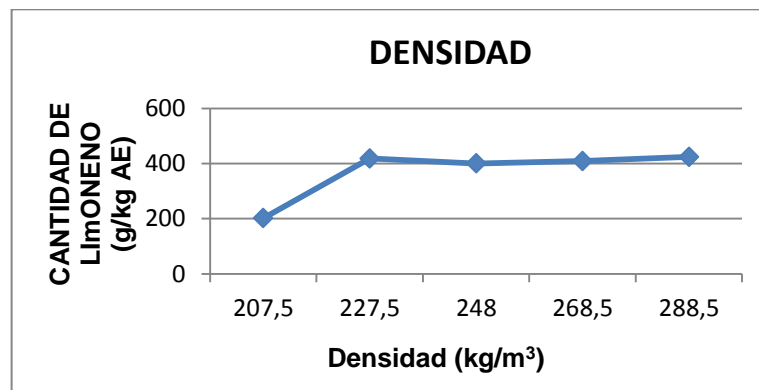
variación de la cantidad de limoneno con respecto a cada una de las variables, tamaño del material vegetal, la humedad y densidad. La **Figura 8a.**, indica que la cantidad de limoneno en el aceite esencial aumenta a medida que aumenta el tamaño del material vegetal, presentándose un aumento más marcado entre 6.5 mm y 9 mm, esto pudo ser debido a que hubo menor volatilización y degradación térmica de este componente, que a un tamaño de 5 mm a causa del proceso de picado y del secado del material vegetal [2,15].

Figura 8. Grafica para los efectos T, H y D del componente Limoneno



a.

b.

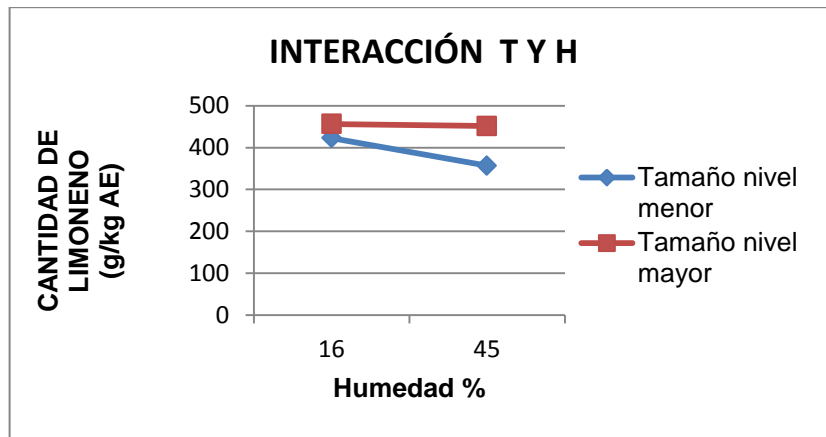


c.

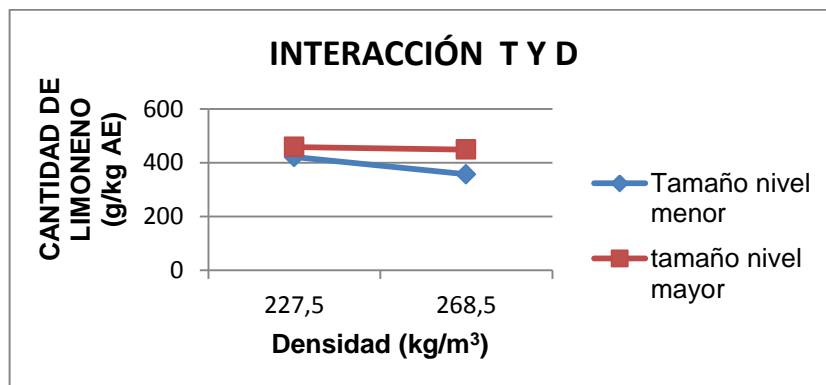
La **Figura 8b**, muestra que entre la humedad del 15% y el 16% hay un aumento en la cantidad de limoneno, esto puede ser causado por la baja volatilización de este componente durante este intervalo de tiempo en el tratamiento post-cosecha [10]. Entre el 16% y el 55% de humedad hay una notable disminución de la cantidad de limoneno posiblemente por la cantidad de agua presente en el material vegetal ya que cuando la humedad es mayor en las hojas y tallos se necesita un poco más tiempo para llegar a la destilación de los terpenos volátiles acortando el tiempo efectivo de aislamiento de éstos desde la matriz vegetal, teniendo en cuenta que el tiempo se empezó a medir desde que se encendió el quemador hasta completar 180 min. En la **Figura 8c.**, se observa un aumento drástico de la cantidad de limoneno en el aceite esencial entre los dos niveles más bajos de la variable densidad de carga. Esto pudo ser debido a que hubo mayor volatilización durante la destilación, porque el material vegetal no estaba tan comprimido, sin embargo a partir de la densidad de 227.5 kg/m^3 la cantidad de limoneno se mantiene casi constante a medida que aumenta la densidad de carga.

En la **Figura 9** se muestran las gráficas de las interacciones entre las variables estudiadas.

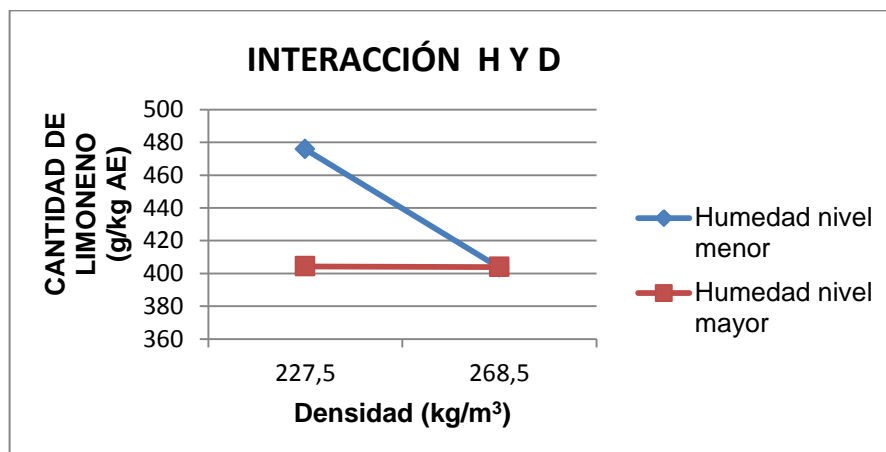
Figura 9. Graficas de la cantidad de limoneno en función de las interacciones de: a. TH, b. TD y c. HD.



a.



b.



c.

Las **Figuras 9a. y 9b.**, indican que se obtiene una mayor cantidad del componente limoneno cuando la variable tamaño del material vegetal pasa de 5 mm a 9 mm estando en su nivel mayor el porcentaje de humedad (45%) y la densidad de carga (268.5 kg/m^3), sin embargo no hay una variación significativa en la cantidad de limoneno cuando el porcentaje de humedad y la densidad de carga están en el nivel menor y el tamaño del material vegetal cambia del nivel menor al mayor.

En la **Figura 9c.**, se observa que al comparar el nivel mayor con el nivel menor del porcentaje de humedad a una densidad de carga de 227.5 kg/m^3 el contenido de limoneno aumenta, pero cuando la densidad de carga es de 268.5 kg/m^3 no hay variación en la cantidad de limoneno. La cantidad de limoneno disminuye al aumentar la densidad de carga cuando la humedad es del 16%. La interacción de estas dos variables no es tan obvia como en los dos casos anteriores aunque sus efectos son más notorios, pero se pudo notar que cuando el material vegetal estaba más seco fue más difícil que la densidad de carga en el destilador permaneciera constante.

Se utilizó un tamaño del material vegetal de 9 mm, una humedad del 16% y una densidad de carga de 227.5 kg/m^3 , en los experimentos en los que se obtuvo la mayor cantidad de limoneno lo cual se puede ver en la **Tabla 5** del **Anexo 5**.

4.2 BALANCE DE MASA Y ENERGÍA

4.2.1 Balance de masa. Con base en la comparación del valor máximo de rendimiento (0.56%) del aceite esencial de *Lippia alba* obtenido por hidrodestilación empleando un destilador semi-industrial de cobre con sistema de calentamiento a gas, disponible en la literatura científica [11], con el valor máximo de rendimiento correspondiente al experimento número 9 obtenido por hidrodestilación en un destilador a escala piloto (0.266%), el balance de masa

indica que alrededor del (52.5%) del aceite esencial se pierde, esto puede deberse a un mal funcionamiento del condensador, o también a que la presión del vapor generado no supero la presión atmosférica y los volátiles no pasaron al condensador quedando en las paredes del destilador o en el material vegetal.

4.2.2 Balance de energía. El balance de energía muestra que el valor del calor aprovechado es muy pequeño en comparación al valor del calor suministrado, por lo tanto la pérdida de calor es muy alta, alrededor del 90% ya que el equipo no cuenta con sistema de aislamiento el cual permita un mejor aprovechamiento de la energía.

CONCLUSIONES

- Los valores máximos de rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba* se obtuvieron cuando las variables tamaño y humedad del material vegetal se encontraban en sus niveles medios 6,5 mm y 17% respectivamente, estas variables tuvieron un efecto estadísticamente significativo según el análisis de varianza ANOVA.
- El limoneno fue el componente que se obtuvo en mayor cantidad (492 g_{limoneno}/kg de aceite), utilizando un tamaño del material vegetal de 9 mm, una humedad del 16%, una densidad de carga de 227,5 kg/m³ y un tiempo de destilación de 3h el cual se mantuvo constante en todas las destilaciones.
- Según el análisis de varianza ANOVA se determinó que las variables tamaño y humedad del material vegetal afectaron la cantidad de carvona en el aceite esencial, obteniéndose mayores cantidades de este componente empleando un tamaño de partícula de 9 mm y una humedad del 45%.
- La variable densidad de la carga no tuvo un efecto significativo en las respuestas rendimiento (%) y composición de carvona, además se obtuvo mayor cantidad de limoneno cuando se empleó el segundo nivel más bajo permitiendo que se realicen destilaciones sin que sea necesario comprimir demasiado el material vegetal, lo cual disminuye el tiempo de destilación.
- En el balance de masa se encontró que hay una gran pérdida de aceite esencial, ya que este queda atrapado en el material vegetal, esto se atribuye a que el flujo de vapor producido por la evaporación del agua empleada para el proceso de hidrodestilación no tiene la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho.

- La pérdida de calor calculada con el balance de energía se debe a que no hay un aislamiento térmico en la zona en donde se encuentra ubicado el quemador de gas dejando que la mayoría del calor se transfiera al medio ambiente.

RECOMENDACIONES

- Para obtener mayores rendimientos de aceite esencial de *Lippia alba*, empleando hidrodestilación a escala piloto se recomienda un tamaño de partícula de (6,5 mm), una humedad del material vegetal del (17%).
- Con el fin de garantizar que la densidad permanezca constante durante el tiempo de la destilación se sugiere un sistema que fije la rejilla ubicada en el fondo del destilador. También se debe colocar una rejilla en la parte superior para que no permita el paso del material vegetal hacia el condensador.
- Para minimizar Las pérdidas de energía por la transferencia de calor desde el hidrodestilador hacia el ambiente y para proteger al personal que se encuentra trabajando en la zona de destilación, se recomienda instalar un sistema de aislamiento que cubra la parte en donde se encuentra ubicado el quemador de gas.
- Además de realizar modificaciones al equipo de hidrodestilación para disminuir el consumo energético del proceso, se deben hacer modificaciones para optimizar la obtención de los aceites esenciales y tener un mayor control de los fenómenos físicos que acontecen en el interior del equipo, permitiendo formular modelos matemáticos de esos fenómenos y determinar el efecto de las variables de operación en el rendimiento y la calidad del aceite esencial de una manera más eficaz, dimensionar equipos a escala superior y simular el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, R. P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois: 2004, p.p. 469.
2. ARIAS, G. P. Biotransformación del limoneno por medio de la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*. Tesis de grado (Química). Universidad Industrial de Santander, 2008.
3. BANDONI Arnoldo ed. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de ediciones Universitarias, 2000, p.p. 29, 47- 49, 94, 154-163, 207.
4. Carlson R. *Desing and optimization in organic synthesis*. Elsevier: The Netherlands 1992.
5. CERPA CHÁVEZ, M. G. Hidrodestilación de aceites esenciales. Universidad de Valladolid. Ingeniería Química. Tesis (Posgrado). 2007.
6. COSTA, L. J., CERVERA, M. S., Curso de Ingeniería Química, Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte. 1991, p.p. 178.
7. Disponible en Internet: <http://aromaticas.tripod.com/Plantas.html>. Recolección, secado conservación de las plantas medicinales. Fecha de consulta 7 de agosto del 2010.

8. Disponible en Internet: www.humboldt.org.co/biocomercio. Estudio del mercado nacional de aceites esenciales. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2010.
9. DURÁN, D.C. Estudio del aceite esencial de (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Tesis de grado (Química). Universidad Industrial de Santander, 2005, p.p. 52.
10. GARCÍA, H.B. Flora medicinal de Colombia. Tomo II. Botánica médica, 2ª Ed., Tercer Mundo Editores, Bogotá, 1992, p.p. 500-510.
11. GOMÉZ, G. A. Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta. Tesis de grado (Química). Universidad Industrial de Santander, 2007, p.p. 79-80.
12. GUPTA, M.P., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. CYTED- SECAB: Bogotá, 1995. p.p. 554-559.
13. HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H., and BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works; Chem. Biodiver., 2006, 3, p.p. 1116-1125.
14. Mc Cabe, SMITH, W. J. Operaciones unitarias en ingeniería química, Cuarta Edición, Mc Graw-Hill, p.p 10-14.
15. MONSALVE, L. A. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) N.E Brown, provenientes de

- diferentes regiones de Colombia. Tesis de grado (Química). Universidad Industrial de Santander, 2007, p.p. 49,54.
16. Montgomery D. & Runger G. (2000). Probabilidad y Estadística, Segunda Edición, Mc Graw Hill. Interamericana Editores, México, p.p 895.
 17. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology; a review. *J. Ethnopharm.*, 2001, 76, p.p. 201-214.
 18. POURMORTAZAVI, S. M., HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J.Chromatogr. A* 2007,1163p.p. 2-24.
 19. RUIZ, C.A. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de grado (Química). Universidad Industrial de Santander, 2008, p.p. 11, 19-22.
 20. SIEBEL, J. Specific heat of various products. 1982, p.p. 256-257.
 21. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.;COMBARIZA, Y.; FUENTES, H.; MARTÍNEZ, J.R. HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, p.p. 343-349.

ANEXOS

Anexo A. Análisis Cienciométrico

El objetivo principal de la cienciometría es medir y analizar la ciencia mediante su estudio cuantitativo, utilizando la vigilancia tecnológica para conocer el estado actual del campo científico.

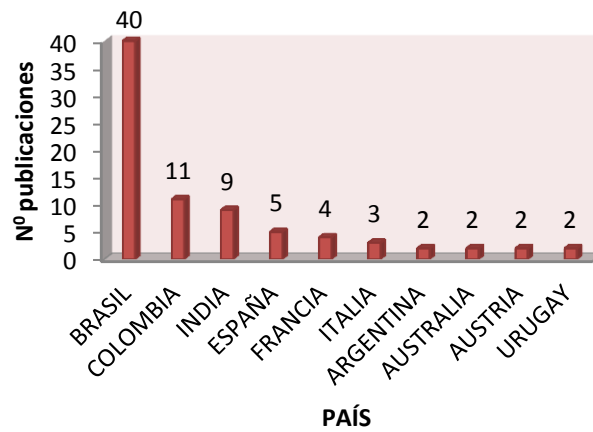
La vigilancia tecnológica como proceso sistemático de permanente búsqueda, captación, recolección, análisis y difusión de información, busca identificar oportunamente los riesgos, dificultades, tendencias o cambios que puedan afectar la toma de decisiones. Para la organización de la información, la vigilancia tecnológica emplea herramientas como tesis doctorales, proyectos de investigación y desarrollo, patentes, bases de datos, buscadores de internet entre otras fuentes.

Se realizó un estudio cienciométrico utilizando como palabras clave *Lippia alba*, teniendo en cuenta la relación entre el país y el número de publicaciones realizadas. Para este estudio se emplearon las publicaciones encontradas en la base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)* consultada desde el año 2001 hasta el 26 de agosto de 2010.

Base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*

Relación país - número de publicaciones: La **Figura 10** presenta la relación entre los países y el número de publicaciones realizadas de la especie *Lippia alba*, desde el año 2000 hasta la actualidad. Brasil, el país con el mayor número de publicaciones, 40 en total, esto muestra su gran interés en la investigación sobre *Lippia alba*, debido, posiblemente, al enfoque comercial que dedica este país a la explotación de sus recursos naturales, seguido por países como Colombia, India y España, con una muy amplia diferencia en el número de publicaciones.

Relación entre los países y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.



Fuente: **(ISI Web of Knowledge, Thomson)**. Periodo de observación: desde el año 2001 hasta el 2010. Fecha de consulta: 26 de agosto de 2010. Ecuación de búsqueda: TS = (*Lippia alba*) DocType=All document types; Language=All languages; Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI; Timespan=2001-2010.

Anexo B. Tratamiento del material vegetal antes de la destilación



- A. Plantación del material vegetal.
- B. Traslado del material vegetal desde el municipio del Socorro (Santander) a las instalaciones del CENIVAM.
- C. Picado del material vegetal.
- D. Secado del material vegetal.

Anexo C. Secado del material vegetal

El proceso de secado de las plantas aromáticas representa una de las mejores alternativas de estabilización y conservación del material vegetal.

Los principales objetivos del secado son:

- Inhibir la destrucción enzimática, fenómeno que puede alterar sustancialmente la calidad del material vegetal por descomposición de sus componentes. El secado inhibe el proceso enzimático pero no lo elimina; por lo tanto, al rehidratarse la planta, el proceso puede restablecerse.
- Estabilizar las características físicas como el olor, color, textura, sabor y/o la composición química ya que la planta puede presentar amarronamiento de las partes verdes, provocado por la destrucción de la clorofila y numerosas reacciones de oxidación generadas por las fenol-oxidasas presentes en las plantas, [16,17].

Para conservar las plantas, es indispensable reducir la actividad enzimática en ellas, y para ello, se reduce el contenido acuoso hasta valores que corresponden a una humedad entre 5 y 14%, según cada caso. Normalmente, las plantas en la cosecha presentan humedades superiores al 70% por lo que es necesario encontrar medios eficientes de secado, que no perjudiquen la calidad del material vegetal, ni reduzcan el contenido de componentes volátiles presentes en el mismo [16,17].

Anexo D. Balance de masa

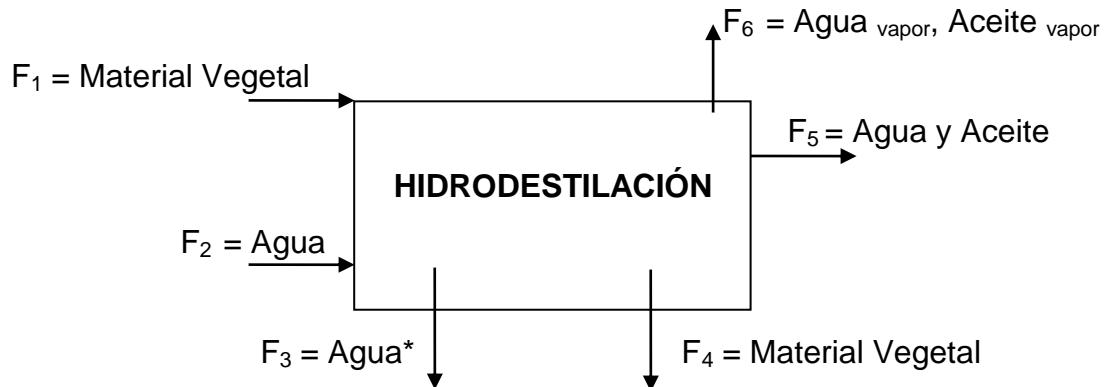
Para realizar el balance de masa se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

1. Se tomó como aceite esencial inicial presente en el material vegetal el valor máximo obtenido por hidrodestilación empleando un equipo semi-industrial que opera a las mismas condiciones que el equipo a escala piloto [11].
2. Para calcular el aceite esencial que no se volatilizó durante la hidrodestilación a escala piloto se hidrodestiló de nuevo utilizando el método de hidrodestilación asistida por la radiación del microondas (MWHD) ya que por este método se obtienen mayores rendimientos y es más rápido [17].
3. Se realizó una prueba de secado al material vegetal remanente durante 24 h a 105°C para determinar la cantidad de agua que gana durante la hidrodestilación.

Flujos correspondientes al balance de masa.

	Nombre de los flujos	Corriente	Componentes de la corriente
Entradas	F1	Material vegetal	Aceite esencial, agua, material vegetal
	F2	Agua	Agua
Salidas	F3	Agua*	Agua, aceite esencial(despreciable)
	F4	Material vegetal*	Agua, aceite esencial, material vegetal
	F5	Agua y aceite	Agua, aceite esencial
	F6	Agua y aceite	Agua _{vapor} , aceite esencial _{vapor}

Variables de entrada y salida.



Datos correspondientes al experimento número en el que se obtuvo mayor rendimiento del aceite esencial.

Flujo	Cantidad	Corriente
F1	$M_1 = 10 \text{ kg}$	Material vegetal (17% humedad)
F2	$M_2 = 50 \text{ kg}$	Agua
F3	$M_3 = 31,5 \text{ kg}$	Agua*
F4	$M_4 = 0,0227 \text{ kg}$	Aceite esencial
	$8,244 \text{ kg}$	Material vegetal seco
F5	$M_4 = 5,6 \text{ kg}$	Agua
	$M_5 = 0,0266 \text{ kg}$	Aceite esencial
F6	$M_5 = 14 \text{ kg}$	Agua
	$M_6 = 0.0067 \text{ kg}$	Aceite esencial vapor
	$M_6 = 0,6 \text{ kg}$	Agua vapor

Anexo E. Rendimientos y cantidades de carvona y limoneno en los AE obtenidos en cada uno de los experimentos realizados

Matriz de experimentos para la variable de respuesta Rendimiento.

N° de Experimento	Tamaño de partícula (mm)	Densidad de carga (kg/m ³)	Humedad (%)	Rendimiento
1	9	227,5	16	0,2119
2	5	227,5	16	0,0891
3	6,5	248	17	0,0826
4	5	227,5	45	0,0488
5	9	268,5	16	0,1867
6	6,5	288,5	17	0,0812
7	6,5	248	17	0,2145
8	6,5	248	15	0,1236
9	6,5	248	17	0,266
10	5	248	17	0,0467
11	6,5	248	55	0,0908
12	5	268,5	45	0,0987
13	6,5	207,5	17	0,095
14	6,5	248	17	0,1771
15	5	268,5	16	0,1005
16	9	227,5	45	0,0589
17	9	268,5	45	0,0883
18	6,5	248	17	0,2048
19	9	248	17	0,0361
20	6,5	248	17	0,1598
21	6,5	248	16	0,1344
22	6,5	248	17	0,063
23	6,5	248	45	0,078

- Experimentos empleados para obtener el rendimiento promedio.
- Experimento con tamaño de partícula (6,5 mm) y humedad del (16%) perteneciente a los 10 experimentos con mayor rendimiento de aceite esencial.
- Experimentos en los que se obtuvo mayor rendimiento con tamaño de partícula 6,5 mm y humedad del 17%.

Matriz de experimentos para las variables respuesta cantidad de carvona y limoneno en los AE.

N° de experimento	Tamaño de partícula (mm)	Densidad de carga (kg/m ³)	Humedad (%)	Carvona (g/kgAE)	Limoneno (g/kgAE)
1	9	227,5	16	355,411	491,722
2	5	227,5	16	226,461	459,999
3	6,5	248	17	251,395	395,619
4	5	227,5	45	262,779	382,752
5	9	268,5	16	273,925	412,627
6	6,5	288,5	17	234,824	424,017
7	6,5	248	17	293,482	418,242
8	6,5	248	15	262,135	412,187
9	6,5	248	17	306,509	470,564
10	5	248	17	289,602	400,437
11	6,5	248	55	249,252	404,383
12	5	268,5	45	286,039	330,895
13	6,5	207,5	17	144,679	202,083
14	6,5	248	17	336,834	374,408
15	5	268,5	16	205,669	385,450
16	9	227,5	45	335,664	425,870
17	9	268,5	45	355,854	477,007
18	6,5	248	17	388,208	411,434
19	9	248	17	202,807	256,618
20	6,5	248	17	315,542	331,231
21	6,5	248	16	283,601	431,669
22	6,5	248	17	290,109	438,976
23	6,5	248	45	301,913	427,294

■ Experimentos en los que se obtuvo mayor cantidad de carvona con tamaño de partícula 9 mm y humedad del 45%.

■ Experimentos en los que se obtuvo mayor cantidad de limoneno con tamaño de partícula 9 mm, humedad de 16% y densidad de 227,5 g/kgAE.

**Anexo F. Tablas del análisis de varianza, ANOVA, para las respuestas
rendimiento, cantidad de carvona y cantidad de limoneno**

Análisis de varianza para el rendimiento del AE.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	f₀	F
T	0,0054445	1	0,0054445	47,34039	10,12796
D	0,0005363	1	0,0005363	4,663034	
H	0,0107678	1	0,0107678	93,62744	
TD	0,0004076	1	0,0004076	3,543708	
TH	0,0054758	1	0,0054758	47,61298	
DH	0,0010835	1	0,0010835	9,420758	
TDH	3,24E-05	1	3,24E-05	0,281734	
Error	0,000345	3	0,000115		
Total		11			

Análisis de varianza para la cantidad de carvona en el AE.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	f₀	F
T	14441,976	1	14441,976	88,733	7,70864
D	432,598	1	432,598	2,658	
H	3999,326	1	3999,326	24,572	
TD	508,250	1	508,250	3,123	
TH	371,349	1	371,349	2,282	
DH	2654,617	1	2654,617	16,310	
TDH	415,073	1	415,073	2,550	
Error	651,029	4	162,757		
Total		11			

Al igual que en el rendimiento los efectos tamaño de partícula y porcentaje de humedad fueron las variables que afectaron significativamente la cantidad de carvona.

Análisis de varianza para la cantidad de Limoneno en el AE.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	f₀	F
T	7696,129	1	7696,129	96,02499	7,708647
D	2978,552	1	2978,552	37,16355	
H	2220,248	1	2220,248	27,70215	
TD	1211,522	1	1211,522	15,11622	
TH	2123,194	1	2123,194	26,4912	
DH	2923,213	1	2923,213	36,47308	
TDH	1445,642	1	1445,642	18,03735	
Error	320,5886	4	80,14715		
Total		11			

Anexo G. Identificación de los componentes del aceite esencial de *Lippia alba*

Tabla 9. Principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba* con sus cantidades relativas (%).

N ^o pico	IK DB-5	Compuesto	Cantidad Relativa %		
			Exp 9	Exp 12	Exp 19
1	1035	Limoneno	30,2	28,6	28,7
2	1047	<i>trans</i> - α -Ocimeno	0,4	0,7	0,5
3	1100	Linalol	0,5	0,2	0,3
4	1179	Borneol	0,5	0,4	0,7
5	1203	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	7	5,1	1
6	1211	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	10,5	8,9	1,4
7	1223	<i>iso</i> -Dihidrocarveol	1,8	1,1	0,9
8	1238	<i>neo-iso</i> -Dihidrocarveol	3,1	3,3	1,7
9	1253	Carvona	23,8	29	24,2
10	1261	Piperitona	1,9	1,5	1,1
11	1346	Piperitenona	2,5	2,5	1,2
12	1395	α -Bourboneno	1,7	2,3	4
13	1397	α -Elemeno	0,8	0,8	1,4
14	1431	α -Ilangeno	0,3	0,4	0,6
15	1443	α -Copaeno	0,4	0,5	0,5
16	1455	<i>trans</i> - α -Farneseno	0,8	0,7	1,4
17	1474	α -Gurjuneno	α - α -	0,8	1,5
18	1482	Germacreno-D	0,3	0,5	0,3
19	1485	α -Muuroleno	0,6	0,8	0,5
20	1495	Biciclosesquifelandreno	11,3	11,1	19,5

Se identificaron 20 metabolitos secundarios volátiles en el aceite esencial de *Lippia alba*, donde los principales componentes fueron: el limoneno (28-30%), la carvona (23-29%) y el biciclosesquifelandreno (11-19%).

Anexo H. Tablas de los modelos elaborados para cada variable de respuesta

Modelos para la respuesta Rendimiento.

N°	Modelo	R ² Ajustado	Falta de ajuste	Error
1	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TH + \beta_5 H^2 + \beta_6 HD$	0,05347	0,05318	0,06111
2	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TH + \beta_5 H^2 + \beta_6 D^2$	0,08037	0,05144	0,05937
3	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TH + \beta_5 H^2$	0,06947	0,05590	0,06383
4	$Y = \beta_0 + \beta_1 H + \beta_2 TH + \beta_3 H^2 + \beta_4 HD$	0,05072	0,06102	0,06895
5	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 TH + \beta_4 H^2$	0,03992	0,06180	0,06974
6	$Y = \beta_0 + \beta_1 H + \beta_2 TH + \beta_3 H^2$	0,06518	0,06374	0,07167
7	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 TH$	0,07814	0,06274	0,07068

Modelos para la respuesta Cantidad de carvona.

N°	Modelo	R ² Ajustado	Falta de ajuste	Error
1	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TH + \beta_6 TD + \beta_7 H^2 + \beta_8 HD + \beta_9 D^2$	0,09199803	22294,05	37269,73
2	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 H^2 + \beta_6 HD + \beta_7 D^2$	0,17223857	39203,29	39203,29
3	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TH + \beta_6 H^2 + \beta_7 HD + \beta_8 D^2$	0,13269779	23363,89	38337,57
4	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 H^2 + \beta_6 D^2$	0,21949504	24455,86	39429,54

Modelos para la respuesta Cantidad de limoneno.

N°	Modelo	R ² Ajustado	Falta de ajuste	Error
1	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TH + \beta_6 TD + \beta_7 H^2 + \beta_8 HD + \beta_9 D^2$	-0,43103	376544,55	383918,08
2	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TD + \beta_6 H^2 + \beta_7 D^2$	-0,18822	369606,35	376979,88
3	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TD + \beta_6 H^2 + \beta_7 HD + \beta_8 D^2$	-0,32834	373386,85	380760,39
4	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 D + \beta_3 T^2 + \beta_4 TD + \beta_5 HD + \beta_6 D^2$	-0,16355	373433,60	380807,13
5	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TH + \beta_5 H^2 + \beta_6 HD$	-0,35339	390786,35	398159,89
6	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TD + \beta_5 H^2 + \beta_6 D^2$	-0,01501	364623,27	371996,80
7	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 T^2 + \beta_4 TD + \beta_5 H^2 + \beta_8 HD + \beta_9 D^2$	-0,24824	372940,63	380314,17
8	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 TH + \beta_6 TD$	-0,29750	383341,10	390714,64
9	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 T^2 + \beta_5 H^2 + \beta_6 D^2$	-0,10807	369235,10	376608,64
10	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 H + \beta_3 D + \beta_4 TH + \beta_5 TD + \beta_6 HD$	-0,31487	386567,67	393941,21
11	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 D + \beta_3 T^2 + \beta_6 TD + \beta_9 D^2$	-0,04955	369653,09	377026,63
12	$Y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 T^2 + \beta_3 TH + \beta_4 TD$	-0,16397	380098,69	387472,23