



# Universidad **Mariana**

Aprovechamiento integral de los residuos generados del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) mediante un proceso de extracción secuencial para la obtención de aceite esencial, polifenoles, flavonoides y etanol

Juan Esteban Carmona Rivas  
Alejandra Sthefania Cerón Rosero

Universidad Mariana  
Facultad de Ingeniería  
Ingeniería de Procesos  
San Juan de Pasto  
2023

Aprovechamiento integral de los residuos generados del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) mediante un proceso de extracción secuencial para la obtención de aceite esencial, polifenoles, flavonoides y etanol

Juan Esteban Carmona Rivas  
Alejandra Sthefania Cerón Rosero

Informe de investigación para optar al título de: Ingeniero de Procesos

MSc. Simón Alexander Puerchambud Chasoy  
Asesor

PhD. Vladimir Ernesto Vallejo Castillo  
Asesor externo

Universidad Mariana  
Facultad de Ingeniería  
Ingeniería de Procesos  
San Juan de Pasto

2023

Artículo 71: los conceptos, afirmaciones y opiniones emitidos en el Trabajo de Grado son responsabilidad única y exclusiva del (los) Educando (s)

Reglamento de Investigaciones y Publicaciones, 2007  
Universidad Mariana

## **Agradecimientos**

Agradecemos a Dios por otorgarnos la salud y el conocimiento que posibilitaron culminar este trabajo de grado. A nuestras familias, por su infinito apoyo, gracias por ser nuestra fuente de fortaleza.

De forma especial, queremos expresar nuestro agradecimiento al Doctor Vladimir Vallejo, quien ha sido nuestra guía constante a lo largo de todo este recorrido, su contribución fue esencial para el desarrollo exitoso de esta investigación. Valoramos su paciencia, su dedicación, su vasto conocimiento, y, sobre todo, su cariño y apoyo incondicional en cada momento. Las enseñanzas que nos brindó las llevamos grabadas en lo más profundo de nuestro corazón.

A los jurados de evaluación, el Magíster Hugo Gomajoa y la Magíster Jimena Erazo, por dedicar su tiempo y sus conocimientos en la revisión de este trabajo. Asimismo, agradecemos a los coordinadores de laboratorio Edith Santacruz y Hugo Espinosa, por su colaboración en la fase experimental de la investigación.

A todas las personas quienes estuvieron pendientes de nosotros durante este proceso, muchas gracias, al final, todo esfuerzo tiene su valiosa recompensa.

## **Dedicatoria**

A Dios, que gracias a su infinita bondad me permitió alcanzar este logro en mi vida, brindándome el conocimiento, la perseverancia y paciencia que necesito día a día.

A mis padres, Juan Carlos y Cristina, por su apoyo y confianza incommensurable durante todo el proceso de formación.

A mi tía Aida Lucia, que con su generosidad y cariño aportó de forma significativa a que haya realizado con éxito las metas que me propuse.

A mi abuelo José, que desde el cielo me brinda su apoyo y bendiciones en todo momento.

A mi familia y pareja, siendo apoyo constante en mi formación como persona.

A los docentes, que con toda su dedicación impartiendo sus conocimientos me permitieron cumplir con mis propósitos profesionales afrontando los retos que se presentaron.

A mi compañera de trabajo, Alejandra Cerón, siendo parte fundamental y apoyo incondicional durante todas las etapas de planteamiento, ejecución y finalización del trabajo de grado, demostrando sus valiosas aptitudes en el campo académico y profesional.

Especialmente al Doctor Vladimir Vallejo, que gracias a su gran conocimiento en la temática y la dedicación como asesor y docente motivó a la realización de este trabajo de grado siendo pilar fundamental para su realización.

Con gratitud y respeto,  
Juan Esteban Carmona Rivas

### **Dedicatoria**

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso.

A mis padres, Yolanda y Jesús, cuyo amor incondicional y apoyo invaluable han sido mi inspiración para alcanzar cada objetivo que me propongo.

A mis personas favoritas, mis hermanas, Valeria y Sofia, las amo con todo mi corazón, gracias por su presencia constante en mi vida, son mi motivo de alegría y aliento.

A mi compañero de trabajo, Juan Esteban, por brindarme su colaboración cuando más lo necesitaba, superando juntos los desafíos.

A mi estimado Doctor, Vlacked, a quien dedico este logro con gratitud por no dejarnos solos a pesar de las adversidades.

Con profundo cariño,  
Alejandra Sthefania Cerón Rosero

## **Contenido**

Introducción .....	12
1. Resumen del proyecto .....	13
1.1. Descripción del problema .....	14
1.2. Pregunta de investigación .....	14
1.3. Justificación.....	15
1.4. Hipótesis.....	16
1.5. Objetivos .....	16
1.5.1. Objetivo general.....	17
1.5.2. Objetivos específicos .....	17
1.6. Marco referencial .....	17
1.6.1. Antecedentes .....	17
1.7. Marco teórico .....	23
1.7.1. Aceite esencial (AE) de Eucalipto .....	23
1.7.2. Polifenoles .....	23
1.7.3. Flavonoides .....	23
1.7.4. Etanol.....	24
1.7.5. Destilación por arrastre de vapor .....	24
1.7.6. Extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido.....	25
1.7.7. Base seca (dry basis).....	26
1.7.8. Base húmeda (wet basis).....	26
1.7.9. Hidrólisis térmica.....	27
1.7.10. Hidrólisis ácida.....	27
1.7.11. Fermentación alcohólica.....	28
1.8. Metodología .....	30

1.8.1. Determinar el rendimiento de aceite esencial de los residuos generados del Eucalipto (Eucalyptus spp.) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor a escala laboratorio....	31
1.8.2. Evaluar el efecto de la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido en la obtención de polifenoles y flavonoides presentes en los residuos del Eucalipto (Eucalyptus spp.) .....	33
1.8.3. Establecer el efecto de la hidrólisis ácida y la fermentación en la producción de etanol a partir de la fermentación húmeda de residuos del Eucalipto (Eucalyptus spp.) .....	38
2. Presentación de resultados .....	43
2.1. Determinar el rendimiento del aceite esencial de los residuos generados del Eucalipto (Eucalyptus spp.) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor a escala laboratorio	43
2.1.1. Contenido de humedad .....	43
2.1.2. Rendimiento del aceite esencial.....	44
2.1.3. Análisis GC-MS del aceite esencial.....	44
2.2. Evaluar el efecto de la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido en la obtención de polifenoles y flavonoides presentes en los residuos del Eucalipto (Eucalyptus spp.).....	45
2.2.1. Adecuación de los residuos.....	45
2.2.2. Cinética de extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido .....	46
2.2.3. Diseño experimental central compuesto con superficie de respuesta.....	51
2.3. Establecer el efecto de la hidrólisis ácida y la fermentación en la producción de etanol a partir de la fracción húmeda de los residuos del Eucalipto (Eucalyptus spp.) .....	59
2.3.1. Curva de calibración de glucosa .....	59
2.3.2. Pretratamiento térmico e hidrólisis ácida.....	59
2.3.3. Fermentación alcohólica .....	59
3. Conclusiones .....	62
4. Recomendaciones.....	64
Referencias Bibliográficas .....	65
Anexos.....	76

## **Índice de Tablas**

Tabla 1 Condiciones de operación para la extracción sólido – líquido asistida con ultrasonido...19	19
Tabla 2 Condiciones de operación para hidrólisis y fermentación del Eucalipto .....21	21
Tabla 3 Condiciones de operación para la cinética de extracción sólido-líquido .....34	34
Tabla 4 Diseño experimental.....36	36
Tabla 5 Contenido de humedad en las muestras .....43	43
Tabla 6 Rendimiento del AE (% mL/g m.s).....44	44
Tabla 7 Contenido de humedad de los residuos .....45	45
Tabla 8 Modelos matemáticos de superficie de respuesta para el diseño experimental .....51	51
Tabla 9 Condiciones óptimas en el modelo de superficie de respuesta .....58	58

## **Índice de Figuras**

Figura 1 Diagrama destilación por arrastre con vapor .....	25
Figura 2 Diagrama hidrólisis ácida.....	28
Figura 3 Diagrama de bloques de la presente investigación .....	30
Figura 4 Hojas de Eucalipto .....	31
Figura 5 Reducción de tamaño de las hojas de Eucalipto .....	32
Figura 6 Extractor Modular de aceites esenciales .....	33
Figura 7 Equipo extractor de ultrasonido .....	35
Figura 8 Hidrólisis térmica de residuos de Eucalipto.....	38
Figura 9 Fermentación de residuos de Eucalipto.....	39
Figura 10 Montaje para destilación simple.....	41
Figura 11 Contenido total de polifenoles a 37 kHz .....	46
Figura 12 Contenido total de flavonoides a 37 kHz .....	47
Figura 13 Contenido total de polifenoles a 80 kHz .....	48
Figura 14 Contenido total de flavonoides a 80 kHz .....	49
Figura 15 Comparación de TPC y TFC en función de las frecuencias .....	49
Figura 16 Diagrama de Pareto para la variable de respuesta TPC .....	52
Figura 17 Diagrama de efectos principales TPC .....	53
Figura 18 Superficie y contornos de respuesta estimada para TPC .....	53
Figura 19 Diagrama de Pareto para la variable de respuesta TFC .....	55
Figura 20 Diagrama de efectos principales TFC .....	55
Figura 21 Superficie y contornos de respuesta estimada para el TFC.....	56
Figura 22 Superposición de contornos .....	57
Figura 23 Consumo de azúcares durante la fermentación del hidrolizado.....	60

## **Índice de Anexos**

Anexo A. Análisis CG-MS del aceite esencial de Eucalipto.....	77
Anexo B. Curva de calibración de glucosa (g/L) .....	78

## **Introducción**

El Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) es una especie arbórea perteneciente a la familia de las mirtáceas, originaria del sudeste de Australia y Tasmania. Actualmente, esta especie se encuentra distribuida en gran parte del mundo, en Colombia crece entre los 1.000 y 2.000 m.s.n.m., representando una de las especies forestales que se encuentran a gran escala en los departamentos del Cauca, Valle del Cauca, Caldas, Risaralda, Nariño y Antioquia (R. Hernández et al., 2006). En el año 2020 el departamento de Nariño presentó un área cultivada de 27,2 ha de Eucalipto (Jaramillo y Velásquez, 2020). Según Palma et al. (2021) el 11% del total del árbol de Eucalipto corresponde al follaje que es desperdiciado, por lo tanto, se concluye que los residuos generados en el departamento son aproximadamente 4.308 ton/m<sup>3</sup>. Por esta razón, se deduce que actividad forestal del Eucalipto genera residuos de biomasa (hojas) que son acumulados en gran cantidad, estos residuos se emplean normalmente como combustible o son desechados en los rellenos sanitarios sin algún tipo de tratamiento previo.

Por otra parte, el Eucalipto se caracteriza por disponer de sustancias orgánicas volátiles, tales como fenoles, cetonas, éteres, aldehídos, entre otros compuestos (Lipa, 2014). Asimismo, los aceites esenciales comprenden una mezcla compleja de metabolitos secundarios segregados por las plantas, incluyendo los componentes bioactivos presentes en las hojas y frutos, los cuales son de alto interés en el campo investigativo y en el ámbito comercial. Por consiguiente, se pretende brindar una alternativa de aprovechamiento de los residuos generados por la actividad forestal del Eucalipto, planteando la obtención de tres coproductos a partir de las hojas del Eucalipto: aceite esencial, componentes bioactivos (polifenoles y flavonoides) y etanol, empleando las técnicas de destilación por arrastre con vapor, extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido y fermentación alcohólica a escala laboratorio, respectivamente.

## **1. Resumen del proyecto**

El Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) es una especie arbórea perteneciente a la familia de las mirtáceas que crece entre los 1.000 y 2.000 m.s.n.m. La explotación forestal del Eucalipto se centra exclusivamente en su tronco, ya que se destina a la industria papelera y maderera. En el departamento de Nariño, se han cultivado alrededor de 27,2 ha de Eucalipto, lo cual sugiere que los residuos generados por cada árbol talado equivalen a aproximadamente 4.308 ton/m<sup>3</sup> de material.

Se realizó la extracción del aceite esencial a partir de las hojas de Eucalipto recolectadas en el municipio de San Lorenzo, Nariño. Este proceso incluyó la aplicación de dos tratamientos: hojas frescas (49,651% wb) y hojas secas (5,086% wb), se evaluó la influencia del contenido de humedad en el rendimiento de extracción de aceite esencial, obteniendo un rendimiento del 0,102% para las hojas frescas y del 0,101% para las hojas secas. Posteriormente, se determinó la composición química del aceite esencial de Eucalipto empleando un análisis de Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS), se evidenciaron 20 picos, destacando los siguientes componentes principales: 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol) (14%), Ácido Octadecanoico (2,19%), 1,8-Cineol (Eucaliptol) (1,13%) y Limoneno (0,54%).

Seguidamente, se llevó a cabo la cinética de extracción de los componentes bioactivos presentes en los residuos de Eucalipto, generados durante la obtención del aceite esencial. El objetivo fue evaluar los factores frecuencia (37 kHz y 80 kHz) y tiempo máximo de extracción. Adicionalmente, se determinaron los parámetros de la cinética: temperatura de 45 °C, relación sólido-líquido de 1/60 g/mL, % v/v de etanol/agua del 50%. Para cuantificar el contenido total de polifenoles (TPC) y el contenido total de flavonoides (TFC), se emplearon las metodologías de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente. Los resultados revelaron que la frecuencia óptima para la obtención de componentes bioactivos fue de 37 kHz, con un tiempo máximo de extracción de 15 minutos para TPC, alcanzando un valor de 6.138,922 mg GAE/100 g de peso fresco (FW). Asimismo, se determinó que el tiempo óptimo para TFC fue de 45 minutos, obteniendo un valor de 4.761,656 mg CE/100 g FW.

Para realizar el proceso fermentativo, se tomaron los residuos generados en la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido, en donde se encontró que el porcentaje de etanol presente en la muestra fue de 5,4% (v/v) teniendo en cuenta la NTC 5113:2022, y un valor de Yp/s (rendimiento del producto sobre sustrato) correspondiente a 48,8%. Finalmente, se concluye que el aprovechamiento integral de los residuos de la actividad forestal del Eucalipto es del 13,74% en base seca, confirmando así la hipótesis de investigación al superar el rendimiento esperado del 10%.

### **1.1. Descripción del problema**

El beneficio comercial del Eucalipto se remite solo al tronco debido a que se utiliza en la industria papera y maderable para la fabricación de muebles y otro tipo de bienes. Por lo tanto, se aprovecha entre 78-82% de la biomasa, y el porcentaje restante, perteneciente al follaje del árbol, entre un 11-18% (Palma et al., 2021) es desperdiciado. Según R. Hernández et al. (2006) en promedio crecen 1.600 árboles de Eucalipto por ha con una densidad de 0,9 ton/m<sup>3</sup>. En Colombia se reportó que para el año 2019, 141.000 ha cultivadas correspondieron a coníferas y mirtáceas, de las cuales 60.000 fueron usadas para la producción de papel (Fernández-Agulló et al., 2015; Sarriavilla y Gallo-Corredor, 2019).

Jaramillo y Velásquez (2020) mencionan que para el año 2020 el departamento de Nariño contó con un área cultivada de 27,2 ha de Eucalipto, que representan aproximadamente 43.520 árboles, por lo tanto, los residuos generados por árbol se estiman en 4.308 ton/m<sup>3</sup>. Este material usualmente se lo emplea para compostaje y procesos de combustión provocando impactos negativos, puesto que se contribuye a la emisión de gases que afectan significativamente la contaminación atmosférica (Roig et al., 2018). Adicionalmente, se considera que el rendimiento del proceso para obtener energía a partir de estos residuos es bajo, por lo que en la mayoría de ocasiones son desechados en rellenos sanitarios sin algún tipo de tratamiento previo.

### **1.2. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el porcentaje de aprovechamiento integral de los residuos generados por la actividad forestal del Eucalipto (*Eucalyptus spp*)?

### **1.3. Justificación**

Colombia es un país altamente biodiverso reconocido por su variedad de ecosistemas, lo cual conduce a que disponga de una vegetación distintiva que se enriquece con sus especies endémicas. Debido a esto, es posible encontrar una amplia gama de plantas que contienen aceites esenciales y compuestos de alto interés, facilitando la investigación y desarrollo de nuevos productos (Torrenegra et al., 2019).

En primer lugar, el aceite esencial de Eucalipto se destaca por ser empleado para la fabricación de diferentes productos que son altamente valorados en industrias como, la alimentaria, cosmética, agrícola y farmacéutica (Amaya y Sandoval, 2020). Los polifenoles y flavonoides son relevantes tanto por su actividad antioxidante (Limam et al., 2020), como por su aporte industrial debido a sus características antimicrobianas y antitumorales. Igualmente, se utilizan como posible sustituto de los antioxidantes sintéticos usados comúnmente como el hidroxitolueno butilado (Mota et al., 2012). Por último, el etanol que es un compuesto con propiedades físicas y químicas ampliamente reconocidas en diversas áreas industriales. Entre sus aplicaciones se encuentran su uso como disolvente en la producción de medicamentos, cosméticos, perfumes, productos de limpieza, entre otros.

Para la obtención del aceite esencial se encuentran diversos métodos que pueden ser empleados, incluyendo la destilación por arrastre de vapor, hidrodestilación, destilación previa maceración, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos (EFS) y extracción asistida con microondas (Natividad, 2019). En este estudio, se empleó la destilación por arrastre con vapor ya que, según Cedeño et al. (2019) esta técnica proporciona un mayor rendimiento y una mayor pureza del aceite esencial en comparación con otros métodos. Seguidamente, se efectuó el método de extracción sólido-líquido asistido con ultrasonido para obtener los componentes bioactivos del Eucalipto. De acuerdo con Palma et al. (2021), este proceso presenta diversas ventajas técnicas,

tales como una mayor eficiencia y rendimiento en la extracción, mayor pureza de los compuestos obtenidos, y la utilización de solventes no contaminantes para el medio ambiente.

Según Loaiza et al. (2020), el aprovechamiento integral tiene como objetivo extraer el máximo beneficio de los recursos para producir menos residuos y contaminación. Es por ello que el aprovechamiento de los residuos provenientes de su actividad forestal permite su valorización al brindar un proceso para la extracción de tres coproductos con alto valor agregado, generando así una posible actividad económica a partir de lo que inicialmente se considera un residuo no avaluado.

Finalmente, se articula que los objetivos de la presente investigación se alinean con dos objetivos de desarrollo sostenible. Primeramente, el ODS 9: industria, innovación e infraestructura, que tiene como finalidad promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2020). En segundo lugar, el ODS 15: vida de ecosistemas terrestres, que pretende detener e invertir la degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad (ONU, 2015). Asimismo, el plan de desarrollo departamental de Nariño “Mi Nariño en Defensa de lo Nuestro” estipula en la sección titulada “Mi Nariño Sostenible” la importancia de promover los sectores con mayor valor agregado y la integración tanto horizontal como vertical de las cadenas de valor. Igualmente, se busca fomentar proyectos de fortalecimiento y/o atracción empresarial que permitan acelerar los procesos de creación de valor, articulando la investigación y los productores locales (Gobernación de Nariño, 2020).

#### **1.4. Hipótesis**

Mediante el proceso de aprovechamiento secuencial se obtiene un rendimiento mínimo de 10% en base seca de aceite esencial, componentes bioactivos y etanol en relación a la materia prima que ingresa al sistema.

#### **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Obtener de forma secuencial aceite esencial, polifenoles, flavonoides y etanol a partir de los residuos generados de la actividad forestal del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*).

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Determinar el rendimiento del aceite esencial de los residuos generados del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor a escala laboratorio.
- Evaluar el efecto de la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido en la obtención de polifenoles y flavonoides presentes en los residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*).
- Establecer el efecto de la hidrólisis ácida y la fermentación en la producción de etanol a partir de la fracción húmeda de los residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*).

## **1.6. Marco referencial**

### **1.6.1. Antecedentes**

Se examinan los antecedentes en función de los objetivos específicos del proyecto de investigación, los cuales se estructuran en base a la obtención del aceite esencial, extracción de componentes bioactivos y, por último, obtención de etanol a partir de los residuos de Eucalipto.

#### **Obtención de aceite esencial (AE):**

- Almas et al., (2021) determinaron la composición química del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus maculata* por medio de un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cuantificaron los principales compuestos del AE empleando una curva de calibración de una muestra comercial.

- Limam et al. (2020) evaluaron las propiedades antioxidantes y antibacterianas de los AE obtenidos a partir de trece muestras de hojas de *Eucalyptus genus*, con el fin de determinar el rendimiento de aceite esencial y la composición química teniendo en cuenta su actividad antioxidante y antibacteriana, se concluye que el compuesto principal presente en la mayoría de las especies de *Eucalyptus* corresponde al 1,8-cineol con un 82,64%.

- Bey-Ould Si Said et al. (2016) utilizando la cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas determinaron la composición química del extracto de aceites esenciales de frutos de *Eucalyptus globulus*, con el fin de evaluar su actividad antioxidante mediante los métodos DPPH y BHA.

- Luís et al. (2016) evaluaron la composición química (GC-MS), la actividad antioxidante (DPPH), antibacteriana y antiplurum de aceites esenciales de Eucalipto, teniendo en cuenta su actividad sinérgica con antibióticos convencionales frente a cepas de *A. baumannii*.

- Moreno et al., (2010) estudiaron cómo el porcentaje de humedad y el tiempo de extracción influyen en el rendimiento de AE de Eucalipto y los costos de producción. Para lograrlo, consideraron la temperatura de vapor, la presión de extracción, la porosidad del lecho, el flujo de vapor y la temperatura de condensación. El objetivo principal fue evaluar las propiedades organolépticas, físicas y químicas del aceite obtenido.

### **Obtención de componentes bioactivos:**

- Palma et al. (2021) plantean como objetivo optimizar la extracción por ultrasonido de moléculas bioactivas de las hojas de *Eucalyptus globulus*. La extracción por ultrasonido ha sido considerada como uno de los métodos más prometedores, por ello, con el fin de conocer las relaciones entre los parámetros independientes y su influencia en la extracción de componentes bioactivos, se han estudiado diferentes parámetros que influyen en la capacidad de extracción como la potencia del ultrasonido, el tiempo, la temperatura, el pH y el porcentaje de etanol en agua. De esta forma, las condiciones de operación para la extracción sólido-líquido, las variables de

respuesta como contenido total de polifenoles y flavonoides, y la actividad antioxidante por ABTS y DPPH se observan en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Condiciones de operación para la extracción sólido – líquido asistida con ultrasonido.*

<b>Compuestos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>% de etanol en agua (%)</b>	<b>Potencia del ultrasonido (W)</b>	<b>Tiempo de extracción (min)</b>
<b>Contenido de polifenoles totales (mg GAE/100 g DW)</b>	50	5	40	10
<b>Contenido de flavonoides totales (mg CE/100 g DW)</b>	30	5	40	15
<b>Actividad antioxidante por ABTS (µmol TE/g DW)</b>	30	5	120	5
<b>Actividad antioxidante por DPPH (µmol TE/g DW)</b>	60	0	80	10

Fuente: Palma et al. (2021).

- Reyes-Giraldo et al. (2020) evaluaron la obtención secuencial de compuestos orgánicos a partir del epicarpio de chontaduro, mediante procesos de extracción como: fluido supercrítico para obtener un compuesto lipofílico y seguidamente un tratamiento de microondas para extraer un compuesto hidrofílico, con el objetivo de brindar un aprovechamiento al epicarpio del chontaduro que posee varias propiedades antioxidantes y nutricionales.

- Vallejo-Castillo et al. (2020) evaluaron el rendimiento de las microondas en la obtención de extractos ricos en componentes bioactivos como polifenoles y flavonoides, destacando su característica actividad antioxidante. El estudio se realizó partiendo de una mezcla de cáscara y pulpa de papaya, además, se estudiaron factores como relación sólido-líquido, potencia de las microondas y mezcla etanol-agua. Por otra parte, este trabajo fue un modelo para el planteamiento del diseño experimental, así como también, para la determinación de las variables de respuesta como el contenido total de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante por el método DPPH.
- Gullón et al. (2017) establecieron que los componentes fenólicos presentes en el Eucalipto contienen propiedades de alto interés en diferentes campos como el farmacéutico, el cosmético y el alimentario. Refleja gran importancia el estudio de nuevas alternativas para la extracción de estos componentes, por lo que se evalúan diferentes metodologías con respecto a parámetros establecidos de eficiencia, gasto energético, amigables con el medio ambiente y rentables económicamente. En este estudio, los autores presentan varias condiciones óptimas de operación para las extracciones con enzimas, microondas, ultrasonido y con solventes eutécticos, con el propósito de seleccionar las mejores alternativas para la extracción de componentes bioactivos con hojas de Eucalipto.
- Fernández-Agulló et al. (2015) estudiaron los residuos de madera industrial de Eucalipto como fuente de compuestos bioactivos. Se compararon dos técnicas de extracción (maceración en baño orbital y extracción asistida por microondas) mediante la variación de parámetros como el efecto de disolvente, la temperatura y tamaño de partícula sobre el rendimiento de extracción y propiedades del extracto.

### **Obtención de etanol:**

- Nogueira et al. (2021) llevaron a cabo una simulación del proceso de obtención de bioetanol con el fin de evaluar su impacto ambiental. En esta investigación, se consideraron factores como el uso de compuestos críticos en el proceso y la cantidad de etanol producido, con la finalidad de conocer el impacto que genera el proceso de producción frente a otros métodos tradicionales para la obtención de energía.

- Q. Yang et al. (2021) realizaron un pretratamiento combinado de impregnación y refinado de NH<sub>4</sub>Cl para recuperar los azúcares fermentables y optimizar el rendimiento del bioetanol. Se realizó el proceso de hidrólisis ácida y fermentación para determinar los efectos de la concentración de sustrato y calcular el rendimiento de conversión de celulosa y bioetanol.

- De acuerdo con McIntosh et al. (2017), es importante estudiar los factores que influyen en el rendimiento de etanol durante el proceso de hidrólisis y fermentación alcohólica. Por esta razón, mencionan detalladamente las condiciones de operación y la cantidad de sustancia necesaria para que la reacción se realice eficazmente, con el objetivo de mejorar la cantidad de etanol producido a partir de la materia prima. En la Tabla 2 se observan las condiciones de operación de hidrólisis y fermentación para diversas especies de Eucalipto.

**Tabla 2***Condiciones de operación para hidrólisis y fermentación del Eucalipto*

Especies	Pretratamiento e hidrólisis	Fermentación	Etanol	
			Titulación (G/L)	Rendimiento (%)
<i>E. globulus</i>	Explosión de vapor (210 °C/10 min), 10 FPU Celluclast	14 wt% SSF con <i>S. Cerevisiae</i> (CECT-1170), 96 h, 35 °C	51	91
<i>E. globulus</i>	Auto hidrolizado (230 °C), 16 FPU Celluclast	20 wt% SSF con <i>S. Cerevisiae</i> (CECT-1170), 96 h, 35 °C	67,4	91
<i>E. globulus</i>	Auto hidrolizado (210 °C), 22,4 FPU Ctec 2 plus 500 UI/g Htec 2	13,5 wt% mosto completo SSF con <i>S. Cerevisiae</i> (PE-2), 120 h,	50,2	94,7

		35 °C ó PSSF, 144 h, 35 °C		
<i>E. globulus</i>	Hidrotérmico (150 °C/4 h) con fresado de disco, 20 FPU Celulasa de <i>Acremonium</i> 40 (µL/g) Optimash BG	35 wt% PSSF con recombinante de <i>S. Cerevisiae</i> (MA-R4), 74 h, 32 °C (pilot scale)	48,8 53,5	92,1 82,2
<i>E. globulus</i>	Organosolv (50% etanol, 200 °C/45 min), 23 FPU Celluclast and 40 UI β-glucosidasa/g glucano	13 wt% SSF con <i>S. Cerevisiae</i> (IR2-9a), 72 h, 40 °C	42,7	58,7
<i>E. grandis</i>	Ácido catalizado explosión de vapor (180 °C/15 min/ 2,4 wt% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), 40 FPU Ctec2 plus 30 mg PEG 6000/ g biomasa	20 wt% SSF con <i>S. Cerevisiae</i> , 96 h, 36 °C	60	85,8

Fuente: McIntosh et al. (2017).

- Kumagai et al., (2014) aplicaron diversos pretratamientos para bioconversión de madera de ciprés y Eucalipto. La bioconversión de los productos pretratados se realizó mediante sacarificación enzimática y dos tipos de fermentación.
- González-García et al. (2012) evaluaron los aspectos ambientales en la producción y uso de etanol como combustible. Se realizaron estudios de su obtención y composición química, así como la evaluación de tres tipos diferentes de bioetanol, realizando una comparación con las emisiones y el rendimiento de la gasolina comúnmente usada.

## **1.7. Marco teórico**

Se abordan los conceptos fundamentales del trabajo de investigación bajo el orden metodológico y los objetivos establecidos. A continuación, se describen las operaciones, procesos unitarios y coproductos que se esperan obtener en cada etapa del proceso.

### **1.7.1. Aceite esencial (AE) de Eucalipto**

Se trata de un líquido volátil de origen natural, con una composición compleja y un agradable aroma. Los AE del Eucalipto (*Eucalyptus*) se extraen de las hojas de éste árbol, el cual se caracteriza por su gran altura (Moreiro, 2020). Estos aceites se obtienen a través de múltiple

Los aceites esenciales son mixturas complejas de metabolitos secundarios, y se componen mayormente por hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos. Este tipo de aceite posee varias propiedades gracias a su rica composición química, actividad antimicrobiana y actividad antioxidante (Montoya, 2010).

### **1.7.2. Polifenoles**

Comprenden compuestos fenólicos producto del metabolismo secundario de las plantas, presentan alta capacidad antioxidante y efectos positivos para la salud (Quiñones et al., 2012). La familia de los polifenoles comprende millares de moléculas que se clasifican en tres grandes grupos: ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides (Festy, 2007).

### **1.7.3. Flavonoides**

Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos que se localizan en la corteza de frutas y hortalizas. Estos componentes poseen una estructura de dos anillos aromáticos que incluyen grupos hidroxilos unidos por una cadena lineal de 3 carbonos. Además, son reconocidos como componentes bioactivos presentes en extractos de corteza, lo cual implica que son capaces de

modular diferentes actividades biológicas, como resultado de esta propiedad, los flavonoides presentan propiedades antialérgicas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras (Sillero et al., 2021).

#### ***1.7.4. Etanol***

El etanol, también conocido como alcohol etílico, es un compuesto químico incoloro con un olor característico. Su fórmula química es  $C_2H_5OH$  y su punto de ebullición es de aproximadamente 78,3 °C. Es miscible en agua y tiene una densidad de 789 kg/m<sup>3</sup>. El etanol es ampliamente usado en la producción de bebidas alcohólicas, gracias a que no presenta toxicidad en cuanto al consumo humano si se regula su ingesta frente a otro tipo de alcoholes (Cornejo, 2016). Asimismo, es uno de los productos químicos orgánicos sintéticos más importantes debido a sus usos tanto industriales como domésticos y medicinales. El alcohol etílico es ampliamente utilizado en la industria como solvente e intermediario en reacciones químicas y de recristalización. (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2004).

#### ***1.7.5. Destilación por arrastre de vapor***

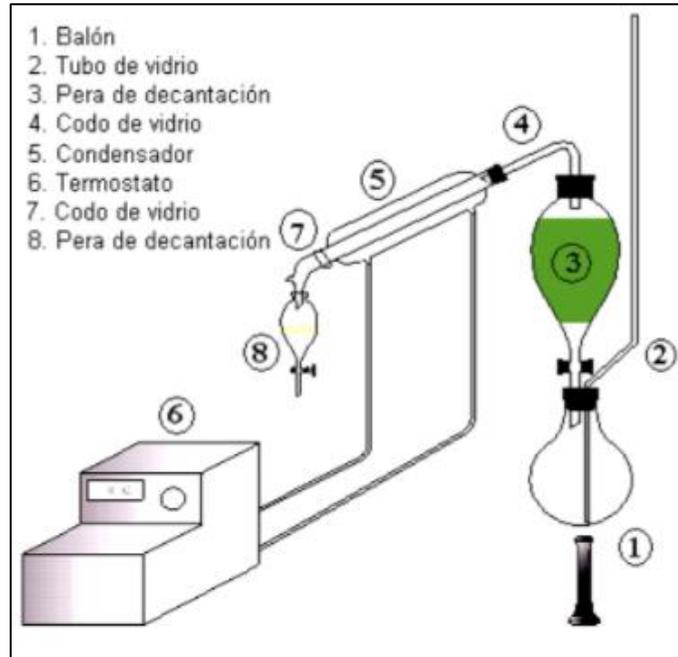
La destilación por arrastre con vapor de agua es la operación unitaria más frecuente para obtener los aceites esenciales de las plantas, esta técnica utiliza las propiedades del vapor de agua para unirse con las moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor entra en contacto con las células de la materia vegetal, ocasionando una ruptura en su pared celular lo que resulta en la liberación del aceite esencial presente en su estructura vegetal (Montoya, 2010).

De acuerdo con Moreno et al. (2010) las condiciones de operación óptimas tendrán que estar en función de la humedad de la hoja y el tiempo de extracción. El proceso tiene tres controles, siendo el primero la rápida vaporización del aceite esencial en el centro de la película. En segundo lugar, la difusión del aceite atrapado en la corriente circundante, gracias a la convección ejercida por el vapor en el lecho, y finalmente, la salida del aceite esencial desde el interior de los tricomas glandulares, pasando por la cutícula hacia el perfil superficial de la planta.

A continuación, se muestra la Figura 1 en ella se describe los componentes del equipo de destilación por arrastre con vapor.

**Figura 1**

*Diagrama destilación por arrastre con vapor*



Fuente: Moreno et al. (2010).

### ***1.7.6. Extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido***

La extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido es uno de los principales métodos para la recuperación de componentes bioactivos naturales. Se lo emplea para provocar la ruptura mecánica de la pared celular y liberar compuestos de interés (J. Yang et al., 2021).

Por su parte, las condiciones óptimas de extracción, dependen del material que se requiera extraer y de factores como pH, temperatura, % de etanol en agua, potencia del ultrasonido y tiempo de extracción. Principalmente, el factor de la temperatura dentro del proceso de extracción es el que mayor influencia posee sobre el contenido total de flavonoides en el resultado, así como

también el tiempo es una variable determinante para este factor de respuesta, por esta razón, se deduce que a mayores valores de temperatura se muestra un mejor rendimiento de contenido de flavonoides (Palma et al., 2021).

Según Syahir et al. (2020) el tiempo de extracción, constituye un parámetro importante puesto que la eficiencia del proceso se ve influenciada en dos fases: la primera, el proceso de “lavado” se opera los primeros 10-20 min de extracción, dándose generalmente el 90% de la extracción. La segunda fase, se denomina “extracción lenta”, donde el proceso de difusión ocurre a medida que la transferencia de masa del soluto se difunde en el solvente, y se da entre los 60-100 min aproximadamente. Adicional a ello, es relevante tener en cuenta que en el pico de la extracción, los compuestos recuperados son mayores debido a la ruptura completa de las células debido a los efectos de cavitación acústica durante la etapa inicial de extracción, que puede causar una mejor penetración de disolvente en las células y facilitar la liberación de aceite dentro de las células en el disolvente exterior (Fuad y Don, 2016).

#### **1.7.7. Base seca (dry basis)**

Matemáticamente se define como el cociente entre la masa de agua de una sustancia y su masa seca (Ecuación 1) (Martines y Lira, 2010).

#### **Ecuación 1**

*Base seca (db)*

$$\%H_{bs} = \frac{m_{H_2O}}{m_{seca}} * 100\%$$

Fuente: Martines y Lira (2010).

#### **1.7.8. Base húmeda (wet basis)**

La cantidad de agua presente en el material se representa como una fracción másica dentro de la masa total (Ecuación 2), por lo que será el porcentaje de agua que contiene un material (Martines y Lira, 2010).

## **Ecuación 2**

*Base húmeda (wb)*

$$\%H_{bh} = \frac{m_{H_2O}}{m_{total}} * 100\%$$

Fuente: Martines y Lira (2010).

### ***1.7.9. Hidrólisis térmica***

Corresponde a un proceso químico en el cual una sustancia se desintegra en moléculas accesibles a los microorganismos anaerobios presentes. Este procedimiento, se lleva a cabo en presencia de altas temperaturas (90 °C – 200 °C) y agua, siendo un pretratamiento térmico que permite acelerar la degradación de sustratos orgánicos (Gurieff et al., 2014).

### ***1.7.10. Hidrólisis ácida***

Según Canettieri et al. (2007) el proceso consiste en la catalización de la ruptura de un enlace químico mediante un ácido diprótico en presencia de agua. En esta reacción, un nucleófilo reemplaza a un átomo o grupo electrófilo en la molécula, formando un enlace covalente.

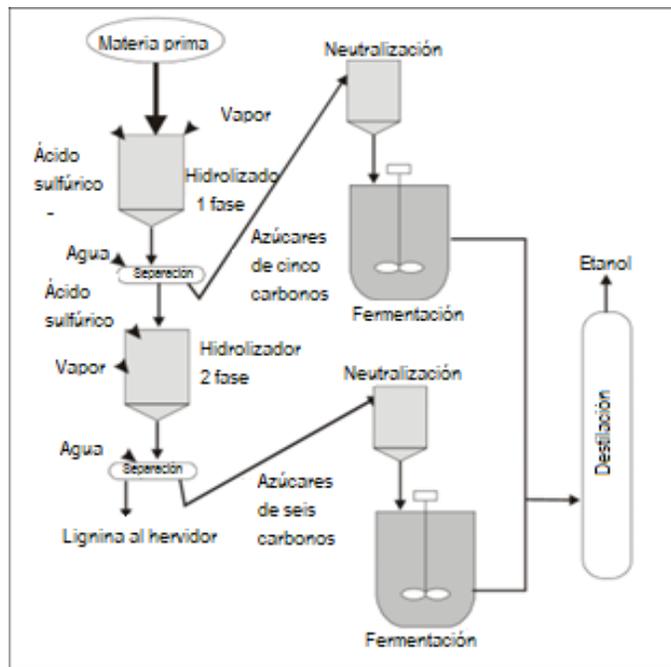
La temperatura es un factor crítico en el proceso de hidrólisis ácida para lograr una mayor extracción de los componentes deseados. Según el diseño experimental desarrollado por Canettieri et al. (2007), un aumento de temperatura resulta en una mayor extracción del componente de interés, así como en una mayor velocidad de reacción y un menor tiempo de reacción. Desde otro punto de vista, según Ávila et al. (2020) la temperatura fue el parámetro determinante en el

experimento de extracción de pectina por hidrólisis ácida, ya que a valores altos de temperatura se obtiene un mejor rendimiento de la variable de respuesta.

A continuación, se presenta la Figura 2 en la cual se evidencian los pasos para llevar a cabo la hidrólisis ácida y posteriormente, la fermentación para la obtención de etanol por destilación.

**Figura 2**

*Diagrama hidrólisis ácida*



Fuente: Barisano et al. (2001).

### ***1.7.11. Fermentación alcohólica***

Se trata de procesos ampliamente utilizados para la preparación de alimentos fermentados, los cuales implican la intervención de microorganismos capaces de procesar los azúcares presentes en la materia prima para generar etanol. Durante el proceso de fermentación, se deben considerar los siguientes factores que afectan su desempeño, como lo son la velocidad de crecimiento del

microorganismo, control del medio ambiente, temperatura, pH, intercambio gaseoso y estimación de biomasa (Bermúdez et al., 2007).

La cantidad de levadura añadida al proceso de fermentación es un factor crítico que influye en el ritmo de crecimiento y maduración de los microorganismos, así como para el rendimiento final del etanol. La Ecuación 3 describe el proceso de descomposición del almidón.

### **Ecuación 3**

*Obtención de glucosa fermentable*

*Almidón ( $\alpha$  – Amilasa; licuefacción) → Dextrinas (Glucoamilasa; sacarificación) → Glucosa*

Fuente: Barisano et al. (2001).

Es relevante señalar que la elección de un reactor hermético capaz de mantener aislada la presencia de oxígeno en el sistema es esencial para prevenir que éste afecte la producción de etanol (Miranda y Molina, 2015). La Ecuación 4 indica el proceso de fermentación alcohólica de la glucosa en presencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Ecuación 4**

*Fermentación alcohólica*

*Glucosa (*S. cerevisiae*; fermentación alcohólica) →  $2C_2H_5OH + 2CO_2$*

Fuente: Barisano et al. (2001).

- ***Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*):** también conocida como levadura de la cerveza, es un organismo eucariota importante dentro de la investigación biotecnológica debido a su amplia utilización en la industria de la panadería y en la fabricación de bebidas alcohólicas (Coronel y Valdez, 2019).

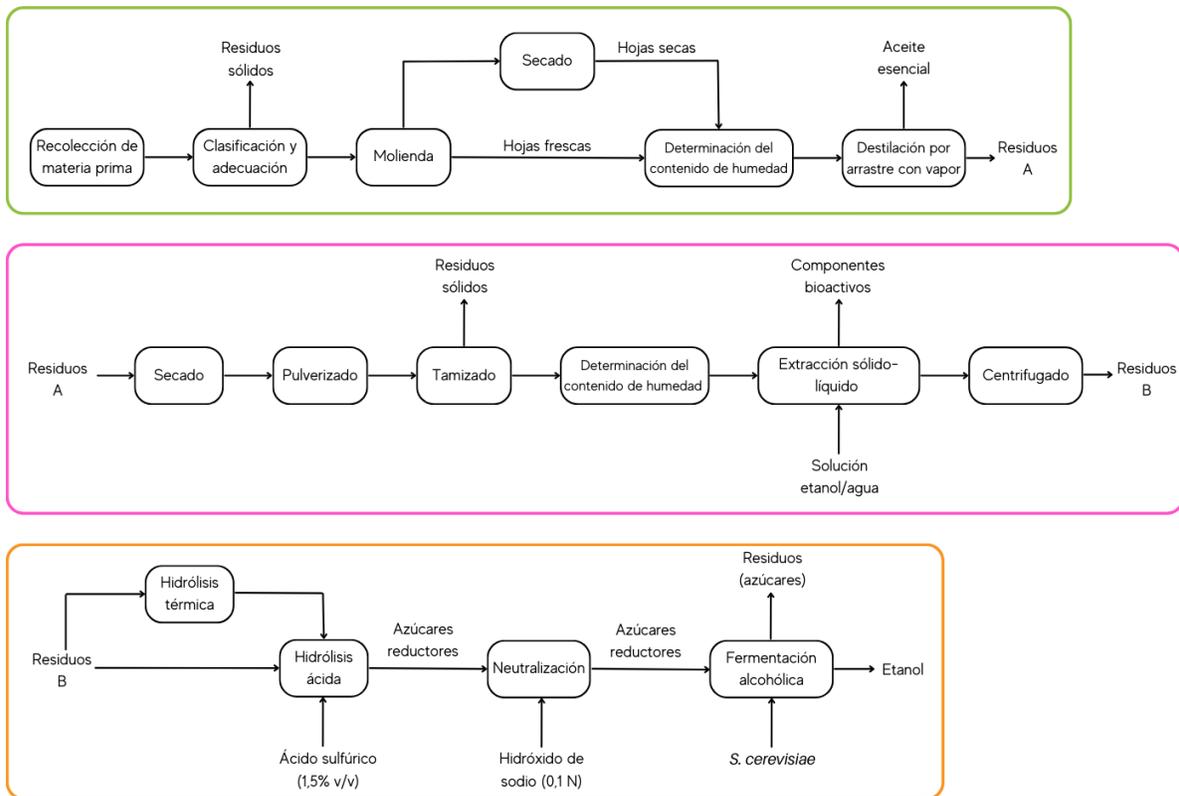
Las condiciones de cultivo ideal para esta levadura son: temperatura de 32 °C por un lapso de tiempo de 24 h en un medio que contiene: 10 g glucosa/L, 5 g peptona/L, 3 g extracto de malta/L y 3 g extracto de levadura/L (Romaní et al., 2012).

### 1.8. Metodología

La metodología tiene como objetivo abordar detalladamente los procedimientos necesarios para obtener aceite esencial, componentes bioactivos y etanol, teniendo en cuenta los residuos forestales del Eucalipto. La validación de los resultados se realiza mediante la aplicación de análisis estadísticos y la inclusión de un diseño experimental. En la Figura 3, se encuentran representadas en un diagrama de bloques las etapas asociadas a la obtención de los coproductos.

**Figura 3**

*Diagrama de bloques de la presente investigación*



**1.8.1. Determinar el rendimiento de aceite esencial de los residuos generados del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor a escala laboratorio**

- **Recolección de la materia prima:** para realizar el proceso de extracción secuencial se tiene en cuenta los parámetros de las operaciones y la representatividad de la muestra, por lo cual, se recolectaron 6 kg de hojas de Eucalipto en el municipio de San Lorenzo, Nariño (Figura 4). Se realizó el acondicionamiento de la materia prima por medio de un deshojado manual de las hojas de Eucalipto para continuar con la etapa de molienda.

**Figura 4**

*Hojas de Eucalipto*



- **Molienda:** es fundamental para exponer los aceites esenciales presentes en la materia vegetal (Figura 5), siendo factible la separación de las moléculas de interés gracias a la acción del vapor en el extractor. Se utilizó un molino de cuchillas con unas condiciones de operación de 6.000 rpm y 30 s.

## **Figura 5**

*Reducción de tamaño de las hojas de Eucalipto*



- **Secado:** para la obtención del aceite esencial se realizaron dos tratamientos: hojas frescas y hojas secas. Por ende, las hojas frescas fueron dispuestas en el extractor modular sin ningún tipo de tratamiento previo, mientras que las hojas secas se sometieron en un secador de bandejas a una temperatura de 50 °C y un tiempo de secado de 24 h (Vallejo-Castillo et al, 2020) con el propósito de eliminar el agua libre presente en la materia vegetal.
- **Determinación del contenido de humedad:** se empleó una balanza de humedad con el fin de determinar la cantidad de agua presente en una muestra de material. Para ello se utilizaron 2 g de hojas frescas y 2 g de hojas secas.
- **Destilación por arrastre con vapor:** el procedimiento se llevó a cabo en el extractor modular de aceites esenciales a escala laboratorio (Figura 6), empleando una temperatura de 93 °C, una presión de 1 atm, un tiempo de 1,5 h y 1 kg de material vegetal tanto para hojas frescas como para hojas secas.

**Figura 6**

*Extractor Modular de aceites esenciales*



El rendimiento del aceite esencial resultante se determinó en unidades de mL de AE/ g de materia seca (m.s) como se presenta en la Ecuación 5.

**Ecuación 5**

*Rendimiento del aceite esencial*

$$R. A. E (\%) = \frac{\text{Volumen del aceite esencial}}{\text{Masa seca de la muestra}} * 100$$

**1.8.2. Evaluar el efecto de la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido en la obtención de polifenoles y flavonoides presentes en lo residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

- **Secado:** los residuos sólidos generados de la extracción de aceite esencial se sometieron al proceso de secado en un horno de bandejas a una temperatura de 50 °C por 24 h (Vallejo-Castillo et al., 2020).
- **Pulverizado:** se realizó con el propósito de reducir el tamaño de partícula del material vegetal, se empleó un molino de cuchillas a 6.000 rpm cada 30 s.
- **Tamizado:** se efectuó con el objeto de que el material presente un tamaño de partícula menor o igual a 180  $\mu\text{m}$  (Vallejo-Castillo et al., 2020), se utilizó un tamiz malla 80.
- **Determinación del contenido de humedad:** se utilizaron 2 g del material tamizado para asegurar un contenido de humedad inferior o igual a 10% (Vallejo-Castillo et al., 2020).
- **Cinética de extracción:** se llevó a cabo un experimento preliminar con el fin de determinar la influencia de la frecuencia y el tiempo máximo de extracción, para establecerlos como factores constantes en el diseño experimental (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Condiciones de operación para la cinética de extracción sólido-líquido*

<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
Temperatura (°C)	45
Relación sólido-líquido (g/mL)	1/60
% v/v etanol/agua	50%
Volumen total (mL)	200
Frecuencia (kHz)	37 y 80

La toma de muestras se realizó cada 5 min hasta los 30 min de extracción, a partir de ese punto se tomaron las muestras en intervalos de 15 min hasta llegar a los 90 min y finalmente, se tomó la última muestra a los 120 min. Este procedimiento se ejecutó de manera semejante para la extracción

de polifenoles y flavonoides empleando ambas frecuencias. La extracción se realizó con el equipo de ultrasonido Fisherbrand® FB11203 (Figura 7).

**Figura 7**

*Equipo extractor de ultrasonido*



- **Análisis estadístico de los datos:** el análisis estadístico de la cinética de extracción correspondió al modelo de análisis de variabilidad (ANOVA) y prueba de Tukey, que son usados para comparaciones en la media con una significancia del 5%, haciendo uso del software de IBM SPSS STATISTICS en su versión licenciada.

- **Diseño central compuesto con superficie de respuesta:** teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento preliminar, se realizó un diseño central compuesto con superficie de respuesta con puntos axiales evaluando los factores de temperatura, relación sólido-líquido y porcentaje de etanol en agua, con el fin de optimizar la extracción de las variables de respuesta: contenido total de polifenoles, contenido total de flavonoides y actividad antioxidante (Tabla 4). Se contó con dieciocho corridas experimentales y cuatro réplicas en el punto central. El desarrollo del diseño experimental se llevó a cabo en el software Design-Expert en una versión beta para estudiantes.

**Tabla 4**

*Diseño experimental*

Factores	Niveles				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	19,77	30	45	60	70,23
Relación sólido- líquido (g/mL)	1/6,36	1/20	1/40	1/60	1/73,63
Porcentaje de etanol en agua (% v/v)	16,36	30	50	70	83,63

La ecuación general de una superficie de respuesta para un modelo cuadrático corresponde a la siguiente (Ecuación 6):

**Ecuación 6**

*Modelo cuadrático para la superficie de respuesta*

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{1,1} A^2 + \beta_{2,2} B^2 + \beta_{3,3} C^2 + \beta_{1,2} AB + \beta_{1,3} AC + \beta_{2,3} BC$$

Fuente: Vallejo-Castillo et al. (2020).

Donde  $Y_i$  representa la variable de respuesta, A, B y C son las variables del diseño experimental mencionadas anteriormente,  $\beta_0$  es una constante del punto central del experimento,  $\beta_1, \beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes principales,  $\beta_{1,1}, \beta_{2,2}$  y  $\beta_{3,3}$  son los coeficientes cuadráticos y finalmente  $\beta_{1,2}, \beta_{1,3}$  y  $\beta_{2,3}$  corresponden a los coeficientes de interacciones.

Para la elección del modelo matemático se tuvo en cuenta que el coeficiente  $R^2$  sea un valor aproximado a la unidad.

- **Determinación de variables de respuesta:** para determinar el contenido total de polifenoles (TPC) se utilizó la metodología de Folin-Ciocalteu en presencia de agua de alta pureza y carbonato de sodio bajo ciertas condiciones de luminosidad y tiempo. Posteriormente, se midió la absorbancia empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm, expresando el contenido de polifenoles en unidades estándar de Ácido Gálico equivalente por cada cien gramos de muestra fresca (mg GAE/100 g FW) (Vallejo-Castillo et al, 2020).

Para determinar el contenido total de flavonoides (TFC) presentes en las muestras se utilizó agua de alta pureza, una solución de nitrito de sodio al 5% (p/p), una solución de cloruro de aluminio al 10% (p/p), y finalmente, una solución de hidróxido de sodio 1 M. La absorbancia se midió empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm y los resultados se expresaron en unidades de miligramos de Catequina equivalentes por cada cien gramos de muestra fresca (mg CE/100 g FW).

La evaluación de la Actividad Antioxidante (A.A) se realizó por el método DPPH, el cual consistió en la adición de este reactivo a la muestra tomada, la absorbancia se determinó mediante un espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados se expresaron en unidades estándar de micromoles de Trolox equivalentes por cada cien gramos de muestra fresca ( $\mu\text{M TE}/100 \text{ g FW}$ ) y el porcentaje de actividad antioxidante se determinó utilizando la Ecuación 7.

### **Ecuación 7**

*Porcentaje de pérdida de Actividad Antioxidante*

$$\% AA = \frac{A_{t0} - A_{tf}}{A_{t0}} * 100$$

Fuente: Vallejo-Castillo et al. (2020).

**1.8.3. Establecer el efecto de la hidrólisis ácida y la fermentación en la producción de etanol a partir de la fermentación húmeda de residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

- **Hidrólisis térmica:** consistió en un pretratamiento térmico que tuvo como finalidad liberar el contenido intracelular del material vegetal para que sea más hidrolizable. Esta etapa se llevó a cabo en un matraz de Erlenmeyer de 500 mL, en donde se mezcló una muestra de 75 g de residuo obtenido en la extracción sólido-líquido, con 141,6 mL de agua. Posteriormente, se llevó el matraz a una placa de calentamiento durante 1 h a 90 °C (Segura et al., 2023).

**Figura 8**

*Hidrólisis térmica de residuos de Eucalipto*



- **Hidrólisis ácida posterior al pretratamiento:** se adicionó 25 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 1,5% (v/v) a la solución contenida en el matraz de Erlenmeyer. Seguidamente, se agitó la solución para garantizar la homogeneidad en la mezcla y se introdujo el matraz a una autoclave a 125 °C y 15 PSI (C. Hernández, 2017). Finalmente, se cuantificó los azúcares reductores por el método DNS, como se describe a continuación.

- **Cuantificación de azúcares reductores:** los azúcares reductores o fermentables se cuantificaron por medio del método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se procedió al análisis mezclando 500  $\mu$ L de muestra con 500  $\mu$ L de reactivo DNS. Posteriormente, los tubos de ensayo se sometieron a baño maría a una temperatura de 90 °C durante 5 min. Una vez transcurrido ese tiempo, los tubos de ensayo fueron colocados en un baño helado durante 5 min. Finalmente, se agregó agua destilada a cada muestra, se agitó y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (C. Hernández, 2017).

La concentración de azúcares reductores en g/L se determinó a través de una curva de calibración (Anexo B) empleando glucosa como patrón.

- **Neutralización:** se adicionó hidróxido de sodio (NaOH) (0,1 N) con la finalidad de equilibrar la acidez de la solución después de someterse a la hidrólisis ácida. Este procedimiento es crucial para asegurar que el pH sea de 4,5, permitiendo así que la levadura realice de manera efectiva el proceso de fermentación.

- **Fermentación alcohólica:** se desarrolló en un biorreactor a escala laboratorio (Figura 9) durante 3 días, en esta etapa se empleó el sobrenadante del hidrolizado y se utilizó como inóculo el 5% (p/v) de levadura húmeda (Guerra, 2015).

## **Figura 9**

*Fermentación de residuos de Eucalipto*



Adicionalmente, se realizaron mediciones de los azúcares reductores a lo largo del proceso de fermentación, obteniendo un total de 9 muestras durante un período de 3 días.

A su vez, Schneider et al. (2020) propone los cálculos del rendimiento de etanol (Ecuación 8).

### Ecuación 8

*Rendimiento de etanol (producto/sustrato)*

$$Y_{P/S}(\%) = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$$

Fuente: Schneider et al. (2020).

Donde  $Y_{P/S}$  es la relación entre el rendimiento del producto (etanol) y el sustrato (glucosa), expresado en gramos de etanol por g de glucosa.  $P_f$  es el etanol final en g,  $P_i$  es el etanol inicial en g,  $S_i$  es la glucosa inicial en g,  $S_f$  es la glucosa final en g (Schneider et al., 2020).

- **Determinación del contenido de etanol en la muestra:** para determinar la cantidad de etanol presente en la muestra obtenida posterior a la fermentación de los residuos de Eucalipto, se consultó la norma técnica colombiana NTC 5113:2022, que tiene como objeto la cuantificación del

porcentaje de etanol de una muestra a una temperatura de 20 °C, expresada en grados Gay-Lussac Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC, 2022).

Para este proceso se realizó un montaje de destilación simple que constó de una fuente de calor, un control de temperatura, un matraz de destilación de 250 mL, una trampa para destilación, un condensador y un matraz de Erlenmeyer en dónde se recogió el destilado (Figura 10).

### **Figura 10**

*Montaje para destilación simple*



La estimación del grado de alcohol de la muestra se efectuó mediante la determinación de la densidad relativa (Ecuación 9), que establece la relación entre la densidad de una sustancia problema (muestra) y la densidad de una sustancia de referencia (agua).

### **Ecuación 9**

*Cálculo de la densidad relativa*

$$\text{Densidad relativa} = \frac{\text{Peso del destilado}}{\text{Peso del agua}}$$

Fuente: ICONTEC (2022).

## 2. Presentación de resultados

### 2.1. Determinar el rendimiento del aceite esencial de los residuos generados del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor a escala laboratorio

#### 2.1.1. Contenido de humedad

Las humedades resultantes para los tratamientos de hojas frescas y hojas secas se presentan en la Tabla 5. De acuerdo con los hallazgos de la presente investigación, se afirma que las condiciones iniciales de humedad de las hojas de Eucalipto frescas son adecuadas para realizar la destilación por arrastre con vapor, puesto que según Del Pezo y Loaiza (2016) el porcentaje de humedad del Eucalipto en estado natural varía en un rango comprendido entre 30% y 50%. A su vez, se obtuvo una humedad en las hojas secas de alrededor del 5% que, según Moreno et al. (2010), es una humedad apta para la recuperación de aceite esencial ya que este valor debe oscilar entre un 5 y 10% con el fin de mejorar los procesos de transferencia de masa.

**Tabla 5**

*Contenido de humedad en las muestras*

Tratamiento	Humedad (% wb)*
Hojas frescas	49,651 ± 0,930
Hojas secas	5,086 ± 0,320

*Nota:* \*Promedio ± desviación estándar

De acuerdo con Delgado et al. (2016) el contenido de agua presente en el material vegetal durante la extracción es un factor crucial para determinar el rendimiento del aceite esencial, puesto que si considera un bajo porcentaje de humedad se genera un mayor rendimiento de aceite esencial debido a su elevada volatilidad.

### 2.1.2. Rendimiento del aceite esencial

El análisis de varianza (ANOVA) volumen-masa realizado para evaluar el rendimiento del aceite esencial, corrobora que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados con un valor  $p$  mayor a 0,05 (Tabla 6). Aunque se obtuvo un rendimiento de 0,102% de AE en el tratamiento con hojas secas, se concluyó que la humedad no representa un factor significativo en la obtención del aceite esencial de Eucalipto.

**Tabla 6**

*Rendimiento del AE (% mL/g m.s)*

<b>Tratamiento</b>	<b>Rendimiento (%)*</b>
Hojas frescas	0,102 ± 0,005 <sup>a</sup>
Hojas secas	0,101 ± 0,006 <sup>a</sup>

*Nota:* \*Promedio ± desviación estándar, <sup>a</sup>Superíndices diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

El rendimiento de AE obtenido en esta investigación es consistente con el reportado por Amaya y Sandoval (2020), quienes emplearon condiciones de operación similares y lograron un rendimiento de extracción de AE de 0,266%. Sin embargo, es importante señalar que en ese estudio los investigadores llevaron a cabo un pretratamiento de secado en la materia prima durante un período de 15 días. Este pretratamiento influyó en el incremento del rendimiento debido a que el Eucalipto, al secarse, experimenta un aumento en la concentración de compuestos volátiles, como los terpenos, los cuales se liberan con mayor facilidad durante dicho proceso.

### 2.1.3. Análisis GC-MS del aceite esencial

Los compuestos volátiles del aceite esencial de Eucalipto se identificaron mediante Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS), en donde se evidenciaron 20 picos. Los principales componentes que se registraron en la muestra de AE correspondieron a 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol) (14%), Ácido Hexadecanoico (9,27%), 1,8-Cineol

(Eucaliptol) (1,13%) y Limoneno (0,54%) que son sustancias presentes en diversos aceites vegetales, empleados como aditivos alimentarios debido a sus efectos antioxidantes (Ponnamma y Manjunath, 2012) (Anexo A). El Eucaliptol y el Limoneno, según Limam et al. (2020), son terpenos que se encuentran en el aceite esencial de Eucalipto y se caracterizan por sus propiedades aromáticas y medicinales. Estos compuestos son considerados componentes principales debido a su abundancia en dicho aceite.

## 2.2. Evaluar el efecto de la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido en la obtención de polifenoles y flavonoides presentes en los residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)

### 2.2.1. Adecuación de los residuos

Los residuos generados en el proceso de destilación por arrastre con vapor presentaron una humedad inferior al 10% (Tabla 7), que según Vallejo-Castillo et al. (2020) es apropiada para mejorar la eficiencia del proceso de extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido, por tanto, se deduce que el proceso de secado fue satisfactorio, alcanzando valores en promedio menores al 5% con una desviación estándar entre 0,2% y 0,3%.

**Tabla 7**

*Contenido de humedad de los residuos*

<b>Tratamiento</b>	<b>Humedad (% wb)*</b>
Hojas frescas	5,181 ± 0,305
Hojas secas	4,092 ± 0,225

*Nota:* \*Promedio ± desviación estándar

Parada (2017) indica que el tamaño de partícula influye significativamente en el proceso debido a que la molienda del material sólido, ocasiona incrementos en su área superficial específica, así como una ruptura de las paredes celulares y barreras internas, logrando una mayor accesibilidad del solvente. Es por ello, que el tamaño de partícula de los residuos fue menor a 180 µm, lo cual es adecuado según el reporte de Vallejo-Castillo et al. (2020), debido que incrementa la transferencia

por parte de la materia vegetal, liberando los compuestos de interés de forma eficiente, ahorrando energía, cantidad de solvente y tiempo, que son variables fundamentales en la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido (Palma et al, 2021).

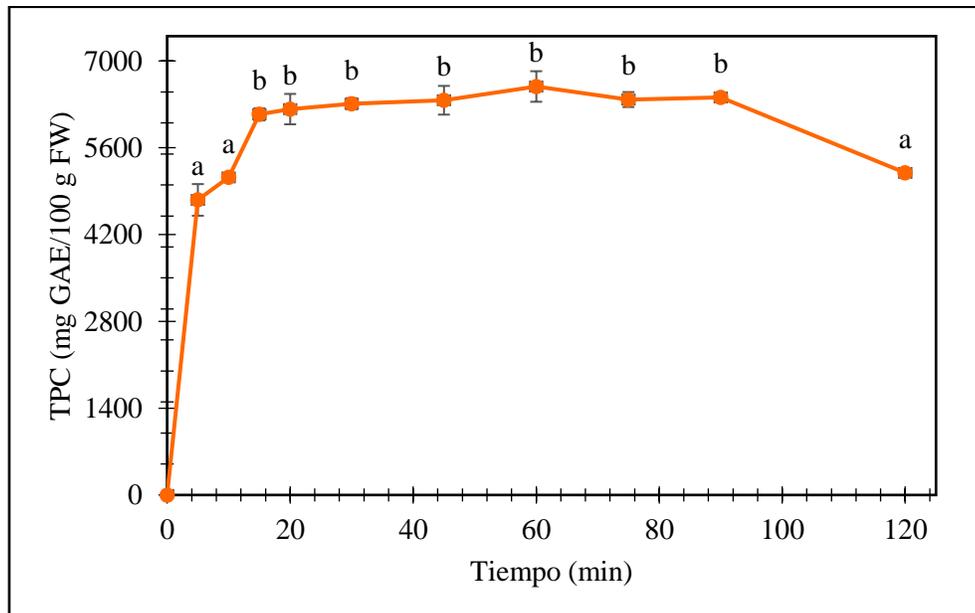
### 2.2.2. Cinética de extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la cinética de extracción sólido-líquido para los polifenoles y flavonoides, se observa la variación del TPC (mg GAE/100 g FW) y TFC (mg CE/100 g FW) en relación al tiempo de extracción para 37 kHz, Figura 11 y Figura 12 respectivamente.

En relación a los superíndices presentados en las figuras posteriores, las letras iguales hacen referencia a que los tiempos comprendidos en estos rangos no poseen diferencias estadísticamente significativas. Esto es relevante para determinar el tiempo máximo de extracción, ya que se infiere que, a partir de este punto, continuar con el proceso conlleva gastos de tiempo, energía y recursos sin obtener una cantidad considerable de componentes bioactivos.

**Figura 11**

*Contenido total de polifenoles a 37 kHz*

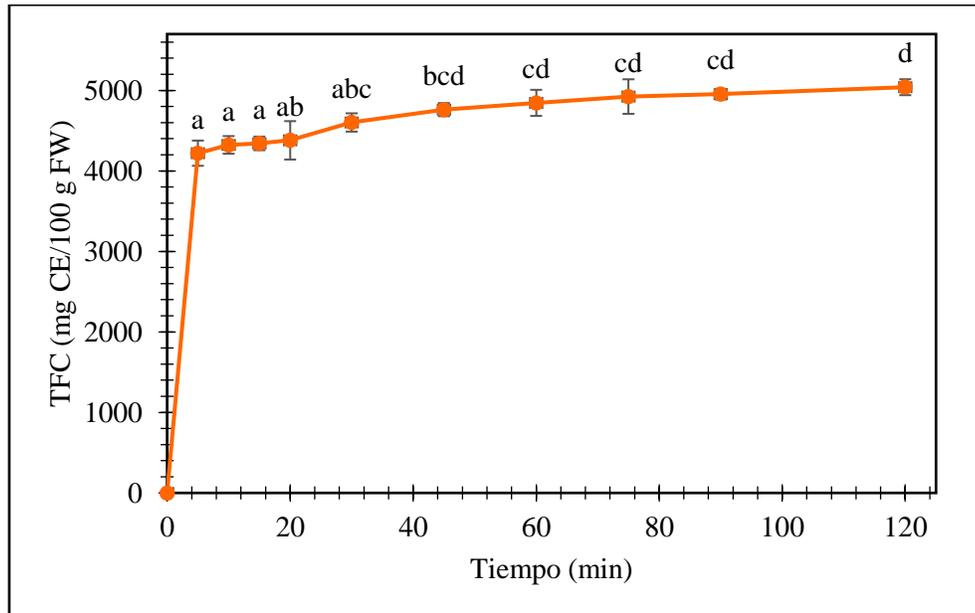


*Nota:* letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir de la figura presentada anteriormente, se concluye que existe una relación proporcional no lineal entre las variables estudiadas, puesto que el TPC tiende a aumentar con respecto al tiempo de extracción de las muestras. Adicionalmente, los superíndices indican que las diferencias no son significativas a partir de los 15 min de extracción. Se observa que en el minuto 120 disminuye el TPC, según Sepúlveda y Zapata, (2019) esto se debe porque los polifenoles son sensibles al calor y se desnaturalizan generalmente al alcanzar los 75 °C.

### Figura 12

Contenido total de flavonoides a 37 kHz



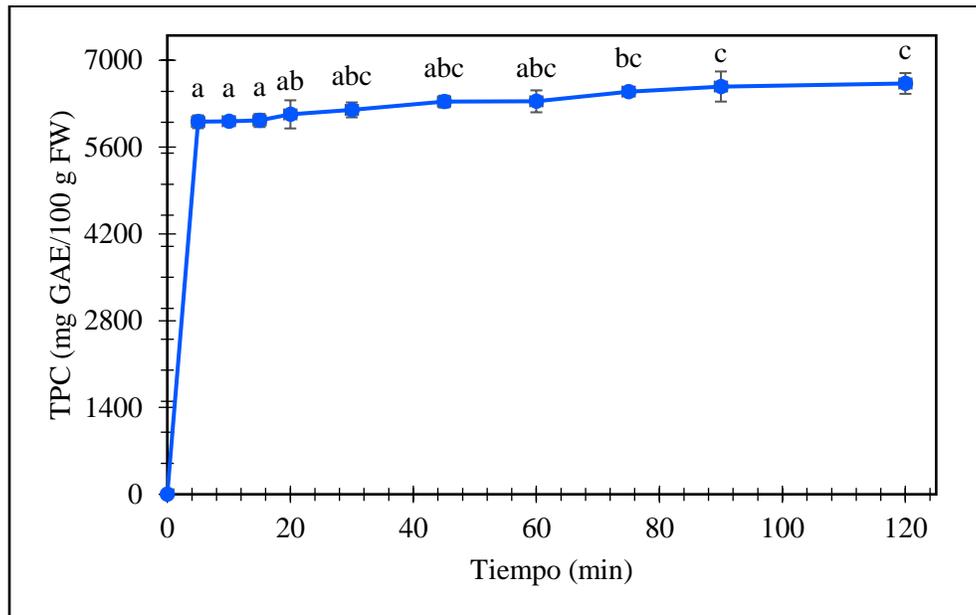
Nota: letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

La Figura 12 comprueba que los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos reportados por Soto-García y Rosales-Castro (2016), quienes señalaron que el TFC aumenta con el tiempo de extracción de los componentes bioactivos, hasta alcanzar una condición de estabilidad. Adicionalmente, se presentó un punto máximo de TFC correspondiente a  $5.040,3130 \pm 98,73803$  mg CE/100 g FW, lo cual coincide con los resultados reportados por Vargas, (2019).

De forma similar, al considerar los resultados obtenidos en la cinética de extracción sólido-líquido para los polifenoles y flavonoides, se observa la variación del TPC (mg GAE/100 g FW) y TFC (mg CE/100 g FW) en relación al tiempo de extracción para 80 kHz, Figura 13 y Figura 14, respectivamente.

### Figura 13

Contenido total de polifenoles a 80 kHz

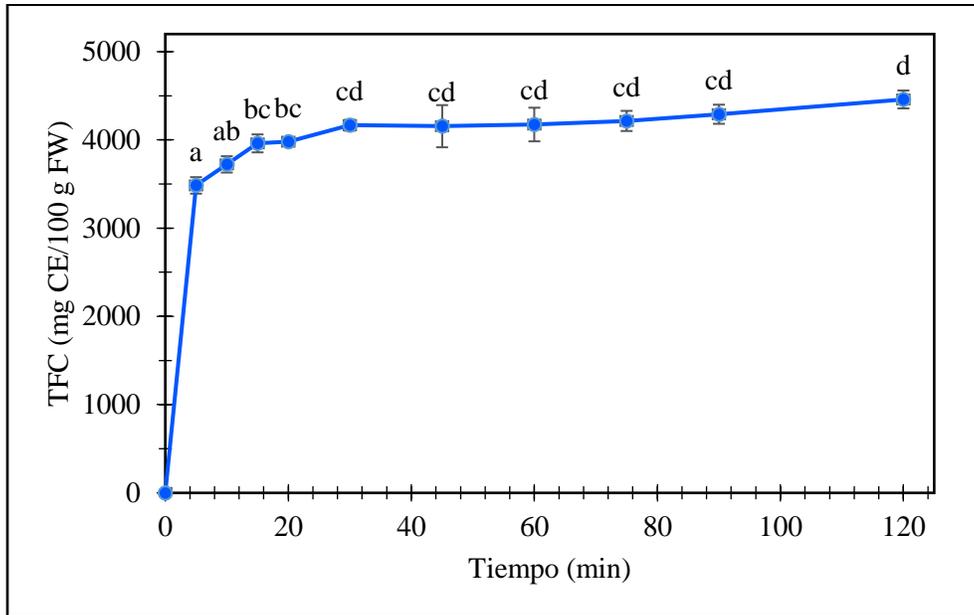


Nota: letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Según González et al. (2017), la cinética de extracción de polifenoles para el Eucalipto se caracteriza por un aumento drástico en la concentración de fenoles en la primera fase del proceso de extracción, denominada como fase de rápida difusión, debido a que el extracto se encuentra en las capas superficiales del material. A medida que avanza el tiempo de extracción, se presenta la fase de difusión lenta hasta alcanzar una condición de saturación, en la cual el TPC tiende a estabilizarse, disminuyendo la transferencia de soluto o materia vegetal al solvente. La Figura 13 indica que para la extracción de polifenoles a 80 kHz no existen diferencias significativas a partir de los 30 min.

**Figura 14**

*Contenido total de flavonoides a 80 kHz*



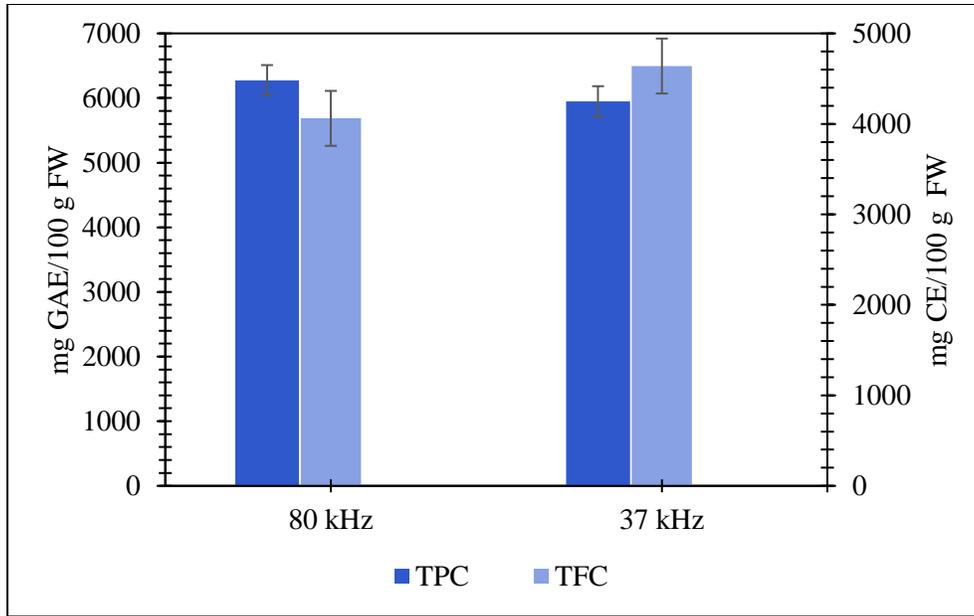
*Nota:* letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

La figura presentada anteriormente indica que el tiempo máximo de flavonoides a 80 kHz corresponde a 30 min.

A continuación, se presenta la comparación del TPC y TFC en función de las frecuencias de extracción, se evidenció que el promedio del TPC es mayor empleando la frecuencia de 80 kHz con un valor de  $6.274,8 \pm 234,456$  mg GAE/100 g FW. Mientras que para los flavonoides el valor más alto se alcanza con la frecuencia de 37 kHz con  $4.639,37 \pm 303,69$  mg CE/100 g FW (Figura 15).

**Figura 15**

*Comparación de TPC y TFC en función de las frecuencias*



Por lo tanto, aunque se logran valores mayores al extraer polifenoles utilizando una frecuencia de 80 kHz, la diferencia entre ambas frecuencias es de 325,910 mg GAE/100 g FW presentando una reducción en el tiempo de extracción de un 50%, entonces, se concluye que a 37 kHz se cuenta con un tiempo de extracción menor sin afectar de forma drástica el TPC. De acuerdo con la Figura 15, se evidenció que los flavonoides presentan un valor superior cuando se utiliza una frecuencia de 37 kHz, con una diferencia de 578,416 mg CE/100 g FW. Con respecto a la duración de extracción, a 80 kHz son 15 minutos menos que en la extracción de 37 kHz, sin embargo, los valores de TFC varían drásticamente en relación a las frecuencias utilizadas.

En el estudio realizado por Kaur-Bhangu et al. (2016) se evaluó la incidencia de la frecuencia, empleando como solvente una mezcla etanol/agua, donde se variaron las frecuencias 40 kHz, 80 kHz y 120 kHz y concluyeron que al aumentar la frecuencia del ultrasonido se afectaba negativamente el contenido total de polifenoles, por tanto, la frecuencia óptima seleccionada fue de 40 kHz, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación debido que, al aplicar una frecuencia menor en el proceso de extracción, se consigue una cantidad de polifenoles y flavonoides acorde al tiempo máximo de extracción y optimización de recursos como el consumo energético y tiempo de proceso.

Según lo mencionado por Kumar et al. (2021) la influencia de la frecuencia es relevante dentro del proceso de extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido, ya que se generan fenómenos de cavitación acústica que ocurren con la formación de burbujas, las cuales poseen un ciclo de compresión-rarefacción durante el proceso de extracción, de esta forma se conoce que a bajas frecuencias las burbujas de cavitación se forman en menor cantidad pero con un mayor diámetro que favorece el efecto de cavitaciones de duración prolongada.

Debido a esta razón, se seleccionó la menor frecuencia con el objetivo de generar tiempos más prolongados en los ciclos de compresión-rarefacción permitiendo el crecimiento de pocas burbujas de cavitación con grandes diámetros, incrementando la transferencia de masa entre los compuestos de interés.

### 2.2.3. Diseño experimental central compuesto con superficie de respuesta

- **Efecto de los factores de extracción en el TPC de los residuos de Eucalipto:** el modelo matemático para TPC (Ecuación 10), presenta un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0,8, un valor F alto y un valor  $p < 0,05$  (Tabla 8). Lo que indica que el modelo es apropiado para describir los valores obtenidos para la extracción de TPC de los residuos de Eucalipto.

**Tabla 8**

*Modelos matemáticos de superficie de respuesta para el diseño experimental*

Variable de respuesta	F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Falta de ajuste (p-value)
TPC (mg GAE/100 g FW)	9,32	0,0003	0,814	0,225
TFC (mg CE/100 g FW)	18,20	0,0054	0,901	0,059

Según el diagrama de Pareto (Figura 16), los factores individuales de relación (B) y porcentaje de solvente (A) mostraron efecto positivo y directo sobre la variable de respuesta TPC ( $p < 0,05$ ),

por lo tanto, al aumentar la relación y el porcentaje de solvente se obtendría mayor contenido de polifenoles.

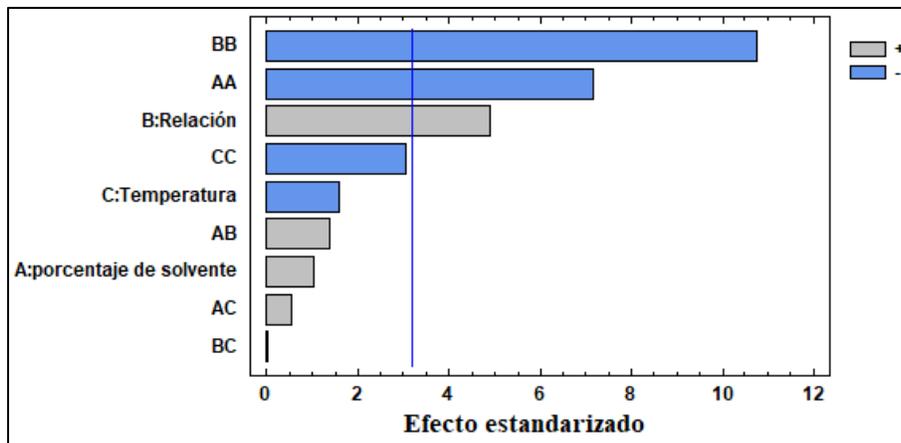
**Ecuación 10**

*Modelo cuadrático para TPC*

$$TPC = 7.101,02 + 132,86 * A + 628,99 * B - 203,94 * C - 957,24 * A^2 - 1.438,67 * B^2 - 408,67 * C^2 + 235,93 * A * B + 89,18 * A * C - 1,14 * B * C$$

**Figura 16**

*Diagrama de Pareto para la variable de respuesta TPC*

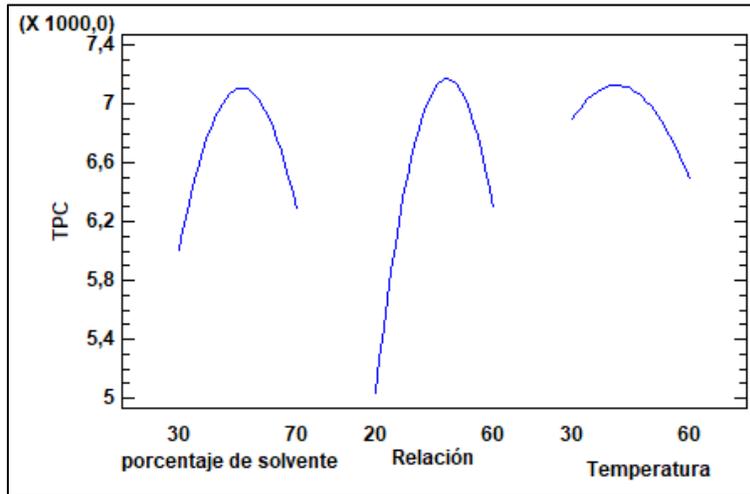


El efecto positivo del porcentaje de solvente puede ser debido al incremento en el coeficiente de transferencia de masa que ocurre durante el proceso de extracción, ya que según Palma et al. (2021), los compuestos bioactivos presentes en la materia vegetal del Eucalipto son fácilmente extraíbles con ayuda de elevadas concentraciones de solvente, en este caso etanol. En el caso de la temperatura (C) presenta un efecto negativo, lo que indica que no es conveniente para el proceso elevar la temperatura ya que es posible que algunos compuestos se vean afectados por este factor e influyan de forma negativa en el TPC.

En el diagrama de efectos principales (Figura 17) se evidencia que para los tres factores existen puntos donde se alcanzan los valores máximos de extracción de la variable de respuesta, por lo que seguir aumentando los valores de los factores de forma indefinida no optimizaría el proceso, sino que por el contrario perjudica los valores del contenido de polifenoles.

**Figura 17**

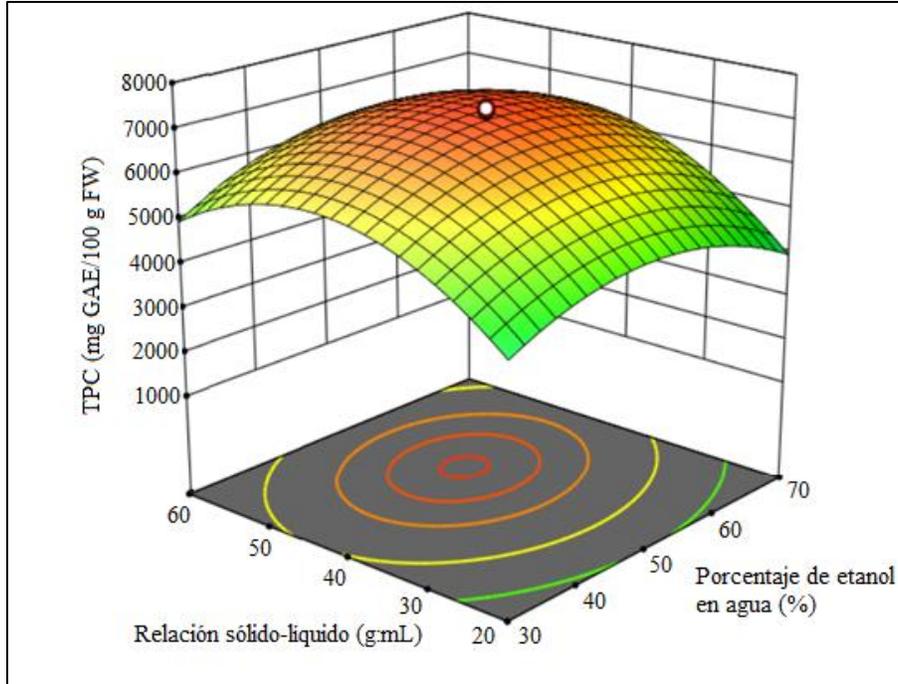
*Diagrama de efectos principales TPC*



De acuerdo al análisis presentado, la gráfica de superficie y contornos (Figura 16) indica que existe un punto óptimo para los tres factores, en el que se maximiza la cantidad del contenido total de polifenoles.

**Figura 18**

*Superficie y contornos de respuesta estimada para TPC*



- **Efecto de los factores de extracción en el TFC de los residuos de Eucalipto:** el modelo matemático para TPC (Ecuación 10), presenta un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) cercano a 1, un valor F alto y un valor  $p < 0,05$  (Tabla 8). Lo que indica que el modelo es apropiado para describir los valores obtenidos para la extracción de TPC de los residuos de Eucalipto.

### Ecuación 11

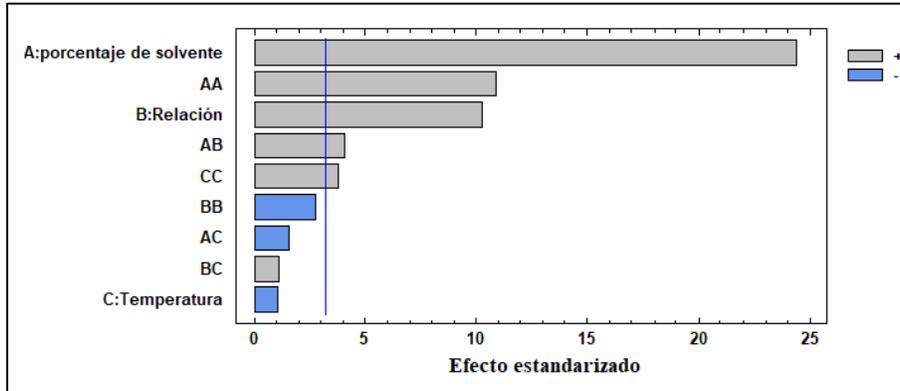
*Modelo cuadrático para TFC*

$$TFC = 3.015,89 + 1.755,05 * A + 736,36 * B - 76,73 * C + 808,40 * A^2 - 203,65 * B^2 + 284,74 * C^2 + 380,07 * A * B - 146,95 * A * C + 108,68 * B * C$$

En relación al diagrama de Pareto (Figura 19), se obtuvieron resultados similares a los resultados de polifenoles, la relación (B) y el porcentaje de solvente (A) presentan efectos positivos en la variable de respuesta TFC ( $p < 0,05$ ).

**Figura 19**

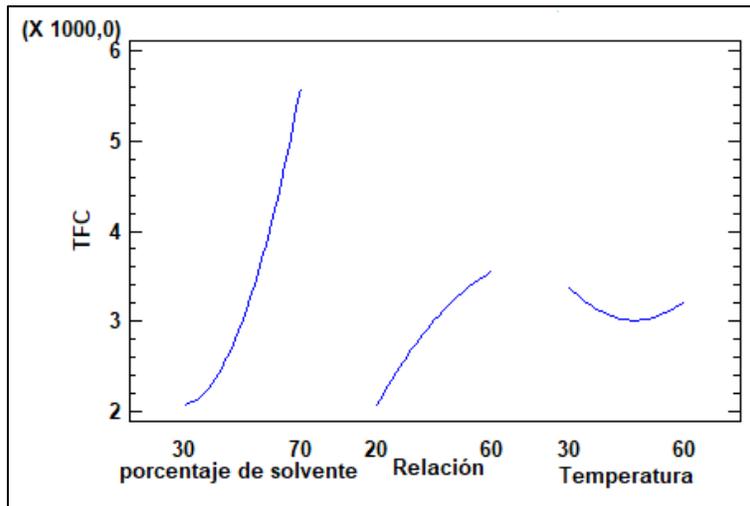
*Diagrama de Pareto para la variable de respuesta TFC*



Según el diagrama de efectos principales (Figura 20), a medida que el porcentaje de solvente y la relación aumenta, se incrementa la cantidad de TFC, sin embargo, la relación (B) tiende a estabilizarse por lo que se observa, la temperatura muestra un comportamiento particular ya que muestra un incremento en la variable de respuesta cuando se encuentra en los valores cercanos a los límites establecidos por el diseño experimental, mientras que en los valores medios el TFC tiende a disminuir.

**Figura 20**

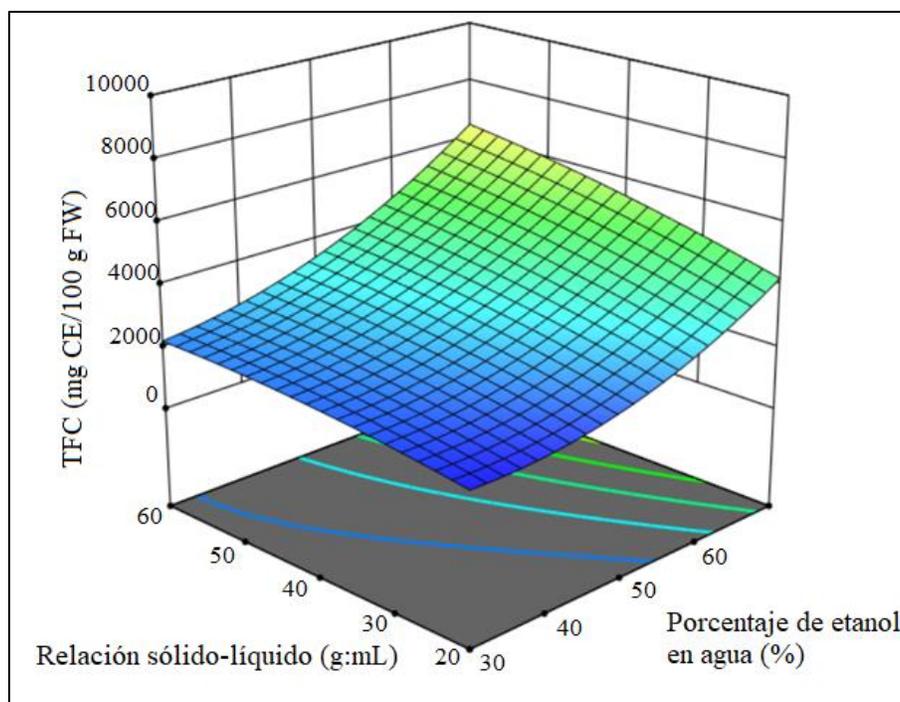
*Diagrama de efectos principales TFC*



En contraste con los polifenoles, en este caso no se observó un punto máximo en la variable de respuesta. En lugar de eso, se identificó un crecimiento continuo a medida que aumenta el porcentaje de solvente, como se aprecia en el diagrama de efectos principales. No obstante, es importante destacar el impacto negativo de la temperatura, como se evidencia en el diagrama de Pareto.

### Figura 21

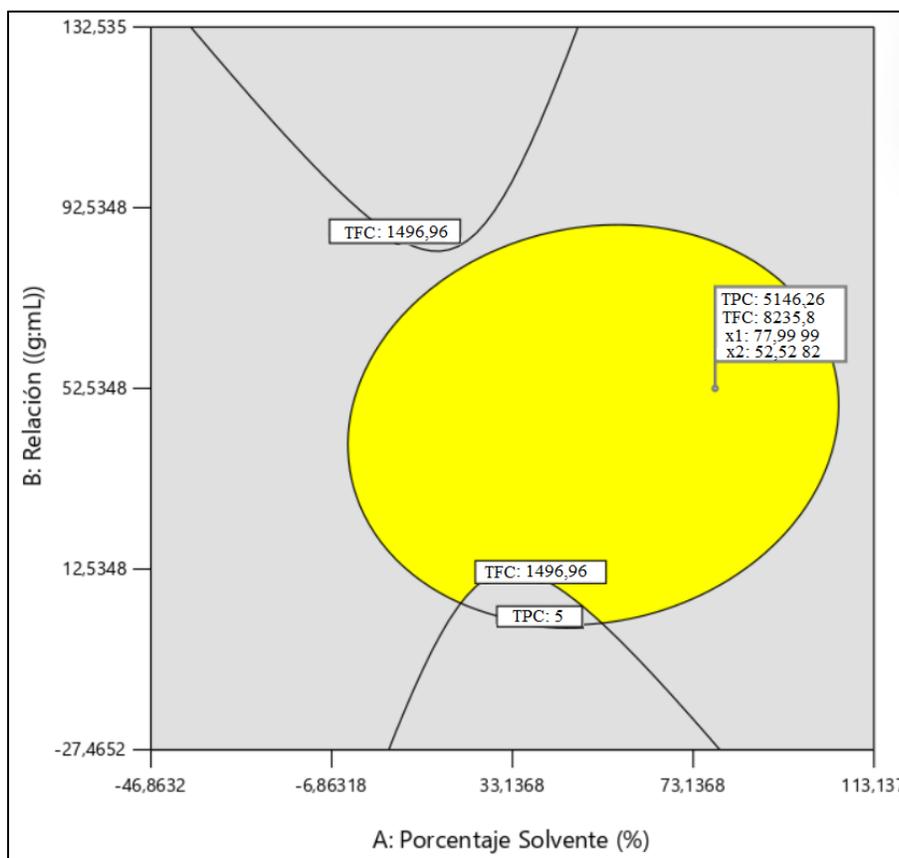
*Superficie y contornos de respuesta estimada para el TFC*



Finalmente, se realizó la optimización de respuestas múltiples para obtener las condiciones óptimas para la extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido con el fin de maximizar el contenido total de polifenoles y flavonoides. Los factores de relación, porcentaje de solvente y temperatura se indican en el diagrama de superposición de contornos (Figura 22). El área resaltada en amarillo representa el rango apropiado de los factores experimentales que conducen a la maximización de las variables de respuesta. Las condiciones óptimas de operación que el modelo predijo se observan en la Tabla 9.

**Figura 22**

*Superposición de contornos*



Considerando la naturaleza de la materia prima y el comportamiento de los factores en relación con las variables de respuesta, se observa una ligera relación inversa entre el contenido total de polifenoles (TPC) y el contenido total de flavonoides (TFC). Según el modelo matemático, si se buscan valores más altos para ambas variables de respuesta, la deseabilidad resultante es inferior a 0,6, lo cual está por debajo de los rangos aceptables. Por esta razón, se ha tomado la decisión de elegir como referencia para la optimización el valor máximo del contenido total de flavonoides, que es de 8.238,02 mg CE/100 g FW.

**Tabla 9***Condiciones óptimas en el modelo de superficie de respuesta*

<b>Porcentaje de etanol en agua (%)</b>	<b>Relación sólido-líquido (g/mL)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>TPC (mg GAE/100 g FW)</b>	<b>TFC (mg CE/100 g FW)</b>	<b>Deseabilidad</b>
78	52,51	30,63	5.147,77	8.238,02	0,92

De acuerdo con la tabla presentada anteriormente, se realizaron las corridas experimentales con las condiciones del modelo para validarlo experimentalmente, obteniendo un valor de TPC de  $5.062,98 \pm 243,32$  mg GAE/100 g FW y un valor de TFC de  $8.966,69 \pm 99,31$  mg CE/100 g FW. Los valores se acercan de forma satisfactoria al modelo empleado, lo que indica que el método empleado es conveniente en la maximización de las variables de respuesta, en el caso de TFC se obtuvo un valor mayor al esperado con una diferencia de 728,67 mg CE/100 g FW mientras que para polifenoles existe una diferencia de 84,79 mg GAE/100 g FW. Consiguiendo un error absoluto de 8,84% para TFC y 1,64% para TPC, en ambos casos con errores menores al 10%.

- **Evaluación de la Actividad Antioxidante (A.A):** según Zhang et al. (2023) la actividad antioxidante es de gran importancia debido a la variedad de compuestos antioxidantes, como flavonoides, fenoles y terpenoides, que confieren la capacidad de neutralizar los radicales libres y proteger a las células contra el estrés oxidativo, por lo tanto, una A.A superior al 50% significa que más de la mitad de los radicales libres generados en el ensayo son neutralizados por el compuesto en estudio, por lo cual, se presenta una actividad antioxidante efectiva.

En el experimento que se llevó a cabo, se determinó que los residuos de Eucalipto tienen un potencial antioxidante efectivo del 78,6% (porcentaje de pérdida de actividad antioxidante), lo cual representa  $410,071 \pm 0,418$   $\mu$ M TE/100 g FW que concuerda con el estudio reportado por Chen et al. (2023).

### **2.3. Establecer el efecto de la hidrólisis ácida y la fermentación en la producción de etanol a partir de la fracción húmeda de los residuos del Eucalipto (*Eucalyptus spp.*)**

#### **2.3.1. Curva de calibración de glucosa**

Teniendo en cuenta el Anexo B, se obtuvo una afinidad de 0,999 según el  $R^2$  presentado, que indicó una correlación apropiada entre la concentración de glucosa empleada y la absorbancia leída en el espectrofotómetro. El procedimiento se realizó con el objetivo de determinar la concentración de azúcares reductores en la hidrólisis ácida y durante el proceso fermentativo.

Según Burgos (2019) la curva permite expresar la absorbancia en función de la concentración por gramos de glucosa, siendo clave para la cuantificación y monitorización del sustrato durante una fermentación.

#### **2.3.2. Pretratamiento térmico e hidrólisis ácida**

El efecto del pretratamiento térmico antes de la hidrólisis ácida, indicó una mayor liberación de azúcares fermentables con un valor de  $2,102 \pm 0,212$  g/L de glucosa, y por el contrario, al efectuar solamente la hidrólisis ácida presentó un valor de  $1,712 \pm 0,091$  g/L de glucosa, por lo tanto, el hidrolizado empleado en la fermentación fue aquel obtenido por estos dos tratamientos de hidrólisis.

#### **2.3.3. Fermentación alcohólica**

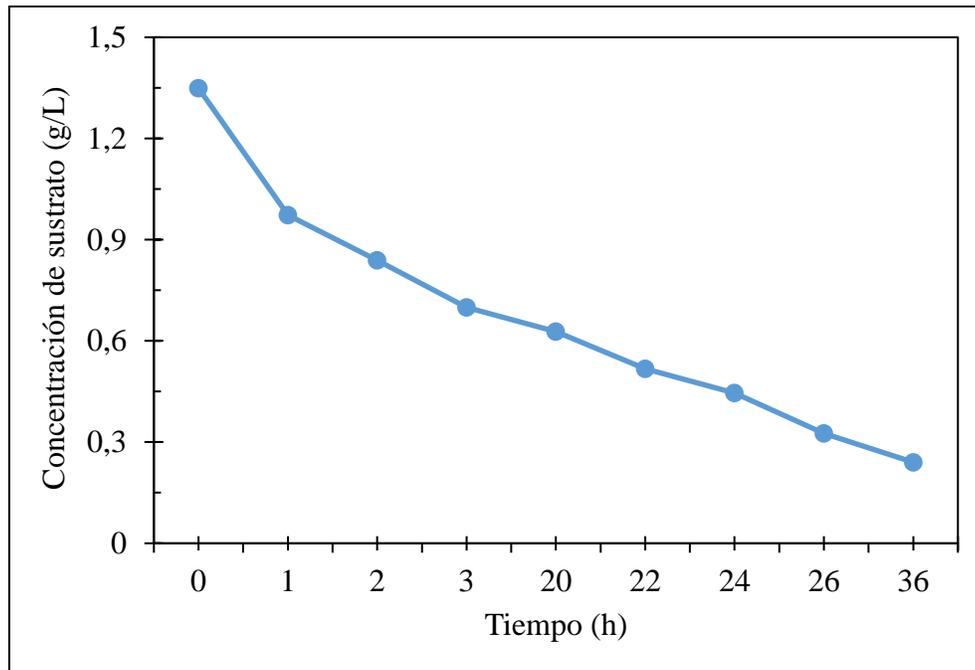
Posterior a la hidrólisis ácida, se obtuvo un pH de 2,16, un nivel extremadamente perjudicial para la levadura *saccharomyces cerevisiae*, por esta razón, se empleó una solución de hidróxido de sodio 0,1 N con el propósito de ajustar el pH a 4,5 que según Llenque-Díaz et al. (2020) el pH para la fermentación debe estar fijado en este valor. Sin embargo, según lo mencionado por Baral, (2016) el pretratamiento de la materia vegetal con sustancias ácidas libera componentes que inhiben el crecimiento microbiano, como lo son el ácido acético, el furfural y el 5-hidroximetil furfural. Compuestos que deben ser retirados en el proceso de la detoxificación donde se emplean

bases como el hidróxido de sodio, potasio y calcio, en consecuencia, se menciona que existe una pérdida significativa de la cantidad de azúcares reductores al aplicar estas bases, es por esta razón que, al momento de determinar las azúcares fermentables en el caldo, se obtuvo un valor de  $1,349 \pm 0,031$  g/L de glucosa el cual se consideró como la concentración de sustrato inicial al comenzar la fermentación.

En la Figura 23, se observa que el consumo de azúcares por parte de las levaduras durante la fermentación fue constante presentando una mayor pendiente al inicio de la fermentación, este alto consumo se evidencia en la producción de alcohol el cual es metabolito asociado al crecimiento celular.

### Figura 23

*Consumo de azúcares durante la fermentación del hidrolizado*



Para la determinación de porcentaje de alcohol se realizó una destilación siguiendo la norma NTC 5113:2022 (Tercera Actualización) – Bebidas Alcohólicas. Métodos Para Determinar El Contenido De Alcohol. De acuerdo a esa norma el porcentaje de etanol fue de 5,4 (% v/v). Este

valor es similar al reportado para fermentaciones con baja concentración de sustrato inicial (Donaires, 2018; Guerra, 2015).

Finalmente, con la Ecuación 8 se encontró que el valor de  $Y_{p/s}$  fue de 48,8%, el cual se encuentra dentro del rango reportado por Bello et al. (2005); Figueroa (2019), con valores entre 34 y 60 %. Las variaciones encontradas en esta investigación se podrían deber a que este rendimiento depende del tipo y pH del sustrato, la cepa empleada, temperatura, entre otras.

### **3. Conclusiones**

Teniendo en cuenta que el rendimiento de aceite esencial no presentó diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, en la presente investigación se seleccionó la metodología de extracción de aceite esencial aprovechando las hojas frescas, ya que cuando se tienen humedades bajas se requiere mayor consumo energético en el proceso de secado y extracción, así como también, se incurre a un mayor tiempo de operación para la obtención del producto. Por lo tanto, el rendimiento del aceite esencial  $0,102\% \pm 0,005\%$  en base seca es indiferente al porcentaje de humedad que contienen las hojas de Eucalipto debido a que se alcanzan rendimientos similares con una diferencia despreciable.

En la cinética de extracción se encontró que la frecuencia apta para la obtención de polifenoles y flavonoides en los residuos hojas de Eucalipto corresponde a 37 kHz permitiendo mejorar la transferencia de masa debido a su influencia en el proceso de cavitación acústica generada durante el proceso. En cuanto al tiempo de proceso, se realizó el análisis hasta los 15 min de extracción, ya que a partir de este punto no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la obtención de polifenoles, que correspondió al componente bioactivo que se logró extraer en mayor cantidad  $6.138,922 \pm 98,313$  mg GAE/100 g FW.

Teniendo en cuenta el diseño experimental realizado, se concluye que el porcentaje de solvente (etanol) 78% y la relación sólido-líquido 52,51 g/mL tienen un efecto positivo en la extracción de componentes bioactivos del Eucalipto. Adicionalmente, la temperatura 30,63 °C muestra un efecto variable, con incrementos en los extremos de temperatura que conducen a un aumento en el TFC, mientras que los valores medios de temperatura pueden disminuir el TFC.

El pretratamiento térmico antes de la hidrólisis ácida resultó en una mayor liberación de azúcares fermentables, con un valor de 2,102 g/L de glucosa  $\pm 0,212$  g/L de glucosa. En contraste, la hidrólisis ácida por sí sola produjo un valor de 1,712 g/L de glucosa  $\pm 0,091$  g/L de glucosa. Por lo tanto, se concluye que el hidrolizado utilizado en la fermentación fue el obtenido mediante ambos tratamientos de hidrólisis con el propósito de aumentar la concentración de azúcares reductores y que el proceso fermentativo se desarrolle de una mejor manera.

Según la norma NTC 5113:2022, el porcentaje de etanol determinado mediante destilación fue de 5,4% (v/v). Este valor es similar a los reportados en fermentaciones con baja concentración de sustrato inicial. Además, se determinó que el valor de Yp/s fue del 48,8%, el cual se encuentra dentro del rango reportado en otros estudios.

El porcentaje de aprovechamiento integral de los residuos generados por la actividad forestal del Eucalipto corresponde a 13,74% en base seca, por lo tanto, se confirma la hipótesis de investigación planteada, puesto que se obtuvo un rendimiento mayor a 10%.

#### **4. Recomendaciones**

Evaluar las diferentes condiciones de operación, como variaciones del tiempo, temperatura, presión, con el fin de optimizar el rendimiento de extracción de AE.

Brindar un aprovechamiento del hidrolato, teniendo en cuenta que puede emplearse en diversos productos cosméticos y aromaterapia.

Los residuos obtenidos de la destilación del alcohol, conocidos como “vinazas” son altamente aprovechables, se recomienda evaluar su aplicación en suplementos alimenticios para animales o en la producción de biofertilizantes.

Explorar la utilización de diversos residuos del Eucalipto, como los frutos y la corteza, en un proceso de extracción secuencial, esta evaluación incluiría la comparación de rendimientos en cada operación con los resultados obtenidos al utilizar las hojas como materia prima principal.

## **Referencias Bibliográficas**

- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., y Kisinza, W. (2021). Chemical composition of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* grown in Tanzania. *Scientific African*, 12, e00758. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00758>
- Amaya, P., y Sandoval, J. (2020). Evaluación de la obtención y uso del aceite esencial de Eucalipto (*Eucalyptus Globulus*) como fungicida. *Fundación Universidad de América*.
- Ávila, E., Perdomo, J., y Guevara, B. (2020). Extracción y caracterización de pectina a partir de residuos de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) por el método de hidrólisis ácida. *Working Papers - ECBTI*.
- Baral, N. (2016). Techno-economic Analysis of Butanol Production through Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. *The Ohio State University*.
- Barisano, D., De Bari, I., Viola, E., Zimbardi, F., y Braccio, G. (2001). State of the art on streaming. *Proceedings of Balisage: The Markup Conference 2008*, 1. <https://doi.org/10.4242/balisagevol1.zergaoui01>
- Bello, D., García, R., Otero, M., y Saura, G. (2005). Fermentación alcohólica con jugo de caña mezclado en Heriberto Duquesne. *ICIDCA*, 39(2), 29–34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120661006>
- Bermúdez, R., García, N., y Murlot, A. (2007). Fermentación sólida para la producción de *Pleurotus SP*. Sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro. *Tecnología Química*, XXVII(2), 55–62.
- Bey-Ould Si Said, Z., Haddadi-Guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Remini, H., Adjaoud, A., Khoudja, N. K., y Madani, K. (2016). Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus*

- fruits. *Industrial Crops and Products*, 89, 167–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.018>
- Burgos, L. (2019). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66.  
<https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Canettieri, E. V., Rocha, G. J. de M., de Carvalho, J. A., y de Almeida e Silva, J. B. (2007). Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 98(2), 422–428.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.012>
- Cedeño, A., Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., y Riera, M. A. (2019). Comparación De Métodos De Destilación Para La Obtención De Aceite Esencial De Eucalipto. *Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*, 6(1), 1–13.  
[https://revistas.up.ac.pa/index.php/revista\\_colon\\_ctn/article/view/472](https://revistas.up.ac.pa/index.php/revista_colon_ctn/article/view/472)
- Chen, Y., Qin, Q., Chen, H., Huang, Q., Song, M., Xiao, S., Cao, L., y Cao, Y. (2023). The anti-proliferative activity and cellular antioxidant activity of oenothien B and its content in different *Eucalyptus* species and region. *Journal of Future Foods*, 3(4), 392–398.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.010>
- Cornejo, P. M. de L. (2016). *Aplicaciones del alcohol etílico*. Boletín Científico UAEH.  
<https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa3/n5/m7.html>
- Coronel, C., y Valdez, J. (2019). *La levadura Saccharomyces cerevisiae: De la Cerveza a la Biología de Sistemas / Bitácora Digital*.  
<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/24262>
- Del Pezo, M., y Loaiza, E. (2016). Determinación de las características físico mecánicas del eucalipto globulus de la zona de Paruro-Cusco con contenido de humedad seco y humedad

- natural evaluados con la norma técnica peruana E.010 para su agrupamiento estructural. *Universidad Andina Del Cusco*.  
<http://repositorio.uandina.edu.pe:8080/xmlui/handle/UAC/345>
- Delgado, J., Sánchez, M., y Bonilla, C. (2016). Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson y *Lippia origanoides* Kunth. *Acta Agronómica*, 65(2), 170–175.
- Donaires, L. (2018). Fermentación del mosto de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) con uso de catalizadores naturales y comerciales para obtener aguardiente. *Universidad Tecnológica de Los Andes*.
- Fernández-Agulló, A., Freire, M. S., y González-Álvarez, J. (2015). Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 64, 105–113.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>
- Festy, D. (2007). *Antioxidantes: Guía Práctica - Danièle Festy*. Google Libros.  
<https://books.google.com.co/books?id=dMe726KbgMgCypg=PA96ydq=polifenolesyhl=esysa=Xyved=2ahUKEwjmtfr93d32AhVcRjABHUIHCb44ChDoAXoECAsQA#v=onepageyq=polifenolesyf=false>
- Figuroa, R. (2019). Efecto de la agitación mecánica en la fermentación alcohólica de extracto de malta. *Universidad de Sonora*.  
<http://repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/3354/1/figuroaacedorubenm.pdf>
- Fuad, F. M., y Don, M. M. (2016). Ultrasonic-assisted extraction of oil from *calophyllum inophyllum* seeds: Optimization of process parameters. *Jurnal Teknologi*, 78(10), 199–206.  
<https://doi.org/10.11113/jt.v78.4946>

Gobernación de Nariño. (2020). *Plan de Desarrollo Departamental. 1*, 534.

González-García, S., Moreira, M. T., y Feijoo, G. (2012). Environmental aspects of eucalyptus based ethanol production and use. *Science of the Total Environment*, 438, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.044>

González, N., Elissetche, J., Pereira, M., y Fernández, K. (2017). Extraction of polyphenols from *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*: Experimental kinetics, modeling and evaluation of their antioxidant and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*, 109(June), 737–745. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.038>

Guerra, A. (2015). Determinación del rendimiento de alcohol en tres variedades de caña (*Saccharum officinarum*) (POJ, Caleña, Cenizosa) mediante la incorporación de tres niveles de levadura (*saccharomyces cerevisiae*). *Universidad Politécnica Estatal Del Carchi, Tesis*.

Gullón, B., Gullón, P., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., y Eibes, G. (2017). Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 108(July), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.014>

Gurieff, N., Højsgaard, S., Nielsen, B., y Rodrigo, J. (2014). Optimización de la eficiencia energética y producción de biogás. *Industria Química*, 44–53. [http://www.veoliawaterst.es/vwst-iberica/ressources/documents/2/37888,Ingenier-aQumica\\_Junio2014.pdf](http://www.veoliawaterst.es/vwst-iberica/ressources/documents/2/37888,Ingenier-aQumica_Junio2014.pdf)

Hernández, C. (2017). Obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de fruta. *Universidad de Oviedo*.

Hernández, R., Rodas, C., Ospina, C., Urrego, J., Godoy, J., y Aristizábal, F. (2006). El Eucalipto. In *Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la*

*producción de madera en la zona andina colombiana* (p. 62). Cenicafé.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación [ICONTEC]. (2022). *Bebidas alcohólicas. Métodos para determinar el contenido de alcohol (NTC 5113:2022)*. <https://tienda.icontec.org/gp-ntc-bebidas-alcoholicas-metodos-para-determinar-el-contenido-de-alcohol-ntc5113-2022.html>

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (2004). *Etanol - Google Libros*. [https://books.google.com.co/books?id=FIr\\_WV7ZrD0Cyprintsec=frontcoverydq=etanolyhl=esysa=Xyredir\\_esc=y#v=onepageyq=etanolyf=false](https://books.google.com.co/books?id=FIr_WV7ZrD0Cyprintsec=frontcoverydq=etanolyhl=esysa=Xyredir_esc=y#v=onepageyq=etanolyf=false)

Jaramillo, J., y Velásquez, D. (2020). Apoyo a la consolidación de las estadísticas de las plantaciones forestales comerciales en el país (2015-2017). *Universidad Distrital Francisco José de Caldas*, 1–96.

Kaur-Bhangu, S., Ashokkumar, M., y Lee, J. (2016). Ultrasound Assisted Crystallization of Paracetamol: Crystal Size Distribution and Polymorph Control. *Crystal Growth and Design*, 16(4), 1934–1941. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01470>

Kumagai, A., Kawamura, S., Lee, S. H., Endo, T., Rodriguez, M., y Mielenz, J. R. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for Hinoki cypress and Eucalyptus after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. *Bioresource Technology*, 162, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.110>

Kumar, K., Srivastav, S., y Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70(May 2020), 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Limam, H., Ben Jemaa, M., Tammar, S., Ksibi, N., Khammassi, S., Jallouli, S., Del Re, G., y Msaada, K. (2020). Variation in chemical profile of leaves essential oils from thirteen

- Tunisian Eucalyptus species and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. *Industrial Crops and Products*, 158(May), 112964. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112964>
- Lipa, F. (2014). Estudio comparativo en el proceso de extracción de aceite esencial de Eucalipto (Eucalipto Glóbulus Labill) mediante el método de destilación por arrastre de vapor y el método de hidrodestilación asistido por microondas. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*.
- Llenque-Díaz, L., Quintana, A., Torres, L., y Segura, R. (2020). Producción de bioetanol a partir de residuos orgánicos vegetales. *Rebiol*, 40(1), 21–29. <https://doi.org/10.17268/rebiol.2020.40.01.03>
- Loaiza, J. M., Alfaro, A., López, F., García, M. T., y García, J. C. (2020). Aprovechamiento integral de Eucalyptus globulus en un esquema de biorrefinería en doble etapa. *Maderas: Ciencia y Tecnología*, 22(1), 93–108. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2020005000109>
- Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., y Duarte, A. P. (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of Eucalyptus globulus and Eucalyptus radiata essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055>
- Martines, E., y Lira, L. (2010). Análisis y aplicación de las expresiones del contenido de humedad en sólidos. *Simposio de Meteorología*, 1–6. <http://cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp01b.pdf>
- McIntosh, S., Palmer, J., Zhang, Z., Doherty, W. O. S., Yazdani, S. S., Sukumaran, R. K., y Vancov, T. (2017). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Eucalyptus grandis under High Solids Loading. *Industrial Biotechnology*, 13(3), 131–140. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0018>

- Miranda, B., y Molina, M. (2015). Evaluación De Factores Que Pueden Influir En El Proceso De Sacarificación-Fermentación Partir De Materiales Amiláceos. *Ingeniería* 25, 25(1), 47–61.
- Montoya, G. de J. (2010). Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero. *Universidad Nacional de Colombia*, 1, 12–174. <http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
- Moreiro, P. (2020). *Eucalipto - Pedro Moreiro López*. Google Libros. [https://books.google.com.co/books?id=YkcPEAAAQBAJyprintsec=frontcoverydq=eucaliptoohl=esysa=Xyredir\\_esc=y#v=onepageyq=eucaliptoof=false](https://books.google.com.co/books?id=YkcPEAAAQBAJyprintsec=frontcoverydq=eucaliptoohl=esysa=Xyredir_esc=y#v=onepageyq=eucaliptoof=false)
- Moreno, J., López, G., y Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*, 1, 147–154. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.05>
- Mota, I., Rodrigues Pinto, P. C., Novo, C., Sousa, G., Guerreiro, O., Guerra, Â. R., Duarte, M. F., y Rodrigues, A. E. (2012). Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: Process optimization and screening for biological activity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(20), 6991–7000. <https://doi.org/10.1021/ie300103z>
- Natividad, J. (2019). Diseño de una planta piloto agroindustrial para la producción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), no convencional, bajo la filosofía “Zero waste.” *Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión*, 1–164. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/3044>
- Nogueira, G. P., McManus, M. C., Leak, D. J., Franco, T. T., Oliveira de Souza Dias, M., y Nakao Cavaliero, C. K. (2021). Are eucalyptus harvest residues a truly burden-free biomass source for bioenergy? A deeper look into biorefinery process design and Life Cycle Assessment. *Journal of Cleaner Production*, 299, 126956. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126956>
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). Vida De Ecosistemas Terrestres: por qué

- es importante. *Sustainable Development Goals*, 2. [https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/wp-content/uploads/sites/3/2016/10/15\\_Spanish\\_Why\\_it\\_Matters.pdf](https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/wp-content/uploads/sites/3/2016/10/15_Spanish_Why_it_Matters.pdf)
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2020). Industria, innovación e infraestructura: por qué es importante. *Sustainable Development Goals*, 40–41. <https://doi.org/10.18356/c70301c4-es>
- Palma, A., Díaz, M. J., Ruiz-Montoya, M., Morales, E., y Giráldez, I. (2021). Ultrasound extraction optimization for bioactive molecules from *Eucalyptus globulus* leaves through antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105654>
- Parada, M. (2017). Estudio del equilibrio de extracción hidrofílico de la corteza de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus*. *Universidad de Concepción*.
- Ponnamma, S., y Manjunath, K. (2012). GC-MS Analysis of phytochemicals in the methanolic extract of *Justicia Wynaadensis* (NEES) T. Anders. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(3), 570–576. [www.ijpbs.net](http://www.ijpbs.net)
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. 27(1), 76–80. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Reyes-Giraldo, A. F., Gutierrez-Montero, D. J., Rojano, B. A., Andrade-Mahecha, M. M., y Martínez-Correa, H. A. (2020). Sequential Extraction Process of Oil and Antioxidant Compounds From *Chontaduro* Epicarp. *Journal of Supercritical Fluids*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105022>
- Roig, A., Meneses, E., y Soto, I. (2018). Estimación de externalidades por la contaminación atmosférica asociada a la quema de bagazo. *Revista Cubana de Meteorología*, 24(0), 385–

395.

<http://rcm.insmet.cu/index.php/rcm/article/view/444/577%0Ahttp://rcm.insmet.cu/index.php/rcm/article/view/444/583%0Ahttp://rcm.insmet.cu/index.php/rcm/article/view/444/590%0Ahttp://rcm.insmet.cu/index.php/rcm/article/view/444>

Romaní, A., Garrote, G., y Parajó, J. C. (2012). Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*, *94*, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.013>

Sarria-Villa, R. A., y Gallo-Corredor, J. A. (2019). El eucalipto como fuente de materia prima para la extracción de aceites esenciales. *Revista de Ciencia e Ingeniería*, *11*(1), 57–64. <https://doi.org/10.46571/jci.2019.1.6>

Schneider, W. D. H., Fontana, R. C., Baudel, H. M., de Siqueira, F. G., Rencoret, J., Gutiérrez, A., de Eugenio, L. I., Prieto, A., Martínez, M. J., Martínez, Á. T., Dillon, A. J. P., y Camassola, M. (2020). Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by on-site manufacturing fungal enzymes to enhance second-generation ethanol yield. *Applied Energy*, *262*(January), 114493. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114493>

Segura, Y., Molina, R., Rodríguez, I., Hülsen, T., Batstone, D., Monsalvo, V., Martínez, F., Melero, J. A., y Puyol, D. (2023). Improvement of biogas production and nitrogen recovery in anaerobic digestion of purple phototrophic bacteria by thermal hydrolysis. *Bioresource Technology*, *367*(September 2022), 128250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128250>

Sepúlveda, C. T., y Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de *Bixa orellana* L. *Información Tecnológica*, *30*(5), 57–66. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000500057>

Sillero, L., Prado, R., Welton, T., y Labidi, J. (2021). Extraction of flavonoid compounds from bark using sustainable deep eutectic solvents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*,

24(October), 100544. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100544>

Soto-García, M., y Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0718-221x2016005000061>

Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., y Zubaidah Sulaiman, S. (2020). An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 778(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/778/1/012165>

Torrenegra, M., Granados, C., y León, G. (2019). Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. *Revista Cubana de Farmacia*, 52(1), 1–12. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2019/rcf191g.pdf>

Vallejo-Castillo, V., Muñoz-Mera, J., Pérez-Bustos, M. F., y Rodríguez-Stouvenel, A. (2020). Recovery of antioxidants from papaya (*Carica papaya* L.) peel and pulp by microwave–assisted extraction. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 85–98. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim593>

Vargas, E. (2019). Caracterización del perfil fenólico y flavonoide de eucalyptos, olea europeae y lippia nodiflora con potencial antioxidante. *Universidad Peruana Unión*, 1–69.

Yang, J., Li, N., Wang, C., Chang, T., y Jiang, H. (2021). Ultrasound-homogenization-assisted extraction of polyphenols from coconut mesocarp: Optimization study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78, 105739. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105739>

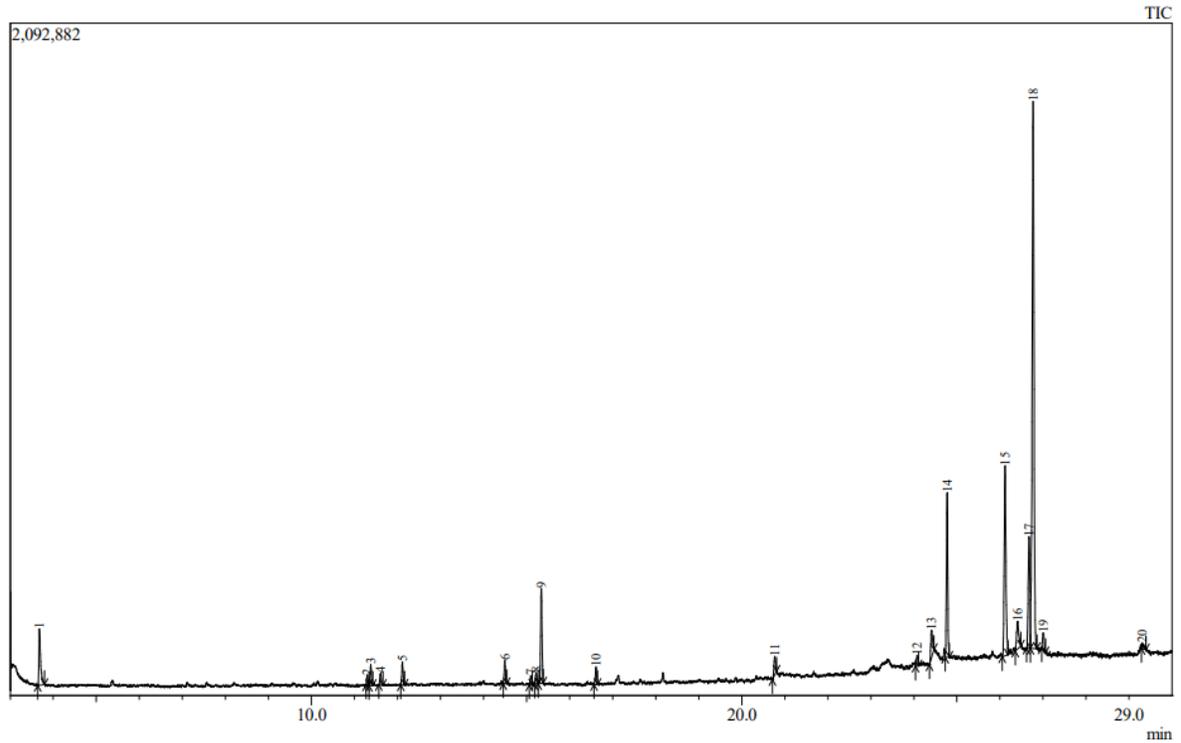
Yang, Q., Huo, D., Han, X., Gu, C., Hou, Q., Zhang, F., Si, C., Liu, Z., y Ni, Y. (2021). Improvement of fermentable sugar recovery and bioethanol production from eucalyptus wood chips with the combined pretreatment of NH<sub>4</sub>Cl impregnation and refining. *Industrial Crops*

*and Products*, 167(April), 113503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113503>

Zhang, M., Zhang, J., Zhang, Y., Sun, J., Prieto, M. A., Simal-gandara, J., Putnik, P., Li, N., y Liu, C. (2023). The link between the phenolic composition and the antioxidant activity in different small berries: A metabolomic approach. *LWT*, 182(May), 114853. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114853>

**Anexos**

Anexo A. Análisis CG-MS del aceite esencial de Eucalipto



Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	3.677	469325	3.91	174431	4.01	Ethane, 1,1-diethoxy- (CAS)
2	11.297	64731	0.54	31709	0.73	dl-Limonene
3	11.379	135454	1.13	65271	1.50	Eucalyptol
4	11.609	86235	0.72	38588	0.89	Benzeneacetaldehyde (CAS)
5	12.114	151787	1.27	71516	1.64	trans Sabinene hydrate
6	14.494	146423	1.22	72657	1.67	Carveol, dihydro-, cis-
7	15.100	58938	0.49	28851	0.66	CIS-(+)-CARVEOL
8	15.222	89787	0.75	34708	0.80	Glutamine-
9	15.343	672180	5.60	294475	6.76	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
10	16.614	122210	1.02	54633	1.25	(-)-8-p-Menthen-2-yl, acetate, trans
11	20.769	157846	1.32	57199	1.31	.alpha.-D-Galactopyranoside, methyl
12	24.076	78358	0.65	32706	0.75	1-Decanol, 2-octyl-
13	24.409	262282	2.19	86381	1.98	n-Hexadecanoic acid
14	24.773	1111470	9.27	512201	11.77	Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)
15	26.118	1678713	14.00	591503	13.59	2-HEXADECEN-1-OL, 3,7,11,15-TETRAMETHYL-
16	26.411	310022	2.58	85577	1.97	11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester
17	26.674	1003638	8.37	347496	7.98	Ethyl linoleate
18	26.771	5192741	43.29	1702361	39.11	ETHYL LINOLEOLATE
19	27.005	144536	1.21	52747	1.21	Octadecanoic acid, ethyl ester
20	29.307	57408	0.48	18279	0.42	Octadecanoic acid, pethyl ester
		11994084	100.00	4353289	100.00	

**Anexo B.** Curva de calibración de glucosa (g/L)

