

Extracción Asistida por Microondas de Aceite Esencial de Clavo de Olor: Evaluación de las Condiciones Operativas para la Óptima Recuperación de Eugenol

Vanina A. Guntero^(1,2), Pedro. M. Mancini⁽¹⁾, Cristián A. Ferretti^(1,3), María N. Kneeteman⁽¹⁾

⁽¹⁾ IQAL (UNL-CONICET), Laboratorio Fester – Química Orgánica, Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina

⁽²⁾ Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501, Córdoba, Argentina

⁽³⁾ INCAPE (UNL-CONICET), N° Km 0, RN168, Santa Fe, Argentina

E-mail de contacto: mkneeteman@fiq.unl.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se ha desarrollado un método de extracción asistida por microondas para obtener el aceite esencial del clavo de olor. El mismo consistió en realizar un diseño experimental ortogonal de 5 factores (temperatura, agitación, tiempo, porcentaje de etanol, relación líquido:sólido) a distintos niveles (5), para evaluar las mejores rendimientos de obtención de aceite esencial, separación de eugenol y del proceso global. Una vez extraído el aceite esencial según las condiciones establecidas, fue caracterizado mediante Cromatografía Gaseosa y Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de masa. El análisis estadístico de la varianza se aplicó para analizar el efecto de cada parámetro. Tanto en el análisis del rendimiento de aceite esencial como el del proceso, el parámetro que ejerce mayor influencia es la temperatura, mientras que en el rendimiento de eugenol lo es la concentración de etanol.

Palabras Claves: aceite esencial; extracción asistida por microondas; eugenol; Taguchi

Abstract

In the present work a microwave assisted extraction method has been developed for obtaining of essential oil from clove. A orthogonal factorial design by 5 factor (temperature, stirring, time, percentage of ethanol, liquid:solid ratio) and different levels (5) was carried out to evaluate the best yield of essential oil, separation of eugenol and global process. Once the essential oil has been extracted according to the established conditions, they were characterized by gas chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry. Statistical analysis of variance was applied to analyze the effect of each parameter. Both, in the analysis of the yield of essential oil and the process, temperature was the most influencing parameter, while in the yield of eugenol was the ethanol concentration.

Keywords: essential oil; microwave-assisted extraction; Eugenol; Taguchi

1. Introducción y Objetivos

Los aceites esenciales (AE) son reconocidos por el elevado interés que presentan en múltiples áreas. Como productos naturales, tienen características fisicoquímicas interesantes con altos valores agregados, Asbahani et al., (2015). El clavo de olor (*Eugenia Caryophyllata*) es una especia perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales, López-Malo, (2013). El aceite esencial aislado de los brotes de *Eugenia Caryophyllata* es ampliamente conocido y utilizado por sus propiedades medicinales, Chaieb et al., (2007). El eugenol es el componente mayoritario de dicho AE y es un fenilpropanoide. Los fenilpropanoides, corresponden a un grupo de metabolitos secundarios de plantas derivados de fenilalanina y tienen cadenas laterales de propenilo unidas a un anillo de fenilo. Estos compuestos son de naturaleza auto-tóxica y desempeñan un papel vital en la comunicación de las plantas, la atracción de polinizadores y la defensa contra herbívoros y otros patógenos, Anand et al. (2016). Muchos de estos metabolitos secundarios tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas y antiinflamatorias, entre otras, cuando se usan en concentraciones adecuadas, Chericoni et al. (2005). El eugenol y sus derivados se usan en materiales dentales para mejorar la bioactividad, como antioxidantes en envases activos y para preparar materiales de poliacrilato, Deng et al. (2015). El eugenol se utiliza también como agente del aromatizantes y/o saborizantes en productos cosméticos y alimenticios, siendo reconocido como seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos, Fujisawa et al. (2002).

La extracción de AE representa el primer paso para obtener el extracto crudo de las plantas. Posteriormente el extracto obtenido debe ser sometido a un análisis e identificación de sus componentes activos, Chan et al., 2011. Los métodos de extracción convencionales tales como, la extracción con solventes, hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, presentan algunas limitaciones como mayor consumo de solventes, energía y tiempo, en comparación con los métodos de extracción verde tal como la extracción asistida por microondas, extracción asistida con fluidos supercríticos y extracción asistida por ultrasonido, Ameer et al. (2017). Debido a ello, la extracción asistida por microondas ha atraído la atención en varios campos de investigación, en particular en la investigación de plantas medicinales, debido a su mecanismo de calentamiento, costo de capital moderado y buen desempeño en condiciones atmosféricas, Chan et al. (2011).

En relación al creciente interés de aplicar procesos industriales que sean amigables con el medio ambiente, el objetivo del presente trabajo es estudiar la extracción de aceite esencial de clavo de olor asistida por microondas, y evaluar en base a las variables experimentales, las condiciones operativas que aseguren la óptima recuperación de eugenol.

2. Metodología

2.1. Materia vegetal

Las muestras de clavo de olor se secaron en estufa a 40 °C hasta pesada constante y luego se molieron en un mortero.

2.2. Extracción de aceite esencial de clavo de olor

Se llevaron a cabo en microondas Anton Para Monowave 300 que tiene como característica que en un experimento permite trabajar con controles de temperatura o potencia. De las dos variables se analizó la temperatura. El rango de variación de la misma fue de 30 a 70 °C, debido a que temperaturas más altas favorecen la degradación de los compuestos extraídos. Con el fin de evitar el riesgo de degradación térmica y oxidación se fijó un tiempo entre 5 y 25 minutos. Otro de los parámetros elegidos fue la agitación, en un rango de 240-1200 rpm. El solvente utilizado fue etanol en soluciones variables (con agua) a concentraciones mayores al 20%. La elección se basó en que el etanol es un buen absorbedor de radiación microondas. El volumen de disolvente se seleccionó de acuerdo con la capacidad volumétrica de las celdas de extracción, que varía entre 6 y 20 ml. La relación solvente/sólido es importante porque asegura un calentamiento homogéneo y efectivo, Zhang et al. (2011), seleccionándose un rango entre 7-19 g/ml.

2.3. Análisis químico de las muestras

Las muestras de AE fueron analizadas por Cromatografía Gaseosa (GC) y Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de masa (GC-MS). El análisis por GC se realizó un equipo Perkin Elmer equipado con un inyector en columna, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar PE-5% (DF: 0.53 µm, ID: 0.55 µm, L: 30 m), usando nitrógeno como gas carrier. Los picos obtenidos inyectando las muestras se identificaron y cuantificaron usando como estándar interno salicilato de metilo, y se determinó el porcentaje de recuperación de Eugenol. Para el análisis de GC-MS, se empleó una columna cromatográfica del tipo HP-5 Factor no polar (DF: 0.25 µm, ID: 0.25 mm, L: 30 m). En ambos casos, el programa de temperatura del horno de la columna fue el siguiente: 80°C (2 min); seguido de un calentamiento hasta 230°C a razón de 6°C/min, manteniéndose a dicha temperatura durante 2 min.

Estos ensayos permitieron identificar los principales picos cromatográficos, y a partir de ellos se obtuvieron sus espectros MS mediante el modo de ionización de impacto electrónico, realizándose la identificación en base a espectros de masa de referencia de la base NIST. Los resultados indicaron que eugenol es el componente mayoritariamente presente en las muestras.

2.4. Cálculo de rendimientos

A partir de los resultados obtenidos de las extracciones y posterior análisis GC y GC-MS, se calculó el rendimiento de extracción de AE, el rendimiento de recuperación de eugenol y el rendimiento del proceso en base a las siguientes expresiones:

$$\text{Rendimiento de AE (\%)} = \frac{\text{masa de AE (g)}}{\text{masa de clavo de olor (g)}} * 100\% \quad (1)$$

$$\text{Rendimiento de Eugenol (\%)} = \frac{\text{masa de eugenol (g)}}{\text{masa de AE (g)}} * 100\% \quad (2)$$

$$\text{Rendimiento del proceso global (\%)} = \frac{\text{masa de eugenol (g)}}{\text{masa de clavo de olor (g)}} * 100\% \quad (3)$$

2.5. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo con un diseño experimental de Taguchi, considerando 5 niveles y 5 factores (L₂₅), tal como se presenta en la Tabla 1. Esta metodología proporciona un conocimiento completo de cada factor y su efecto en los rendimientos. Luego, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para encontrar los factores más y menos influyentes en el proceso a fin de poder tomar decisiones según los objetivos planteados.

Tabla 1. Diseño ortogonal L₂₅

N° de corrida	Factor 1 Temp. (°C)	Factor 2 Agitación (rpm)	Factor 3 Tiempo (min)	Factor 4 Etanol (%)	Factor 5 Relación líquido:sólido (ml/mg)
1	30	240	5	20	7
2		480	10	40	10
3		720	15	60	13
4		960	20	80	16
5		1200	25	100	19
6	40	240	10	60	16
7		480	15	80	19
8		720	20	100	7
9		960	25	20	10
10		1200	5	40	13
11	50	240	15	100	10
12		480	20	20	13
13		720	25	40	16
14		960	5	60	19
15		1200	10	80	7
16	60	240	20	40	19
17		480	25	60	7
18		720	5	80	10
19		960	10	100	13
20		1200	15	20	16
21	70	240	25	80	13
22		480	5	100	16
23		720	10	20	19
24		960	15	40	7
25		1200	20	60	10

3. Resultados y Discusión

A los resultados obtenidos de cada uno de los rendimientos se les calculó la desviación estándar cuadrática media (MSD) y así como también la relación señal a ruido (S/N), Kohli et al., (2018). La Tabla 2 resume los resultados obtenidos para el rendimiento de AE estimados por el modelo, así como también la MSD y la relación S/N, para cada una de las condiciones establecidas según el diseño experimental.

Tabla 2. Rendimientos de AE estimados por el modelo

N° de Corrida	Rendimiento AE (%) Experimental	Rendimiento AE (%) Estimado por el Modelo	MSD	S/N
1	41,96	41,86	1756,45	32,45
2	45,84	45,81	2099,93	33,22
3	39,07	39,17	1530,38	31,85
4	29,27	29,31	857,90	29,33
5	31,00	31,05	962,55	29,83
6	25,26	25,32	639,59	28,06
7	19,02	18,95	360,43	25,57
8	59,65	59,75	3564,09	35,52
9	30,03	30,12	904,51	29,56
10	47,14	46,98	2214,65	33,45
11	55,9	56,13	3137,69	34,97
12	49,67	49,82	2474,57	33,93
13	55,66	55,89	3110,86	34,93
14	52,38	52,97	2774,74	34,43
15	56,12	56,02	3143,85	34,97
16	33,85	33,95	1149,21	30,60
17	44,55	44,18	1968,29	32,94
18	42,85	42,76	1832,27	32,63
19	14,32	14,64	209,70	23,22
20	47,96	48,04	2304,00	33,62
21	19,45	19,79	384,97	25,85
22	22,02	22,42	493,77	26,94
23	58,13	57,99	3370,97	35,28
24	56,47	56,67	3200,17	35,05
25	30,36	30,23	917,79	29,63

En todos los casos los valores de rendimiento de AE estimados por el modelo son cercanos a los obtenidos experimentalmente, lo cual demuestra una buena estimación estadística del modelo. De las relaciones S/N se observa que las corridas 8, 11, 12, 13, 14, 15, 23 y 24 (señaladas en negrita) brindan los valores más altos para los factores evaluados, los cuales se corresponden con los mejores rendimientos de AE obtenidos.

La Tabla 3 muestra el valor total de las relaciones S/N para cada nivel evaluado, lo que teniendo en cuenta sus valores más altos, nos indica que las condiciones óptimas de operación para obtener el mejor rendimiento de AE son: 50 °C, 1200 rpm, 15 min, 40% porcentaje de etanol y 7 ml/mg.

De igual forma se procedió a analizar los rendimientos de eugenol experimentales, los cuales se presentan en la Tabla 4. De las relaciones S/N se observa que las corridas 5 y 22 brindan los mejores valores para los factores considerados, los cuales se corresponden con los mejores rendimientos de eugenol.

La Tabla 5 muestra el valor total de las relaciones S/N para cada nivel evaluado. Los resultados indican que los máximos rendimientos de eugenol se obtienen para las siguientes condiciones experimentales: 30 °C, 480 rpm, 25 min, 100% porcentaje de etanol y 16 ml/mg.

Tabla 3. Proporciones totales S/N correspondientes a los rendimientos de AE

Factor	Niveles					Nivel óptimo
	30	40	50	60	70	
Temperatura (°C)	156,69	152,16	173,24	153,02	152,75	50
	240	480	720	960	1200	
Agitación (rpm)	151,93	152,60	158,14	151,60	161,51	1200
	5	10	15	20	25	
Tiempo (rpm)	159,90	154,75	161,06	159,02	153,12	15
	20	40	60	80	100	
Etanol (%)	164,85	167,26	156,91	148,36	150,47	40
	7	10	13	16	19	
Relación líquido:sólido (ml/mg)	170,93	160,01	148,31	152,88	155,72	7

Tabla 4. Rendimientos de eugenol estimados por el modelo

N° de Corrida	Rendimiento eugenol (%) Experimental	Rendimiento eugenol (%) Estimado por el modelo	MSD	S/N
1	10,4	10,91	113,59	20,55
2	12,42	12,38	153,76	21,87
3	12,67	12,54	158,89	22,01
4	30,34	30,42	922,95	29,65
5	41,52	41,75	1733,49	32,39
6	12,47	12,51	156,00	21,93
7	15,42	15,43	237,93	23,76
8	11,8	11,92	140,66	21,48
9	11,3	11,2	126,57	21,02
10	10	10,09	100,90	20,04
11	14,9	14,98	223,21	23,49
12	11,1	11,33	125,79	21,00
13	11,9	12,05	143,41	21,57
14	12,5	12,76	159,53	22,03
15	10,9	10,87	118,48	20,74
16	11,5	11,69	134,45	21,29

17	17,1	17,45	298,46	24,75
18	14,77	14,53	214,64	23,32
19	10,54	10,68	112,58	20,51
20	11,9	12,1	144,01	21,58
21	17,98	18	323,64	25,10
22	47,51	47,65	2263,86	33,55
23	12,1	12,41	150,21	21,77
24	11,1	11,29	125,34	20,98
25	17,27	17,31	298,94	24,76

Tabla 5. Proporciones totales S/N correspondientes a los rendimientos de eugenol

Factor	Niveles					Nivel óptimo
	30	40	50	60	70	
Temperatura (°C)	30	40	50	60	70	30
	126,47	108,24	108,81	111,45	126,15	
Agitación (rpm)	240	480	720	960	1200	480
	112,36	124,93	110,14	114,20	119,50	
Tiempo (rpm)	5	10	15	20	25	25
	119,49	106,82	111,83	118,17	124,83	
Etanol (%)	20	40	60	80	100	100
	105,92	105,74	115,48	122,57	131,42	
Relación líquido:sólido (ml/mg)	7	10	13	16	19	16
	108,50	114,45	108,66	128,28	121,23	

El análisis de los rendimientos del proceso, se muestran en las Tablas 6 y 7. Del análisis de las relaciones S/N se observa que las corridas 5 y 22 brindan los valores más altos de los rendimientos del proceso, los cuales se corresponden con los mejores rendimientos de eugenol obtenidos experimentalmente.

Tabla 6. Rendimientos del proceso global estimados por el modelo

N° de Corrida	Rendimiento del proceso (%) Experimental	Rendimiento del proceso (%) Estimado por el modelo	MSD	S/N
1	4,36	4,57	19,93	13,00
2	5,69	5,67	32,27	15,09
3	4,95	4,91	24,31	13,86
4	8,88	8,92	79,18	18,99
5	12,87	12,96	166,84	22,22
6	3,15	3,17	9,98	9,99
7	2,93	2,92	8,57	9,33
8	7,04	7,12	50,14	17,00
9	3,39	3,37	11,44	10,58
10	4,71	4,74	22,33	13,49
11	8,33	8,41	70,04	18,45
12	5,51	5,64	31,11	14,93
13	6,62	6,73	44,59	16,49
14	6,55	6,76	44,29	16,46

15	6,12	6,09	37,27	15,71
16	3,89	3,97	15,44	11,89
17	7,62	7,71	58,75	17,69
18	6,33	6,21	39,34	15,95
19	1,51	1,56	2,36	3,73
20	5,71	5,81	33,20	15,21
21	3,50	3,56	12,47	10,96
22	10,46	10,68	111,77	20,48
23	7,03	7,20	50,61	17,04
24	6,27	6,40	40,12	16,03
25	5,24	5,23	27,42	14,38

La Tabla 7 muestra los valores de las relaciones S/N para cada nivel evaluado, de manera que las condiciones óptimas de operación para obtener el mejor rendimiento de eugenol son: 30 °C, 1200 rpm, 5 min, 100% porcentaje de etanol y 16 ml/mg.

Tabla 7. Proporciones totales S/N correspondientes a los rendimientos del proceso global

Factor	Niveles					Nivel óptimo
Temperatura (°C)	30	40	50	60	70	30
	83,15	60,39	82,05	64,47	78,90	
Agitación (rpm)	240	480	720	960	1200	1200
	64,29	77,52	80,34	65,80	81,02	
Tiempo (rpm)	5	10	15	20	25	5
	79,38	61,57	73,89	77,18	77,95	
Concentración de etanol (%)	20	40	60	80	100	100
	70,76	72,99	72,38	70,93	81,90	
Relación líquido:sólido (ml/mg)	7	10	13	16	19	16
	79,44	74,45	56,97	81,16	76,94	

La Tabla 8 muestra el estadístico F; un mayor valor de F indica un mayor efecto en los rendimientos debido a los cambios en los parámetros del proceso. Para el rendimiento de AE, el valor de F más bajo corresponde al tiempo e indica que este factor es el que menos influye en el rendimiento del proceso. Este resultado se corresponde con el obtenido del estudio con las relaciones S/N. También podemos observar que ANOVA predice que la temperatura es la que más influye en este rendimiento, de igual manera que lo señaló el análisis de los valores de las relaciones S/N.

En el caso del rendimiento de eugenol, del análisis ANOVA se observa que el tiempo es el factor menos influyente, mientras que el porcentaje de etanol es el factor que más influye, lo cual es coincidente con el estudio de los valores de las relaciones S/N. Respecto al rendimiento del proceso, se obtuvo que el tiempo es el factor que menos influye mientras que la temperatura es el factor que más influye, y de igual manera que en los casos anteriores esto coincide con los valores de S/N obtenidos.

Tabla 8. Valores de F obtenidos del análisis ANOVA para los rendimientos experimentales

Factores	Rendimiento de AE	Rendimiento de eugenol	Rendimiento del proceso global
Temperatura (°C)	1,60	3,36	1,13
Agitación (rpm)	1,17	1,66	0,56
Tiempo (min)	0,20	1,87	0,47
Etanol (%)	1,00	4,77	0,95
Relación líquido:sólido (ml/mg)	1,26	3,00	0,93

4. Conclusiones

Esta investigación se centró en el estudio del comportamiento de las variables en el proceso de extracción de AE mediante tecnología de microondas. Se realizó el diseño experimental de Taguchi para optimizar los parámetros del proceso. El AE obtenido para cada una de las condiciones se caracterizó a través de GC y GC-MS, permitiendo así determinar el contenido de eugenol. Una vez calculado el rendimiento de AE y de eugenol se procedió a calcular el rendimiento del proceso. Los resultados muestran que los valores de los factores que optimizan el rendimiento de AE son, 50 °C, 1200 rpm, 15 min, 40% de etanol y 7 ml/mg, mientras que los que optimizan el rendimiento de eugenol son 30 °C, 480 rpm, 25 min, 100% de etanol y 16 ml/mg; y son de 30 °C, 1200 rpm, 5 min, 100 % de etanol, 16 ml/mg para el proceso. La elección de una u otra variables óptimas deberá tomarse en función del objetivo de producción. En todos los casos se puede observar que son valores totalmente controlables y atractivos desde el punto de vista de seguridad y eficiencia.

Agradecimientos

- Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (ANCyT) PICT 2014 N° 1587, a la Universidad Nacional del Litoral CAI+D. 2016-2020. PE N° 50420150100056LI. y a la Universidad Tecnológica Nacional por la beca doctoral otorgada, por financiar este trabajo de investigación.

Referencias

Ameer K., Bae S., Jo Y., Lee H., Ameer A., and Kwon J. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling,

Food Chem., 229, 198–207.

Anand A., Jayaramaiah R., Beedkar S., Singh P., Joshi R., Mulani F., Dholakia B., Puneekar S., Gade W., Thulasiram H., and Giri A. (2016). Comparative functional characterization of Eugenol synthase from four different *Ocimum* species: Implications on Eugenol accumulation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1864 (11), 1539–1547.

Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi E., Casabianca, H., Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F., Elaissari A., and Lyon C. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation, *Int. J. Pharm.*, 483, 220–243.

Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Ben Kahla-nakbi A., Mahdouani K., and Bakhrouf A. (2007). The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L . Myrtaceae): A Short Review, *Phyther. Res.*, 506, 501–506, 2007.

Chan C., Yusoff R., Ngoh G. and Kung F. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, *J. Chromatogr. A*, 1218 (37), 6213–6225.

Chericoni S., Prieto J., Iacopini P., Pierluigi C. (2005). In Vitro Activity of the Essential Oil of *Cinnamomum zeylanicum* and Eugenol in Peroxynitrite-Induced Oxidative Processes. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4762–4765.

Deng J., Yang B., Chen C., and Liang J. (2015). Renewable Eugenol-Based Polymeric Oil-Absorbent Microspheres: Preparation and Oil Absorption Ability. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 3, 599–605.

Fujisawa S., Atsumi T., and Kadoma Y. (2002). Antioxidant and prooxidant action of Eugenol-related compounds and their cytotoxicity, *Toxicology*, 177, 39–54.

Kohli H., Gupta S., and Chakraborty M. (2018). Extraction of Ethylparaben by emulsion liquid membrane: Statistical analysis of operating parameters. *Colloids Surfaces A*, 539, 371–381.

López-Malo A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos, *Temas Sel. Ing. los Aliment.*, 7 (2), 35–41.

Zhang H., Yang X., and Wng Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions,” *Trends Food Sci. Technol.*, 22 (12), 672–688.