

# Fermentación de pulpa de naranja y extracción de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata*: aprovechamiento sostenible de residuos agroindustriales en el contexto colombiano

Fermentation of orange pulp and extraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Mentha spicata*: sustainable use of agro-industrial waste in the Colombian context

**Recibido:** 20 de enero de 2025

**Aprobado:** 10 de junio de 2025

**Publicado:** 01 de septiembre de 2025

**Cómo citar:** C. A. Gutiérrez Zapata and M. A. . Celis Calderon, "Fermentación de pulpa de naranja y extracción de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata*: aprovechamiento sostenible de residuos agroindustriales en el contexto colombiano", *Mundo Fesc*, vol. 15, no. 33, pp.454-470 Sep. 2025, doi: 10.61799/2216-0388.1930.

## César Andrés Gutiérrez Zapata\*



Docente tutor,  
cagutierrez@colegio.cafam.edu.co,  
ORCID: 0009-0002-2184-6614,  
Colegio CAFAM, Bogotá, Colombia

## Michael Andrés Celis Calderon\*



Docente tutor y coordinador,  
mcelis@colegio.cafam.edu.co,  
ORCID: 0009-0009-4612- 5064,  
Colegio CAFAM, Bogotá, Colombia

\*Autor para correspondencia:  
cagutierrez@colegio.cafam.edu.co



# Fermentación de pulpa de naranja y extracción de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata*: aprovechamiento sostenible de residuos agroindustriales en el contexto colombiano

**Palabras clave:** Aceites esenciales industriales, Bioetanol anaeróbico, Biomasa cítrica.

## Resumen

La valorización de residuos cítricos y aromáticos mediante biotecnología constituye una alternativa sostenible para generar bioproductos de interés industrial en el contexto colombiano, donde los residuos del procesamiento de cítricos pueden representar hasta el 70 % de la masa del fruto y coexistir con biomasa vegetal rica en compuestos volátiles. El objetivo de este estudio fue evaluar dos rutas de aprovechamiento integral de residuos: la producción de etanol mediante fermentación anaerobia con *Saccharomyces cerevisiae* en pulpas de naranja condiferente estado de madurez y la extracción de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata* por arrastre de vapor. Metodológicamente, se procesaron dos tipos de pulpa, fresca y muy madura, sometidas a pasteurización controlada a 80 °C durante 15 min, inoculación con levadura comercial y fermentación en anaerobiosis pasiva durante 7 días; de forma paralela, los aceites esenciales se obtuvieron por destilación por arrastre de vapor en micro-lotes de hojas oreadas de 20-22 g durante 60 min, seguida de caracterización fisicoquímica y pruebas cualitativas. Los resultados mostraron que la pulpa fresca alcanzó 2.1 mL de etanol experimental, equivalente al 72 % de la eficiencia teórica, mientras que la pulpa muy madura produjo 0.7 mL, equivalente al 24 %, evidenciando el efecto del estado de la biomasa sobre la conversión fermentativa; además, los aceites esenciales presentaron rendimientos de 1.75 % para eucalipto y 1.5 % para hierbabuena, con densidades de 0.89 y 0.85 g/mL, respectivamente. Se concluye que el estado fisicoquímico de la pulpa cítrica condiciona de manera decisiva la eficiencia en la producción de etanol y que la extracción de aceites esenciales en micro-lotes es una estrategia técnicamente viable para la valorización de residuos agroindustriales y vegetales en escenarios educativos y de sostenibilidad.

# Fermentación de pulpa de naranja y extracción de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata*: aprovechamiento sostenible de residuos agroindustriales en el contexto colombiano

## Abstract

essential oil extraction from *Eucalyptus globulus* and *Mentha spicata* by steam distillation. Methodologically, two pulp types, fresh and overripe, were processed under controlled pasteurization at 80 °C for 15 min, inoculated with commercial yeast, and fermented under passive anaerobiosis for 7 days; in parallel, essential oils were obtained by steam distillation in micro-batches of 20-22 g of partially dried leaves for 60 min, followed by physicochemical characterization and qualitative testing. Results showed that fresh pulp reached 2.1 mL of experimental ethanol, equivalent to 72% theoretical efficiency, whereas overripe pulp produced 0.7 mL, equivalent to 24%, demonstrating the effect of biomass condition on fermentative conversion; additionally, essential oils yielded 1.75% for eucalyptus and 1.5% for spearmint, with densities of 0.89 and 0.85 g/mL, respectively. It is concluded that the physicochemical state of citrus pulp decisively conditions ethanol production efficiency and that essential oil extraction in micro-batches is a technically viable strategy for valorizing agro-industrial and plant residues in educational and sustainability-oriented settings.

**Keywords:** Anaerobic bioethanol, Citrus biomass, Industrial essential volatile oils.

## Introducción

La transición global hacia modelos de producción más sostenibles ha impulsado el desarrollo de estrategias de economía circular y biorrefinería, donde los residuos agroindustriales dejan de ser considerados desechos y se reconocen como materias primas con alto valor agregado potencial [1]. En este contexto, la biomasa cítrica ocupa un lugar central: la producción mundial de cítricos supera los 160 millones de toneladas anuales, de las cuales una fracción relevante se procesa para jugos, néctares y concentrados, generando grandes volúmenes de pulpa, cáscara y semillas como subproductos ricos en azúcares, fibras y compuestos bioactivos [1].

En países productores como Colombia, los residuos derivados del procesamiento de naranja pueden representar hasta el 50-70% de la masa total del fruto, dependiendo del tipo de proceso y del grado de industrialización [2]. Estos residuos presentan un alto contenido de humedad, pH ácido y una composición dominada por carbohidratos fermentables, pectinas y fibras estructurales, lo que los hace particularmente susceptibles a la fermentación microbiana. Cuando no se valorizan adecuadamente, se disponen en vertederos o se acumulan en zonas de procesamiento, contribuyendo a la generación de lixiviados, emisión de gases de efecto invernadero y problemas sanitarios por proliferación de vectores biológicos [2].

La biotecnología de residuos ofrece alternativas para transformar este problema en oportunidad, mediante la producción de bioetanol, ácidos orgánicos, enzimas, pectinas y otros bioproductos [2]. En particular, la fermentación anaeróbica con levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser una ruta eficiente para convertir azúcares simples en etanol, siempre que se controlen variables como pH, temperatura, estado de la biomasa y presencia de inhibidores [2,3,21]. El estado de madurez del sustrato es determinante: la pulpa sobre madura o en descomposición presenta mayor carga microbiana inicial, degradación de azúcares y acumulación de metabolitos secundarios que pueden disminuir la eficiencia fermentativa y aumentar la formación de ácidos u otros compuestos no deseados [2,11].

De manera complementaria, el aprovechamiento de plantas aromáticas mediante extracción de aceites esenciales se ha consolidado como una línea de alto interés en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y de bioprocesos. El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se caracteriza por su elevada proporción de 1,8-cineol (eucaliptol), acompañado de  $\alpha$ -pineno, limoneno y otros monoterpenos oxigenados, con propiedades antimicrobianas, expectorantes y antioxidantes ampliamente reportadas [4,6]. En el caso de *Mentha spicata*, el perfil químico suele estar dominado por carvona, mentol, mentona y limoneno, responsables de sus características sensoriales mentoladas y de su actividad biológica [5].

La destilación por arrastre de vapor es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de aceites esenciales, y puede adaptarse a micro-lotes en el contexto escolar sin perder

su fundamento científico ni su rigurosidad [9]. En micro-lotes de 20-22 g de hojas frescas, el control de variables como el tamaño de partícula, la temperatura del vapor, el tiempo de destilación y la condensación rápida permite obtener rendimientos representativos de los perfiles volátiles reales, al tiempo que se minimiza la degradación térmica de los compuestos más sensibles [10]. La caracterización fisicoquímica básica de los aceites (densidad, solubilidad, índice de refracción) y las pruebas cualitativas (decoloración de  $\text{KMnO}_4$  y bromo, reacción con  $\text{FeCl}_3$ ) aportan evidencias experimentales coherentes con la presencia de terpenos oxigenados, fenoles trazas y otros compuestos aromáticos no polares [7].

El presente trabajo se enmarca en este enfoque de biorrefinería, trabajando en tres propósitos fundamentales: validar y analizar si el estado de la pulpa de naranja fresca y sobre madura pasteurizadas, usando *Saccharomyces cerevisiae*, afecta la conversión experimental esperada a etanol en fermentación anaeróbica; extraer y caracterizar aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor en micro-lotes, midiendo solubilidad, densidad, índice de refracción, reactividad y pureza por gravimetría; y aportar información técnica y académica que permita escalar estos procesos hacia modelos productivos reales basados en sostenibilidad y economía circular.

## Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló bajo un enfoque experimental orientado al aprovechamiento sostenible de residuos agroindustriales mediante procesos de fermentación y extracción de aceites esenciales. Se seleccionaron las materias primas y los métodos en función de su disponibilidad, viabilidad técnica y pertinencia para validar la hipótesis de valorización integral de biomasa residual.

### *Fermentación anaerobia de pulpa de naranja*

Se seleccionaron dos tipos de pulpa de naranja: pulpa fresca (PF) sin olor ácido intenso ni presencia visible de mohos, y pulpa muy madura (PM) con signos de sobre maduración, cambio de olor y textura. Se emplearon 50 g de pulpa homogeneizada en 200 mL de agua destilada para cada tratamiento. Ambas se pasteurizaron en sistema cerrado por 15 min a  $80^\circ\text{C}$ , en recipientes cerrados, con el fin de reducir la carga microbiana inicial en  $>99.9\%$  según literatura para tratamientos térmicos similares [18] y bajo criterios de inocuidad alimentaria aplicables al manejo experimental de materias primas [8], mejorando la higiene del sustrato sin alcanzar esterilización completa. Es importante señalar que este tratamiento

térmico inactiva eficientemente microorganismos mesófilos, aunque no elimina esporas termorresistentes ni volatiliza completamente d-limoneno (punto de ebullición  $\sim 176^\circ\text{C}$ ), aceite esencial naturalmente presente en cáscara cítrica que puede actuar como inhibidor metabólico a concentraciones  $>0.14\%$  v/v [11].

Posteriormente, se inoculó *Saccharomyces cerevisiae* (levadura comercial de panadería, 5 g en 50 mL de agua tibia pre-activada durante 15 min, equivalente a  $\sim 10^7$  UFC/mL) en condiciones controladas, en recipientes cerrados herméticamente provistos de válvula para permitir escape de CO<sub>2</sub> sin entrada de oxígeno, para mantener anaerobiosis pasiva controlada. La fermentación se llevó a cabo durante 7 días, a temperatura ambiente controlada ( $25 \pm 1.5^\circ\text{C}$ , monitoreada diariamente con termómetro digital). Algunas otras condiciones fueron: humedad relativa interna de 60-70%, y pH inicial ajustado de 4.5-5.5 mediante solución tampón de ácido cítrico 0.1 M / citrato de sodio 0.1 M.

Al final del periodo, se registró: contenido de azúcares reductores totales (TRS) inicial y final mediante refractometría (°Brix); volumen de etanol experimental (mL) obtenido mediante destilación fraccionada simple a 78°C y recolección del destilado en probeta graduada; pH final de cada fermentado (medido con pHmetro digital); características organolépticas (olor alcohólico, olor ácido); y concentración aproximada de etanol mediante densimetría del destilado.

Cálculo de rendimiento teórico: El etanol teórico se calculó asumiendo estequiometría de Gay-Lussac ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{CO}_2$ ), con rendimiento másico de 0.511 g etanol/g azúcar y densidad de etanol de 0.789 g/mL a 20°C [15]. Debido a limitaciones instrumentales, no se cuantificó directamente el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa individuales, por lo que los valores teóricos se estimaron a partir de °Brix promedio de pulpa cítrica fresca (10-12%) reportado en literatura [19].

### ***Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor***

Se emplearon como materias primas hojas frescas de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Mentha spicata* (hierbabuena), recolectadas manualmente en condiciones controladas de higiene. Las hojas fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 24 h para eliminar impurezas superficiales y exceso de humedad externa, reduciendo el contenido de agua de  $\sim 70\%$  (hojas recién cortadas) a  $\sim 50\text{-}60\%$  (hojas secas). Posteriormente se trocearon en segmentos de 1-1.5 cm.

Para cada tipo de planta se realizaron micro-lotes de 20-22 g de hojas secas en 5 réplicas, sometidos a destilación por arrastre de vapor y temperatura de operación 98-100°C durante 60 minutos. Este tiempo de destilación se seleccionó considerando estudios previos que reportan extracción  $>90\%$  del aceite total en 60-80 min para hojas de eucalipto y menta en micro-lotes [13]. Los vapores condensados se recopilaron mediante condensación refrigerado con agua fría (15-18°C) y se dejaron decantar en embudos separadores, durante 2 horas a temperatura ambiente, observándose dos fases líquidas claramente diferenciadas: fase superior orgánica (aceite esencial) y fase inferior acuosa (hidrolato).

La fase orgánica se separó cuidadosamente mediante drenaje de la fase acuosa inferior, sin secado adicional con agentes desecantes y se almacenó en frascos ámbar a 4°C hasta su análisis, para evitar oxidación y pérdida de compuestos volátiles. El rendimiento

se expresó como porcentaje masa/masa (% m/m) respecto a la masa de hoja seca inicial, según normativa ISO 9235:2013 para aceites esenciales.

### **Análisis fisicoquímico y cualitativo de los aceites**

Se realizaron los siguientes análisis:

- Rendimiento (% m/m): Calculado según la fórmula siguiente y conforme a normativa ISO 9235:2013 para aceites esenciales.

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{masa de aceite esencial}}{\text{masa de hoja seca}} \times 100$$

- Densidad (g/mL): mediante la relación masa/volumen, utilizando picnometría a  $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  para aceites esenciales comerciales (precisión  $\pm 0.001$  g/mL) y balanza analítica (precisión  $\pm 0.001$  g). Se registró la temperatura ambiente ( $22\text{-}24^\circ\text{C}$ ) durante la medición.
- Índice de refracción (RI): medido con refractómetro manual tipo Abbe a temperatura ambiente ( $22\text{-}24^\circ\text{C}$ ). Se reporta el valor promedio de tres lecturas independientes. Nota: El estándar ISO especifica medición a  $20.0^\circ\text{C}$ , pero variaciones de temperatura de  $\pm 3\text{-}4^\circ\text{C}$  pueden alterar el RI en aproximadamente 0.001-0.002 unidades (coeficiente térmico  $\sim 0.0004/^\circ\text{C}$  para aceites esenciales).
- Solubilidad: ensayos de solubilidad en agua, etanol 70%, éter, éter de petróleo y acetona, mediante adición de 0.1 mL de aceite esencial a 2 mL de cada solvente, con agitación vigorosa durante 30 segundos y observación visual de miscibilidad o separación de fases. Pruebas cualitativas: decoloración de  $\text{KMnO}_4$  y bromo (indicativa de insaturaciones presentes en terpenos y terpenoides); y formación de color violeta con  $\text{FeCl}_3$  (indicativa de fenoles o compuestos aromáticos oxigenados).

Análisis gravimétrico de las fracciones obtenidas por arrastre de vapor: A partir de 5 réplicas, se registraron los siguientes parámetros:  $m$  total (extracto crudo),  $m$  org (capa orgánica), y  $m$  ac (capa acuosa/impurezas). Estos datos se utilizaron para estimar la pureza gravimétrica aproximada de la fracción orgánica.

## **Resultados**

### **Resultados de la fermentación anaerobia**

Tras el periodo de fermentación, los resultados comparativos entre pulpa fresca (PF) y pulpa muy madura (PM) fueron registrados.

**Tabla I:** Condiciones y resultados de la fermentación anaerobia de pulpa de naranja fresca y muy madura

Parámetro	Fresca (PF)	Muy madura (PM)
Etanol teórico máx (ambas)	2.8 mL	2.8 mL
Etanol experimental (100%)	2.1 mL	0.7 mL
pH promedio final del fermentado	3.2	2.5
Olor	alcohólico suave	alcohol + ácido
Necesidad de purificación extra	Baja	Alta
Comportamiento en refractómetro	1.26 (estable)	1.24 (variable)

Estos datos sugieren que, aunque ambas pulpas podrían alcanzar el mismo volumen máximo de etanol (2.8 mL en condiciones ideales), la pulpa fresca exhibe una mayor eficiencia fermentativa esperada. Por el contrario, la pulpa muy madura tiende a generar un medio más ácido, lo que puede aumentar la demanda de purificación y tratamiento posterior del etanol obtenido.

### **Resultados de la extracción de aceites esenciales**

Los micro-lotes de eucalipto y hierbabuena proporcionaron los resultados presentados a continuación.

**Tabla II:** Propiedades fisicoquímicas y cualitativas de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Mentha spicata* obtenidos por arrastre de vapor en micro-lotes

Parámetro	Hierbabuena	Eucalipto
Rendimiento (% m/m)	1.5 %	1.75 %
Densidad (g/mL)	0.85	0.89
Índice de refracción (RI)	1.460	1.460
Solubilidad en agua	No soluble	No soluble
Solubilidad en éter / éter petróleo	Alta	Alta
Solubilidad en acetona	Alta	Alta
Solubilidad en etanol 70 %	Moderada	Moderada
Decoloración KMnO <sub>4</sub> / bromo	< 60 s	< 60 s
Viraje violeta con FeCl <sub>3</sub>	Positivo	Positivo

Los valores de densidad y RI son consistentes con aceites esenciales constituidos principalmente por terpenos y terpenoides oxigenados.

### **Resultados gravimétricos de pureza**

Para las 5 réplicas, se registraron los siguientes resultados.

**Tabla III:** Resultados gravimétricos de las fracciones orgánica y acuosa de los extractos de aceites esenciales y estimación de la pureza del aceite esencial seco

Parámetro	Por réplica (g)	Promedio 5 réplicas (g)
<i>m</i> total (extracto crudo)	0.1800	0.901
<i>m</i> org (capa orgánica)	0.1638	0.819
<i>m</i> ac (capa acuosa/impurezas)	0.01638	0.0819
Aceite esencial seco real (≈ 90 % del org.)	0.1474	0.737

Como se observa en la Tabla III, la masa de extracto crudo y la masa asignada a la fase orgánica fueron dominantes frente a la fase acuosa, y da una estimación de alrededor del 90% de que la fase orgánica corresponde a aceite esencial seco, lo cual sugiere una pureza gravimétrica elevada para las condiciones de micro-lote empleadas.

## Discusión

### *Interpretación de la fermentación y eficiencia de la biomasa*

Estos resultados son consistentes con reportes previos sobre fermentación de residuos cítricos y sobre el efecto del pretratamiento del residuo en la obtención de etanol [3,21]. La comparación entre la pulpa fresca (PF) y la pulpa muy madura (PM) confirma que el estado de madurez de la biomasa cítrica influye directamente en la eficiencia fermentativa. Considerando un contenido estimado de azúcares fermentables de 10% p/p en pulpa fresca (equivalente a 5 g de azúcar en 50 g de pulpa), la estequiometría de Gay-Lussac predice un rendimiento teórico de 0.511 g etanol/g azúcar, lo que equivale a 2.56 g de etanol o 3.24 mL a 100% de eficiencia [15]. Asumiendo una eficiencia de conversión industrial típica de 85-90% [16], el volumen esperado sería ~2.9 mL. La pulpa fresca alcanzó un etanol experimental de 2.1 mL (72% del teórico a 90% de eficiencia), mientras que la pulpa muy madura solo alcanzó 0.7 mL (24% del teórico a 90% de eficiencia).

$$\eta = \frac{\text{Etanol experimental}}{\text{Etanol teórico máximo}} \times 100$$

$$\text{se obtienen: } \eta_{PF} \approx \frac{2.1}{2.9} \times 100 \approx 72\% \text{ y } \eta_{PM} \approx \frac{0.7}{2.9} \times 100 \approx 24\%.$$

Esta diferencia de 67% en rendimiento volumétrico puede explicarse por varios factores interrelacionados, validados por literatura científica reciente:

1. Degradación previa de azúcares fermentables: En la pulpa muy madura, parte de los azúcares puede haber sido consumida por microorganismos presentes antes de la pasteurización, reduciendo el sustrato disponible para *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque este estudio no cuantificó directamente los azúcares reductores totales (TRS) mediante métodos analíticos como HPLC o DNS, la literatura reporta que el contenido

de azúcar en pulpa cítrica puede disminuir 30-50% durante la sobremaduración por actividad microbiana endógena y procesos de senescencia celular [19]. Esta hipótesis requiere validación experimental mediante cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa individuales en futuros estudios.

2. Formación de compuestos inhibitorios: Durante la descomposición, pueden generarse múltiples metabolitos que dificultan el crecimiento y la actividad de la levadura. En particular, d-limoneno, aceite esencial naturalmente presente en cáscara de naranja (0.3-0.9% p/p), es un inhibidor documentado de *S. cerevisiae* y otras levaduras a concentraciones finales  $\geq 0.14\%$  v/v, actuando mediante despolarización de membrana celular, alteración metabólica y reducción de la síntesis de ATP [11,12]. Aunque la pasteurización a 80°C reduce la carga microbiana en >99.9%, no volatiliza eficientemente d-limoneno (punto de ebullición  $\sim 176^\circ\text{C}$ ), por lo que este compuesto puede acumularse durante la sobremaduración por ruptura de glándulas oleíferas en la cáscara. Adicionalmente, la fermentación espontánea pre-pasteurización puede generar ácidos orgánicos como ácido láctico (típicamente 3-4 g/L) y ácido acético (0.1-0.5 g/L), responsables de la acidificación del medio [20]. Sin embargo, este estudio no cuantificó d-limoneno, ácido láctico o ácido acético mediante técnicas cromatográficas (GC-MS, HPLC), por lo que la contribución relativa de cada inhibidor potencial permanece como hipótesis no validada experimentalmente.

3. Cambios en el pH y estrés ácido: El pH final de 2.5 en la pulpa muy madura está significativamente por debajo del rango óptimo para *S. cerevisiae* (4.5-5.5) y se aproxima a valores inhibitorios documentados en la literatura. Estudios recientes de fermentación de residuos de frutas demuestran que pH <3.0 genera estrés ácido que ralentiza el metabolismo celular, favorece rutas metabólicas alternativas y puede reducir la producción de etanol en 40-60% respecto al óptimo [14]. A pH 2.5, la forma protonada de ácidos orgánicos (RCOOH) atraviesa libremente la membrana celular; una vez dentro del citoplasma (pH neutro  $\sim 7.0$ ), se disocia liberando  $\text{H}^+$ , lo cual acidifica el interior celular y obliga a la levadura a activar ATPasas de protones para expulsar  $\text{H}^+$ , con el consecuente gasto energético que reduce el crecimiento y la eficiencia fermentativa. El pH final de 3.2 en la pulpa fresca, aunque ácido, se encuentra dentro del rango tolerable, lo cual explica parcialmente la diferencia de rendimiento observada.

El comportamiento en el refractómetro (1.26 estable para PF y 1.24 variable para PM) refuerza esta interpretación: en PF, el sistema parece evolucionar hacia un equilibrio más uniforme entre azúcares residuales y alcohol producido, mientras que en PM la presencia heterogénea de subproductos fermentativos y posibles coloides puede introducir variaciones en la lectura óptica.

Limitaciones del presente estudio: Las limitaciones que presentó el estudio es que no se realizó cuantificación directa de azúcares reductores iniciales y finales (glucosa, fructosa, sacarosa); d-limoneno residual post-pasteurización; ácidos orgánicos (láctico, acético, cítrico); y concentración volumétrica de etanol en el fermentado. Por tanto, las eficiencias fermentativas reportadas (72% y 24%) son estimativas basadas en volumen de destilado

recuperado y requieren validación mediante técnicas instrumentales (GC-FID, HPLC-RID, densimetría precisa) en futuros estudios. No obstante, estos resultados son coherentes con lo reportado en la literatura, donde la fermentación de residuos cítricos requiere un control riguroso del estado de la biomasa, del pH y de la presencia de inhibidores para alcanzar rendimientos óptimos de bioetanol [2,3].

### ***Interpretación de la extracción de aceites esenciales***

Los rendimientos de aceites esenciales obtenidos (1.75% para eucalipto y 1.5% para hierbabuena) se sitúan en el rango alto pero plausible al compararse con valores reportados para procesos industriales a mayor escala y estudios académicos recientes. Un estudio de 2024 sobre extracción de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* por destilación a vapor reporta rendimientos de 1.28-1.30% para hojas frescas con 65% de humedad (80 min de destilación) y 2.20-2.34% para hojas semi-secas con 35% de humedad, demostrando una relación lineal inversa entre contenido de agua y rendimiento de aceite [13].

Para *Mentha spicata*, la literatura industrial reporta rendimientos de 0.5-0.8% en hojas frescas con destilación de 2 horas, aunque estudios académicos documentan variabilidad de 0.20-2.60% dependiendo del contenido de aceite esencial en materia seca, condiciones de cultivo y método de extracción [17].

Los rendimientos obtenidos en este estudio (1.75% eucalipto, 1.5% hierbabuena) son consistentes con hojas parcialmente secas (50-60% humedad estimada), lo cual es coherente con el protocolo empleado (24 h de secado a temperatura ambiente). Esta diferencia respecto a procesos industriales puede explicarse por: el uso de hojas secas y troceadas homogéneamente (tamaño de partícula 1-1.5 cm, lo cual aumenta la superficie de contacto y facilita la ruptura de glándulas secretoras); el pequeño tamaño de los micro-lotes (20-22 g), que facilita la transferencia de masa durante el arrastre de vapor al reducir resistencias difusionales y gradientes de temperatura en el lecho vegetal; y una condensación rápida y eficiente mediante refrigeración con agua fría (15-18°C) que reduce la pérdida de compuestos volátiles más ligeros (monoterpenos de bajo punto de ebullición como  $\alpha$ - pineno, limoneno).

### ***Propiedades fisicoquímicas y comparación con estándares internacionales***

Las densidades medidas (0.89 g/mL para eucalipto y 0.85 g/mL para hierbabuena) muestran desviaciones respecto a estándares internacionales: la norma ISO 3033:1988 específica para *Mentha spicata* una densidad relativa de 0.920-0.937 g/mL a 20°C, mientras que la literatura para *Eucalyptus globulus* reporta 0.905-0.925 g/mL a 20°C [13]. Los valores obtenidos están 1.5-3.8% por debajo para eucalipto y 7.6-9.3% por debajo para hierbabuena respecto a los rangos esperados.

De manera similar, el índice de refracción medido (1.460 para ambos aceites) está por debajo de los valores estándar: ISO 3033:1988 establece para *M. spicata* un RI de 1.4850-1.4910 a 20°C, mientras que *E. globulus* típicamente presenta RI de 1.458-1.470 a 20°C. El

hecho de que ambos aceites reporten RI idéntico (1.460) es estadísticamente improbable dado que sus composiciones fitoquímicas difieren sustancialmente (eucaliptol vs carvona como componentes mayoritarios), lo cual sugiere posibles limitaciones instrumentales.

Estas discrepancias pueden atribuirse a varios factores metodológicos: temperatura de medición no estándar (las mediciones se realizaron a temperatura ambiente de 22-24°C en lugar del estándar internacional de  $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , el coeficiente térmico para aceites esenciales es aproximadamente 0.0004 unidades de RI/°C y 0.0007 g/mL por °C para densidad, lo cual podría explicar parcialmente las desviaciones observadas); presencia de agua residual (la separación de fases se realizó sin secado adicional con agentes desecantes, el agua residual disuelta o emulsificada en la fase orgánica puede diluir los valores

fisicoquímicos del aceite puro, una presencia de 2-5% de agua residual podría reducir la densidad aparente en 0.01-0.05 g/mL y el RI en 0.003-0.008 unidades); y limitaciones del refractómetro manual (los refractómetros tipo Abbe manuales tienen precisión típica de  $\pm 0.001-0.002$  unidades de RI y requieren calibración frecuente con estándares certificados).

Por otro lado, la solubilidad alta en éter, éter de petróleo y acetona, junto con la baja solubilidad en agua y la solubilidad moderada en etanol 70%, refuerzan la idea de que los compuestos principales son no polares o semipolares, compatibles con la naturaleza terpenoide de los aceites esenciales.

A pesar de estas limitaciones, los datos fisicoquímicos y sensoriales indican que se trata de fracciones predominantemente orgánicas, con características cualitativas compatibles con aceites esenciales terpenoides: solubilidad alta en solventes no polares (éter, éter de petróleo, acetona), baja solubilidad en agua, solubilidad moderada en etanol 70%, lo cual es consistente con la naturaleza lipofílica de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados [6]. Aunque no se realizó cromatografía en capa fina (TLC) ni espectrometría de masas (GC-MS) en esta etapa, los valores de densidad y RI, aunque desviados de estándares comerciales, son coherentes con aceites esenciales crudos obtenidos en condiciones de laboratorio educativo.

Recomendaciones para futuros estudios: Para alcanzar caracterización fisicoquímica conforme a normas internacionales, se sugiere: secado de la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro para eliminar agua residual; medición a temperatura controlada de  $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  mediante baño termostático; uso de picnometría calibrada para densidad; refractómetro digital con compensación automática de temperatura; y validación cromatográfica (GC-MS, HPLC) de perfiles fitoquímicos para confirmar la presencia de 1,8-cineol, carvona y otros componentes reportados en literatura para estas especies vegetales.

### **Significado de las pruebas cualitativas**

Las pruebas con  $\text{KMnO}_4$  y bromo mostraron decoloración en menos de 60 segundos, lo que indica la presencia de compuestos con capacidad reductora (por ejemplo, dobles enlaces en monoterpenos y sesquiterpenos) que reaccionan rápidamente con estos agentes oxidantes. Este comportamiento es típico de aceites esenciales ricos en terpenos insaturados.

Por otro lado, la formación de un complejo violeta al reaccionar con  $\text{FeCl}_3$  sugiere la existencia de fenoles o compuestos aromáticos oxigenados en concentraciones trazas, lo cual es coherente con la presencia de ciertos fenilpropanoides y otros compuestos minoritarios que suelen acompañar a los terpenos dominantes en aceites esenciales.

La combinación de estos resultados cualitativos con los datos de densidad, RI y solubilidad permite construir un perfil inicial razonablemente sólido de los aceites extraídos, aun sin disponer todavía de análisis cromatográficos detallados.

### **Análisis gravimétrico y fracción orgánica**

Los datos gravimétricos muestran que la masa del extracto crudo ( $m_{\text{total}}$ ) y la masa asignada a la fase orgánica ( $m_{\text{org}}$ ) son claramente dominantes frente a la masa de la fase acuosa ( $m_{\text{ac}}$ ), con una relación orgánica:acuosa aproximada de 9:1. La estimación de que alrededor del 90% de la fase orgánica corresponde a aceite esencial seco sugiere que la mayor parte de los compuestos presentes en esa fracción son volátiles lipofílicos propios de los aceites esenciales, mientras que las impurezas polares quedan retenidas en la fase acuosa.

Desde el punto de vista de análisis de pureza, esto indica que los micro-lotes obtenidos son adecuados para usos experimentales en laboratorio a pequeña escala, y constituyen una buena base para una futura caracterización fitoquímica más detallada mediante TLC u otras técnicas instrumentales (HPTLC, GC-MS, etc.).

## **Conclusiones**

El grado de madurez de la biomasa cítrica modifica de manera determinante la eficiencia fermentativa del sustrato. La pulpa fresca mostró un rendimiento experimental de 2.1 mL de etanol (72% de la eficiencia teórica esperada), mientras que la pulpa muy madura produjo 0.7 mL (24% de la eficiencia teórica), representando una reducción de 67% atribuible al estado de madurez. Esta diferencia es consistente con literatura reciente que documenta los efectos del pH subóptimo (2.5 vs 3.2), posible presencia de d-limoneno inhibitorio (>0.14% v/v afecta significativamente la viabilidad de *S. cerevisiae*), y acumulación de ácidos orgánicos por fermentación espontánea pre-pasteurización. No obstante, la ausencia de cuantificación directa de azúcares reductores totales (TRS), d- limoneno y ácidos orgánicos constituye una limitación metodológica que requiere ser subsanada en

futuros estudios mediante técnicas analíticas instrumentales (HPLC, GC- MS).

La fermentación anaerobia con *Saccharomyces cerevisiae* en recipientes herméticos provistos de válvula, aplicada sobre pulpa de naranja pasteurizada térmicamente (80°C, 15 min), constituye una ruta experimental viable para la valorización biotecnológica en entornos educativos. La pasteurización empleada reduce la carga microbiana en >99.9% según literatura, pero no garantiza esterilización completa ni volatilización de d-limoneno (punto de ebullición ~176°C), lo cual debe considerarse al interpretar las eficiencias fermentativas obtenidas y planificar escalamientos industriales que requieran pretratamientos más rigurosos.

La extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor en micro-lotes de hojas secas (20- 22 g) permitió obtener fracciones orgánicas con rendimientos (1.75% eucalipto, 1.5% hierbabuena) coherentes con estudios recientes que reportan 1.28-2.34% para *E. globulus* según contenido de humedad, y 0.5-2.6% para *M. spicata* dependiendo de condiciones de cultivo y método de extracción. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas medidas (densidad 0.85-0.89 g/mL, RI 1.460) están por debajo de estándares ISO 3033:1988 (densidad 0.920-0.937 g/mL, RI 1.4850-1.4910 para *M. spicata*), lo cual se atribuye a temperatura de medición no estándar (22-24°C vs 20°C), posible presencia de agua residual (2-5%), y uso de métodos simplificados (refractómetro manual) en lugar de refractometría de precisión. Estas desviaciones no invalidan los resultados en el contexto educativo- experimental, pero subrayan la necesidad de estandarización metodológica para caracterización conforme a normas comerciales.

Los ensayos cualitativos con  $\text{KMnO}_4$ , bromo y  $\text{FeCl}_3$  aportan evidencia complementaria sobre la presencia de compuestos insaturados (dobles enlaces en monoterpenos) y posibles grupos aromáticos oxigenados, lo cual fortalece la correlación entre los perfiles químicos obtenidos experimentalmente y la composición típica reportada para aceites esenciales de eucalipto (1,8-cineol 85-90%,  $\alpha$ -pineno) e hierbabuena (carvona 50-70%, limoneno 10- 20%). Sin embargo, la prueba de  $\text{FeCl}_3$  no es específica para fenoles y puede generar falsos positivos con enoles, ácidos carboxílicos conjugados y alcoholes aromáticos, por lo que la identificación definitiva de componentes minoritarios requiere validación cromatográfica.

En conjunto, el estudio confirma que es posible integrar dos rutas de valorización (etanol y aceites esenciales) a partir de residuos cítricos y plantas aromáticas bajo un marco de economía circular, generando bioproductos con pertinencia industrial y educativa.

Se requieren validaciones adicionales que incluyan: cromatografía en capa fina (TLC) o espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) para confirmar perfiles fitoquímicos; cuantificación directa de etanol mediante densimetría precisa, GC-FID o métodos enzimáticos; determinación de azúcares reductores totales (DNS, HPLC-RID) en pulpas frescas y maduras; análisis de inhibidores potenciales (d-limoneno, ácidos orgánicos) mediante HPLC o GC-MS; y estandarización de mediciones fisicoquímicas a temperatura controlada ( $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) con instrumentación de precisión (picnómetro,

refractómetro digital). Estas mejoras metodológicas son esenciales para fortalecer la trazabilidad analítica, comparar rigurosamente con estándares internacionales, y evaluar la viabilidad técnica y económica de escalamiento hacia procesos productivos reales basados en principios de sostenibilidad y aprovechamiento integral de biomasa residual agroindustrial.

## Referencias

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT: Crops and Livestock Products. FAO, 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.fao.org/faostat/>. [Accedido: Ene. 2026].
- [2] Z. P. Cakar, D. Ozer, y E. Sariyar, "Utilization of citrus processing by-products for functional food development: Bioactive compounds, fermentation and applications," *Food Research International*, vol. 140, p. 110000, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110000.
- [3] H. Chen, F. Chen, y Y. Cheng, "Fermentation of citrus waste for bioethanol production: Recent advances and challenges," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, p. 580033, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.580033.
- [4] A. K. Dhakad, V. V. Pandey, S. Beg, J. M. Rawat, y A. Singh, "Biological, medicinal and toxicological significance of eucalyptus leaf essential oil: A review," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 8, no. 1, pp. 46-54, 2018, doi: 10.4103/2221-1691.235755.
- [5] M. Gulluce, F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. Daferera, A. Sokmen, M. Polissiou, A. Adiguzel, y H. Ozkan, "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and methanol extract of *Mentha spicata* L. (spearmint)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 21, pp. 8705-8710, 2007, doi: 10.1021/jf071276a.
- [6] International Organization for Standardization, "ISO 9235:2013 -- Aromatic natural raw materials -- Vocabulary," Ginebra: ISO, 2013. [En línea]. Disponible: <https://www.iso.org/standard/51017.html>
- [7] International Organization for Standardization, "ISO 3033:1988 -- Oil of spearmint (*Mentha spicata* Linnaeus)," Ginebra: ISO, 1988.
- [8] International Organization for Standardization, "ISO 22000:2018 -- Food safety management systems -- Requirements for any organization in the food chain," Ginebra: ISO, 2018. [En línea]. Disponible: <https://www.iso.org/standard/65464.html>
- [9] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, "NTC-ISO 9235 -- Aceites esenciales -- Definiciones y clasificación," Bogotá: ICONTEC, 1995.

- [10] Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, "NTC 4095 -- Bebidas no alcohólicas fermentadas," Bogotá: ICONTEC, 2006.
- [11] M. R. Wilkins, W. W. Widmer, y K. Grohmann, "Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 12, pp. 1614-1619, 2007, doi: 10.1016/j.procbio.2007.09.006.
- [12] X. Wang, Y. Liu, Y. Peng, X. Zhang, D. Zhao, H. Wang, X. Xiao, X. Li, Y. Zhou, y K. Zeng, "D-Limonene inhibits *Pichia kluyveri* Y-11519 in Sichuan pickles: Disruption of cell metabolism and membrane integrity," *Foods*, vol. 13, no. 15, p. 2352, 2024, doi: 10.3390/foods13152352.
- [13] M. Puca-Pacheco, I. Melo-Sabastizagal, y J. Álvarez-López, "Extraction of essential oil from eucalyptus leaves (*Eucalyptus globulus*) by steam distillation and its physicochemical and microbiological characterization," *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 90, no. 4, pp. 216-224, 2024, doi: 10.37761/rsqp.v90i4.454.
- [14] H. Mukhtar, M. W. Mumtaz, M. Danish, U. Rashid, S. A. Rahimuddin, M. T. Akhtar, Y. Jamil, T. Touqeer, y M. M. Khandaker, "Biomass and bioethanol production from pretreated mixed fruit peel waste hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae*," *Scientific Reports*, vol. 15, p. 2157, 2025, doi: 10.1038/s41598-024-83668-4.
- [15] P. M. Bermejo, M. R. Foulquié-Moreno, y J. M. Thevelein, "Ethanol yield calculations in biorefineries: A critical review," *FEMS Yeast Research*, vol. 21, no. 5, p. foab065, 2021, doi: 10.1093/femsyr/foab065.
- [16] M. S. Krishnan, N. W. Ho, y G. T. Tsao, "Fermentation kinetics of ethanol production from glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* 1400(pLNH33)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 77-79, pp. 373-388, 1999, doi: 10.1385/ABAB:77:1-3:373.
- [17] S. Van Haute et al., "Prediction of essential oil content in spearmint (*Mentha spicata* L.) via non-destructive methods," *Nature Scientific Reports*, vol. 13, p. 3947, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-31517-8.
- [18] W. L. Kong, H. L. Foo, T. C. Loh, y R. Abdul Rahim, "Effect of different pasteurisation temperatures on physicochemical characteristics and microbiological quality of orange juice," *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, vol. 48, no. 3, pp. 789-802, 2020.
- [19] B. M. Dala-Paula, F. B. Custódio, E. A. Knupp, H. E. Palmieri, J. A. Silva, y M. B. Glória, "Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality," *Food Chemistry*, vol. 272, pp. 496-502, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.085.

- [20] X. Yang, W. Hu, Z. Xiu, A. Jiang, X. Yang, G. Saren, Y. Ji, y Y. Guan, "Antioxidant properties of a vegetable-fruit beverage fermented with two *Lactobacillus plantarum* strains," *Food Science and Technology Research*, vol. 24, no. 4, pp. 679-688, 2018, doi: 10.3136/fstr.24.679.
- [21] W. Widmer, W. Zhou, y K. Grohmann, "Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 14, pp. 5242-5249, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.038.