



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE LOS  
ALIMENTOS NUTRICION Y BROMATOLOGIA**

**El Aceite Esencial de limón producido en  
España. Contribución a su evaluación por  
Organismos Internacionales.**

Querubina Albaladejo Meroño

Murcia 1999

## **INDICE**



<b>OBJETO</b>	1
<b>CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>I.1- PRODUCCIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN EN ESPAÑA</b>	12
<b>I.2- TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL LIMÓN EN LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL</b>	16
<b>I.2.1- Limón, materia prima para la industria cítrica</b>	16
<b>I.2.2- Tratamiento del fruto</b>	19
<b>I.2.3- Obtención del aceite esencial</b>	21
<b>I.2.4- Almacenamiento y conservación del aceite     esencial</b>	39
<b>I.3- DETERPENADOS</b>	40
<b>I.3.1- Destilación fraccionada a vacío</b>	41
<b>I.3.2- Extracción con disolvente</b>	42
<b>I.3.3- Cromatografía de adsorción</b>	43
<b>I.3.4- Nuevas tecnologías</b>	43
<b>I.4- ALCOHOLATOS</b>	46
<b>I.5- AROMAS EN POLVO</b>	47
<b>I.6- ACEITE ESENCIAL OBTENIDO POR DESTILACIÓN</b>	48
<b>I.7- ESENCIAS DEL ZUMO</b>	49
<b>I.8- SISTEMAS INDUSTRIALES DE CONCENTRACIÓN DE AROMAS</b>	51

<b>CAPÍTULO II- CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN</b>	59
<b>II.1- FLAVOR</b>	60
<b>II.1.1- Factores que afectan al aroma de frutos cítricos y sus productos</b>	62
<b>II.1.2- Componentes volátiles importantes para el aroma de productos cítricos</b>	63
<b>II.1.3- Alteraciones del aroma durante el almacenamiento</b>	67
<b>II.2- ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN</b>	78
<b>II.2.1- Componentes característicos del aceite esencial</b>	80
<b>II.2.2- Métodos analíticos utilizados en la caracterización del aceite esencial de limón</b>	83
II.2.2.1- <i>ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.</i>	85
II.2.2.2- <i>ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA</i>	90
II.2.2.3- <i>ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO</i>	91
II.2.2.4- <i>DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.</i>	93
II.2.2.4.1- <i>Análisis de componentes volátiles</i>	93
II.2.2.4.1.1- <i>Inyección directa en cromatografía de gases</i>	94
II.2.2.4.1.2- <i>Elución en columnas de diferente polaridad</i>	99
II.2.2.4.3- <i>Determinación de componentes volátiles en de cabeza</i>	107
II.2.2.4.3.1- <i>Espacio de cabeza estático</i>	108
II.2.2.4.3.2- <i>Espacio de cabeza dinámico</i>	112
II.2.2.5- <i>ESPECTROMETRÍA DE MASAS</i>	113
II.2.2.6- <i>DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN NO VOLÁTIL HPLC</i>	114
<b>II.3- ACTIVIDADES PARTICULARES</b>	122
<b>II.3.1- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>	122
<b>II.3.2- REACCIONES ALÉRGICAS</b>	124

<b>CAPÍTULO III- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	127
<b>III.1- ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN.</b>	129
<b>III.1.1- Muestras de aceite esencial de limón</b>	130
III.1.1.1- <i>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS: ASPECTO Y OLOR</i>	131
<b>III.2- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS</b>	131
<b>III.2.1- Determinación de la Densidad</b>	131
<b>III.2.2- Determinación del Índice de refracción</b>	136
<b>III.2.3- Determinación del Poder Rotatorio</b>	137
<b>III.2.4- Solubilidad en etanol</b>	138
<b>III.2.5- Residuo de evaporación</b>	140
<b>III.2.6- Índice de carbonilo expresado como citral</b>	140
<b>III.3- ESPECTROFOTOMETRÍA DE UV. ÍNDICE CD</b>	144
<b>III.4- CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>	148
<b>III.4.1- Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes volátiles en aceite esencial de limón</b>	148
III.4.1.1- <i>CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS</i>	155
III.4.1.2- <i>ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO</i>	155
<b>CAPÍTULO IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	157
<b>IV.1- CARACTERÍSTICAS SENSORIALES</b>	159
<b>IV.1.1- Determinación del aroma</b>	159
<b>IV.1.2- Determinación de color en aceite esencial de limón</b>	160
<b>IV.2- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS</b>	164
IV.2.1- <i>RESIDUO DE EVAPORACIÓN</i>	164
IV.2.2- <i>ÍNDICE DE REFRACCIÓN</i>	166
IV.2.3- <i>ROTACIÓN ÓPTICA</i>	169
IV.2.4- <i>PESO ESPECÍFICO</i>	172
IV.2.5- <i>ÍNDICE DE CARBONILO</i>	176
IV.2.6- <i>SOLUBILIDAD EN ETANOL</i>	179
<b>IV.3- ESPECTROFOTOMETRÍA. ÍNDICE CD</b>	180

<b>IV.4- CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>	183
<b>IV.4.1- Columna OV-101</b>	184
<b>IV.4.2- Columna CPWax-52CB</b>	187
<b>IV.4.3- Columna HP-5</b>	192
<b>IV.4.4- Análisis cuantitativo de componentes volátiles en aceite esencial de limón</b>	195
IV.4.4.1- <i>ESTUDIO DE LOS PORCENTAJES OBTENIDOS EN LAS COLUMNAS OV-101, CPWAX-52CB Y HP-5</i>	197
IV.4.4.2- <i>EVOLUCIÓN DE LOS PORCENTAJES DURANTE LA CAMPAÑA DE ELABORACIÓN</i>	204
IV.4.4.3- <i>VALORES LÍMITES</i>	214
IV.4.4.4- <i>ESTUDIO DE COMPONENTES VOLÁTILES EN ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO</i>	219
<b>ANEXO I</b>	225
<b>ANEXO II</b>	233
<b>CONCLUSIONES</b>	237
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	243
<b>ABREVIATURAS</b>	291
<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	295

**OBJETO**





El cultivo de los cítricos en la cuenca del Mediterráneo tiene su principal exponente en las naranjas y los limones, cuya producción adquiere especial importancia en España e Italia fundamentalmente, como principales suministradores de frutos frescos a los países comunitarios de la UE. A su vez la industrialización de los frutos cítricos tiene una amplia tradición en estos países y constituye la única vía interesante de aprovechamiento y regulación de excedentes.

En nuestro país y más concretamente en la Región de Murcia la transformación industrial del limón se realiza desde hace tiempo, constituyendo desde el principio el aceite esencial de limón, por sus aplicaciones y extraordinario valor, el primer

producto derivado, en contraste con la naranja para la que siempre el aceite esencial ha sido considerado un subproducto.

Existen estudios anteriores sobre los aceites esenciales de limón elaborados en España, pero hasta el momento no se había desarrollado ninguna norma de las características y composición del aceite esencial de limón español, que sirviese de referencia de su genuinidad y calidad con respecto al procedente de otros orígenes.

Dado el aumento de su comercialización y las variaciones producidas en las dos últimas décadas, tanto por la diversidad de las condiciones agrobiológicas de desarrollo de los limones como por los cambios tecnológicos en la elaboración del propio aceite esencial, la actualización de los datos relativos a las características y composición del aceite esencial de limón elaborado en España resultan de incalculable valor.

Los objetivos del trabajo que se presenta en esta memoria se orientan hacia la puesta al día del conocimiento de este aceite esencial y la consiguiente aportación de datos a una posible propuesta de normalización del aceite esencial de limón *Citrus limon* (Linneo) N.L. Burman producido en España.

Hasta ahora, se vienen normalizando por parte de los organismos oficiales -AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), ISO (International Standard Organization)-, los distintos métodos de trabajo con vistas a facilitar las determinaciones a realizar, que garanticen la autenticidad y pureza de los productos existentes en el mercado.

Lógicamente alcanzar estas certificaciones supone un incremento del valor añadido de los productos incluidos en ellas.

De aquí deriva la importancia de la realización de ésta memoria de Tesis Doctoral en la que se pretende colaborar con la caracterización del aceite esencial de limón producido en España. Para ello se llevan a cabo estudios de la composición físico-química, así como de su perfil cromatográfico representativo de la fracción volátil responsable de la calidad organoléptica y de su valor comercial.

Los objetivos establecidos para el desarrollo de este trabajo son:

1.- Estudio de las características organolépticas de muestras de aceites esenciales de limón español.

2.- Estudio de las características físico-químicas del aceite esencial de limón producido en España. Para ello se consideran los siguientes parámetros: Índice de refracción, rotación óptica, peso específico, índice de carbonilo, solubilidad en etanol y residuo seco.

3.- Análisis mediante espectrofotometría de ultravioleta, para la obtención del espectro característico y el valor del índice CD.

4.- Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas, para la identificación del mayor número posible de componentes de la fracción volátil del aceite esencial.

5.- Consideración de datos para elaboración de una monografía de las características del aceite esencial de limón producido en España.

## **I- INTRODUCCIÓN**



El género *Citrus* parece que proviene de la zona este del Himalaya, Pakistán y Birmania. En Europa Teofrasto describe una especie de *Citrus* introducida en el S.III por los bizantinos; a continuación aparecen el naranjo amargo, el limonero y el naranjo dulce (Drouet, 1982). A principios del s. XII el cultivo del limonero en Irán y Palestina, es descrito por IBOR JAMI, físico de la corte de Saladino (1171-1193).

Los árabes lo introducen por el norte de África en España e Italia hacia el 1150, de ello tenemos noticia a través de los tratados de dos autores andaluces de la segunda mitad del siglo doce, Ibn-al-Awam en su “Libro de Agricultura” describe de forma detallada

los procedimientos de multiplicación y cultivo del limonero; Ibn-el-Beithar refleja las propiedades terapéuticas del zumo de limón del que ofrece distintas fórmulas de aplicación (Laencina, 1970). Cristóbal Colón tras su segundo viaje lo introduce en América en 1493, e ingleses y holandeses en África del Sur. El proceso de extracción se reseña en el 1700, en dos escritos del abad Domenico Sestini publicados en Florencia en 1780 (Di Giacomo y Mincione 1994).

Dentro de la tribu botánica de las Aurantoideas, en la familia de las Rutáceas, se encuentra el género *Citrus*, al que pertenece el limonero, que tras el acuerdo tomado en 1964 en Edimburgo en el X Congreso Internacional de Botánica con vistas a unificar la nomenclatura recibe el nombre de: *Citrus limon* (Linneo) N.L. Burman (Drouet, 1982).

En la Tabla I.1, se describen las principales especies del género *Citrus* utilizadas en la obtención de aceites esenciales. Si bien el fruto, en general, es la principal fuente de obtención del aceite esencial de los cítricos, en algunos casos se elaboran esencias procedentes de otras partes vegetales especialmente de hojas, flores y tallos jóvenes. La destilación por arrastre con vapor de agua constituye el método de extracción más generalizado en estos casos, junto con la extracción por disolventes orgánicos. El extraordinario valor económico de algunas de éstas esencias junto a sus peculiaridades propicia las actuales investigaciones de aplicación de nuevos métodos de extracción como el empleo de gases en condiciones supercríticas.



**TABLA I. 1- PRINCIPALES ESPECIES DEL GÉNERO CITRUS UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA DE ACEITES ESENCIALES**

ESPECIE	ORIGEN	CARACTERISTICAS BOTÁNICAS	CULTIVARES
Limonero <i>Citrus limon</i> , (L) Burman.	Birmania septentrional	Árbol de talla media o grande, ramas con espinas fuertes. Hojas de color verde pálido. Flores de color rosa - violáceo. Frutos alargados o más o menos redondeados de corteza ligeramente rugosa. Pulpa de tono amarillo rica en zumo de sabor ácido. Presenta semillas.	Feminello: común, sfusato, Continella, flor de naranjo, Sta. Teresa , Monachello , Lunario e Interdonato
Naranja amargo <i>Citrus aurantium</i> , L.	Sureste asiático	Árbol de mediana talla, con ramas espinosas, hojas medianas, ovales y provistas de peciolo alado. Flores grandes blancas, hermafroditas y muy perfumadas. Frutos de piel espesa rugosa de intenso color naranja en la madurez con numerosas semillas y pulpa ácida y amarga.	Bouquetier
Naranja dulce <i>Citrus sinensis</i> , L.Osbeck.	Indochina	Árbol de altura media cima redondeada, ramas con espinas delgadas, flexibles	<u>Pigmentadas</u> : Moro, Taroco, Sanguinela, Sangrina. <u>Rubias</u> : Común, Belladona, Navelina, Oval, Valencia late, Salustiana y Navelate.
Naranja clementina <i>Citrus clementine</i> , Hort.	Argelia		Común, Monreal y Oroval.
Mandarino <i>Citrus reticulata</i> , Blanco.	Asia		Avana y Tardío
Pomelo <i>Citrus paradisi</i> , McFayden			Duncan, Ruby, Thompson y Marsh seedless
Lima dulce <i>Citrus limetta</i> , Risso.			Dulce romana y Palestina
Cidra <i>Citrus medica</i> , L.	India		Cedro de diamante
Bergamoto <i>Citrus bergamia</i> , Risso.	Canarias ?		Fantástico, Femminello, Castagnaro.

(Di Giacomo y Mincione, 1994)

## **I.1- PRODUCCIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN.**

A nivel mundial se cultivan más de 1,5 millones de hectáreas de limonero. Los mayores productores del mundo son Estados Unidos, Argentina, Italia, España, Grecia, Israel, Costa de Marfil, ... En nuestro entorno próximo del área de la cuenca mediterránea destaca en primer lugar Italia cuyo limón proviene sobre todo de la zona de Sicilia, donde se cultivan muchas variedades. La más importante es la de *feminello sfusato* con frutos parecidos a los de variedad *lisboa*. Otra variedad más resistente al “mal secco” es la *monachello*, aunque es más pobre en aceite esencial (Di Giacomo y Mincione, 1994).

La superficie dedicada al cultivo de cítricos en España supera en el año 1994 las 250.000Ha, de las que el 20% se destinan al limón, lo que supone una producción que supera las 500.000Tm; actualmente se considera que esta cifra puede rebasar las 700.000Tm. En el Levante y en concreto en Murcia se procesa limón durante casi todo el año, casi el 40% del total de limón recogido en toda España. (CMAAARM, 1998).

La variedad “Verna” constituye el 70% del cultivo de limón y el resto corresponde casi enteramente a la variedad conocida como “Fino” o “mesero”. Se llama limón de invierno el que procede de la variedad Fino, que permite obtener frutos desde septiembre/octubre hasta casi febrero, siendo éstos los más interesantes para la obtención del aceite esencial de limón además de por su riqueza en ácido cítrico. Los del tipo *verdelli* se recolectan durante el verano, dando un aceite esencial con ligeras variaciones respecto al de invierno.

Así encontramos que en la campaña 1994/95 se producen 562.715Tm de limón en España llegando a 742.032Tm, en la campaña 1997/98 (MAPA, 1999).

La distribución por comunidades autónomas se muestra en la Tabla I.1.1. Como se puede observar, es en la Región de Murcia donde se produce la mayor parte, seguida de la Comunidad Valenciana, representada por Alicante sobre todo en la zona de Orihuela.

La exportación para el consumo en fresco, constituye el principal destino de la producción, aún así no resulta suficiente como para asumir el total de la producción de la que se destinan a exportación 380.103Tm (Tabla I.1.2). En la campaña 1994/95 de una producción de limones de 662.800Tm, se destinan a exportación 335.600Tm, 180.000Tm a transformación industrial, 115.000Tm al mercado interior, con unas pérdidas estimadas de 11.400Tm (INTERCITRUS, 1999).

La saturación de los mercados Comunitarios, la complicación que el mercado de U.S.A. ofrece a la importación, la dificultad de acceso al mercado Japonés y los limitados mercados de los países del Este propician como mejor salida posible la transformación industrial del limón, en una amplia gama de elaborados de alto valor añadido que permitan el aprovechamiento integral de los frutos (Laencina y Carpena, 1974; Coll, 1992).

**TABLA I.1.1- DISTRIBUCIÓN POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS DE LA PRODUCCIÓN DE LIMÓN EN LAS ÚLTIMAS CAMPAÑAS**

	<b>94/95 (Tm)</b>	<b>95/96 (Tm)</b>	<b>96/97 (Tm)</b>	<b>97/98 (Tm)</b>
<b>Murcia</b>	229.140	214.970	239.410	396.651
<b>Valencia</b>	203.475	120.133	152.578	231.479
<b>Andalucía</b>	114.000	88.375	73.524	97.202
<b>Cataluña</b>	1.400	1.200	900	1.200
<b>Baleares</b>	2.700	3.500	3.200	3.400
<b>Otras</b>	12.000	8.736	13.000	12.100
<b>Total</b>	562.715	436.914	482.612	742.032

INTERCITRUS, 1999

**TABLA I.1.2- EXPORTACIÓN DE CÍTRICOS A PAÍSES DE LA UNIÓN EUROPEA**

<b>País</b>	<b>Limones (Tm)</b>
Francia	89.744
Bélgica-Luxemburgo	16.010
Países Bajos	66.747
Alemania	109.375
Italia	41.885
Reino Unido	32.275
Irlanda	1.048
Dinamarca	3.868
Grecia	4.559
Portugal	2.509
Suecia	5.317
Finlandia	1.986
Austria	4.780
Total 97/98	380.103
<i>Total 96/97</i>	<i>296.790</i>
<i>Incremento</i>	<i>28 %</i>

INTERCITRUS, 1999

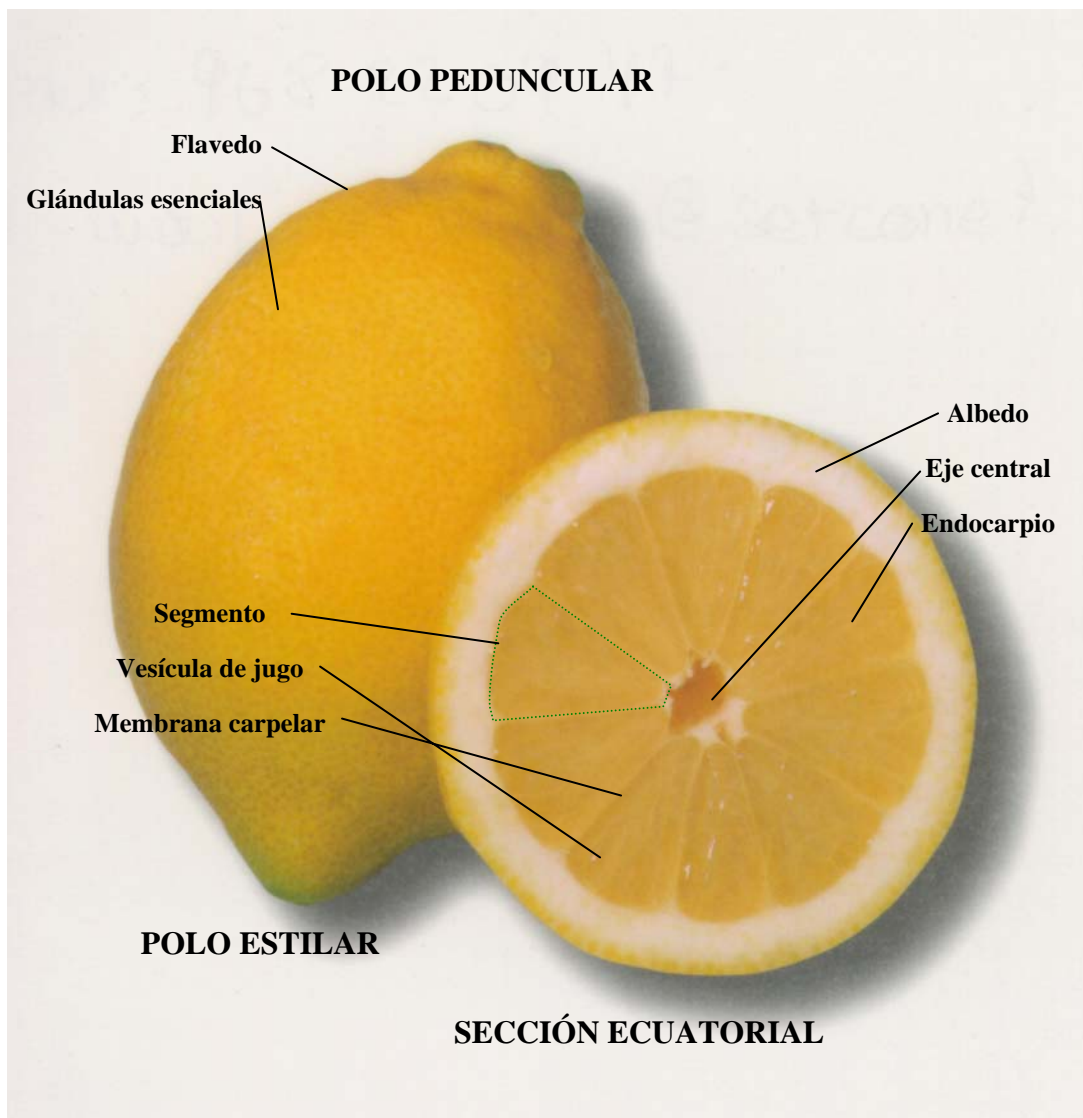
## **I.2- TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL LIMÓN EN LA OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.**

Para comprender mejor el proceso al que se va a someter el limón para su transformación industrial vamos a continuación a detallar de forma somera las características principales del fruto.

### **I.2.1- Limón, materia prima para la industria cítrica.**

La estructura del fruto cítrico se constituye de tres partes bien diferenciadas, como aparecen en la Figura I.2.1. El epicarpio o flavedo, el mesocarpio o albedo y el endocarpio constituido por varios segmentos o gajos que contienen las vesículas repletas de zumo y donde están también las semillas. El tamaño de los frutos es de mediano diámetro (54mm) y una altura media de 69mm; la corteza es muy adherente, delgada -espesor medio de 3.9mm- y representa el 30% del peso del fruto (Coll, 1992).

La floración principal o de primavera que da lugar a los limones llamados de “cosecha”, se extiende desde marzo a mayo, dependiendo de la climatología del año, edad, localización y estado fisiológico de los árboles. Los limones que se cosechan de esta floración se recolectan de febrero hasta casi el mes de julio-agosto, aunque los frutos de verano tienen menor consistencia, son muy irregulares y por lo tanto la calidad disminuye. Hacia septiembre tiene lugar una segunda floración cuyos frutos llamados “rodrejos” se recolectan a finales del verano siguiente. Estos limones poseen una piel más fina y se cosechan cuando el color de los frutos es de un verde claro. El tamaño de los frutos es variable, el espesor de la corteza oscila entre los 3 y 11mm.



**FIG.I.2.1.1- ESTRUCTURA DEL FRUTO CÍTRICO**





El limonero Verna es la variedad más extendida en la región de Murcia. En zonas de buena climatología no deja de florecer durante todo el año, por lo que se puede disponer de frutos a lo largo del mismo, si bien es una variedad típica de primavera-verano. La floración que se produce entre la de primavera y verano da lugar a los frutos conocidos como limones “segundos” o “Sanjuaneros” más rugosos y menos consistentes, por lo que son poco estimados en el mercado.

El limón Fino se recolecta de octubre a enero; su ciclo es más corto que el de limón Verna, y procede de la floración de marzo, que es muy regular. A finales de verano se produce otra floración, no tan intensa como la del Verna, que dará lugar a los “rodrejos” del verano siguiente.

### **I.2.2- Tratamiento del fruto.**

La recolección de los frutos debe ser sumamente cuidadosa ya que la integridad del pericarpio va a influir en el rendimiento y la calidad del aceite esencial obtenido. Tras la recolección, el fruto es transportado a las industrias transformadoras; allí se recibe generalmente en balsas de agua y a continuación se eliminan las partes sobrantes -restos de hojas y peciolo- y se procede al lavado de los frutos que a continuación pasarán a ser procesados.

La selección de los frutos es especialmente importante ya que el coste de la materia prima corresponde a más del 80% del coste industrial, y la calidad del producto final está íntimamente ligada con la calidad de la fruta. Por tanto se debe adquirir la variedad, calidad y cantidad necesarias de frutos, con un estado de

maduración adecuado. Las empresas acostumbran a mantener un registro del rendimiento y calidad obtenidos con los frutos de distintos orígenes y distintas condiciones, que les sirve de orientación para la adquisición de las frutas en las nuevas temporadas (Viegas, 1990).

Los limones destinados a industria deben estar limpios, sanos, con buen aspecto externo, de madurez y tamaño uniforme. La falta de uniformidad en el tamaño y la maduración causa serios problemas en el rendimiento y en la calidad de los productos obtenidos (FMC, 1981). El aspecto exterior de la fruta es un buen indicador de los cuidados que el agricultor brinda a la plantación. Los frutos bien cultivados soportan mejor la manipulación a que son sometidos en las diversas fases del proceso, permitiendo que la fábrica trabaje con mayor eficiencia al presentar mayor rendimiento, menores pérdidas, menos mano de obra para separar frutos de mala calidad en las cintas transportadoras, y permiten la obtención de mayor cantidad de subproductos.

La manipulación de la fruta desde su recolección ha de efectuarse con el máximo cuidado, ya que los golpes pueden, al romper las células, producir transformaciones fisico-químicas indeseables o favorecer el desarrollo de hongos que contaminen el producto y por supuesto pérdidas de aceite esencial. Si hubieran de almacenarse se haría en un lugar ventilado a la sombra, manteniendo la fruta seca y procurando procesarla lo antes posible.

El transporte por el mismo motivo se hará procurando evitar el daño del pericarpio ya que se pueden lacerar los utrículos. Las condiciones ideales de transporte están más o menos lejos de la

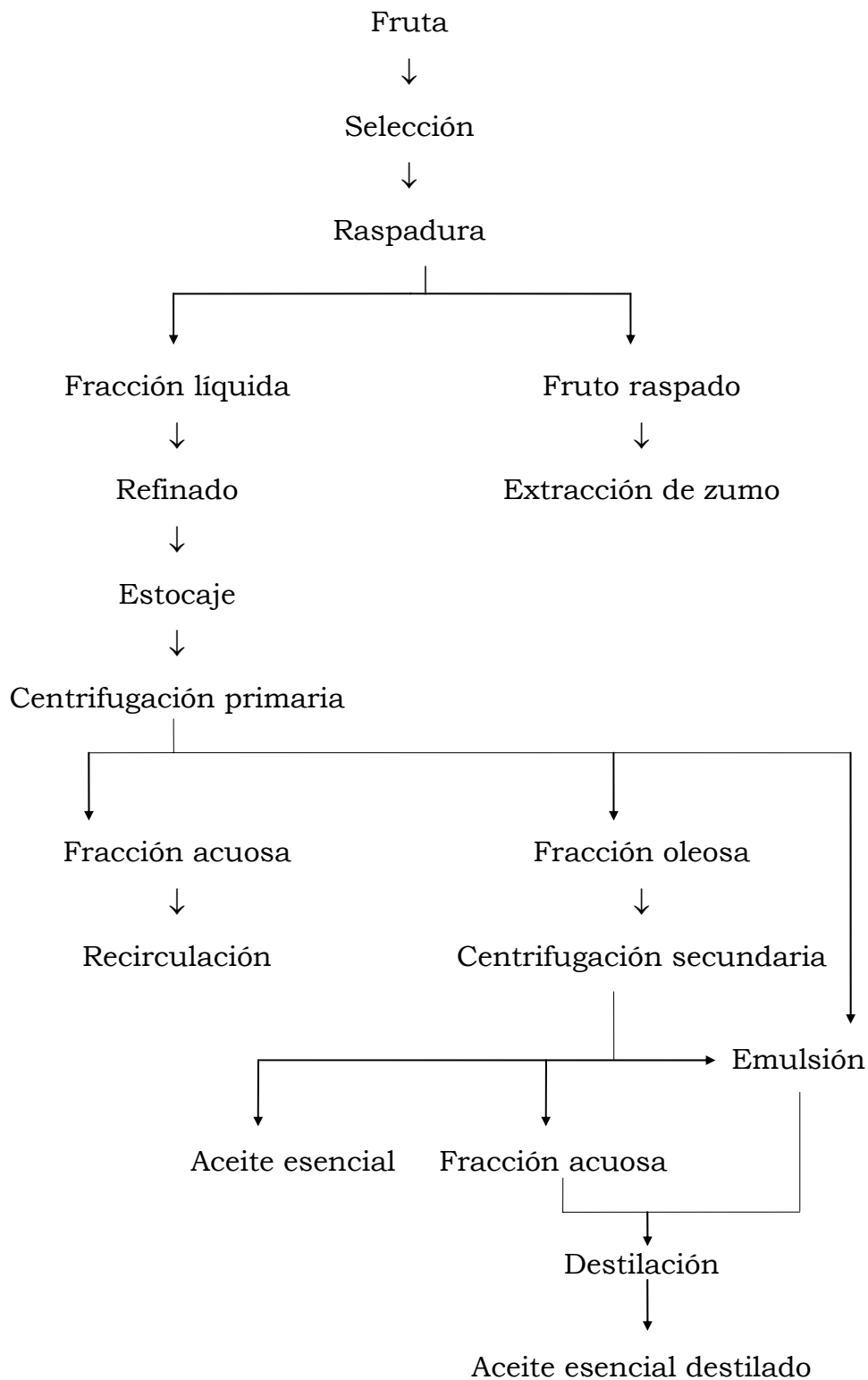
realidad, ya que es imposible eliminar totalmente las magulladuras en los frutos cuando estamos hablando en términos de toneladas métricas. Se descarga el limón sobre lechos acuosos para minimizar los golpes.

El tratamiento preliminar pasa por la inspección de los frutos por parte de personal cualificado. La selección se realiza en una cinta transportadora de rodillos que hace girar a la fruta durante el transporte permitiendo inspeccionar visualmente toda la superficie de la misma, se retiran los frutos no aptos, con golpes en la corteza, cortes o picaduras de insectos y ácaros, o aquellos que presenten claros síntomas de envejecimiento.

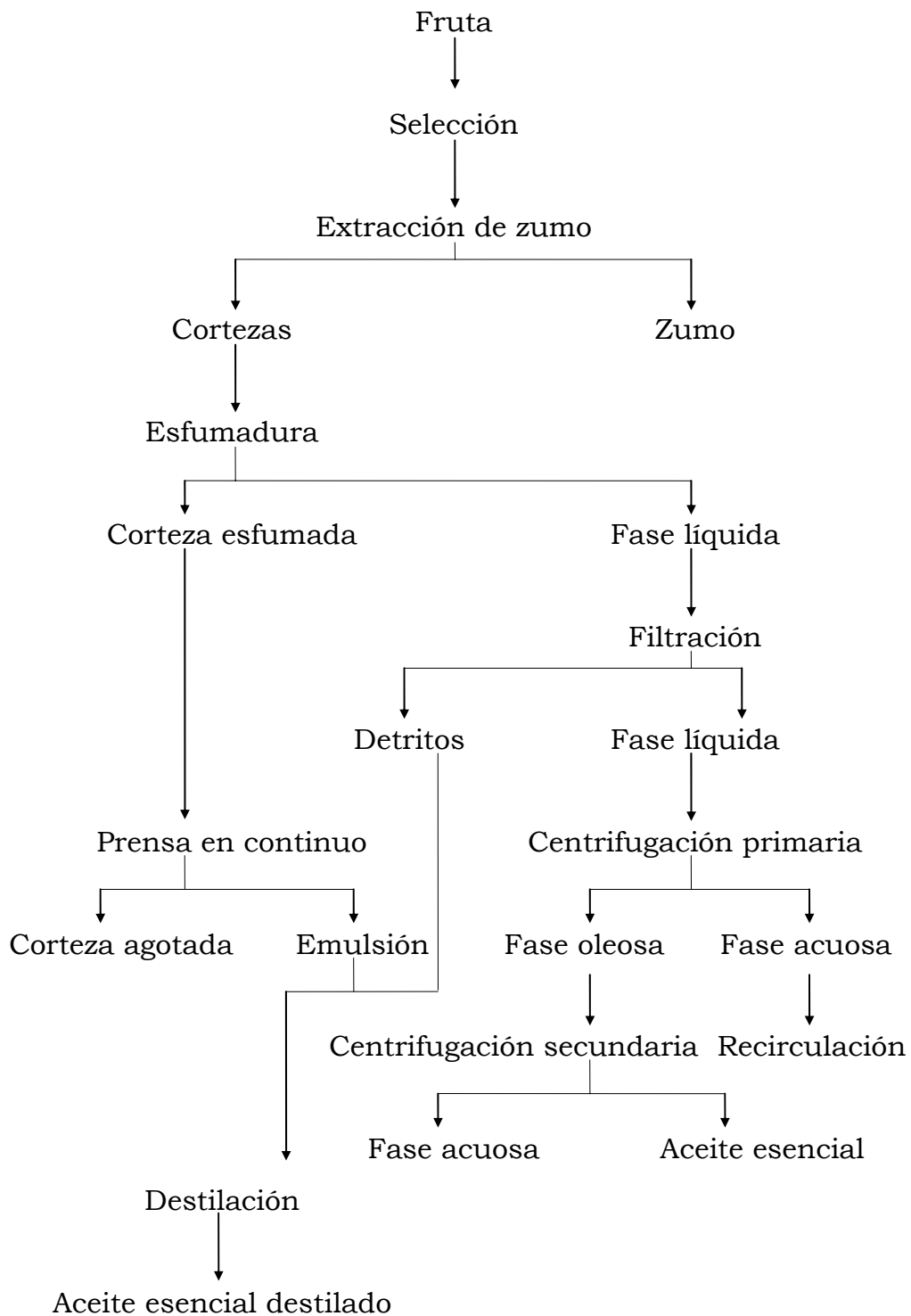
Los restos de tierra y hojas y la suciedad adherida a la corteza se eliminan mediante lavadoras con cepillos rotativos. Si se observan evidentes imperfecciones se deberá proceder a la retirada de la cinta de la fruta no adecuada para ser procesada. La humedad se elimina posteriormente mediante ventilación, ya que el fruto debe estar seco para su procesado.

### **I.2.3- Obtención del aceite esencial.**

Para la extracción de aceites esenciales la tecnología opta por uno de los ciclos descritos en las siguientes Figuras I.2.3.1, ciclo de elaboración por el método de raspadura y I.2.3.2 ciclo de elaboración por el método de esfumadura o espumadora.



**FIGURA I.2.3.1- CICLO LLEVADO A CABO EN LA TÉCNICA DE RASPADURA.** (Di Giacomo y Mincione, 1994)



**FIGURA I.2.3.2- CICLO LLEVADO A CABO EN LA TÉCNICA DE “ESFUMADURA”.** (Di Giacomo y Mincione, 1994)

La tecnología utilizada, se encuentra ligada de una forma u otra a la de extracción de zumo. El tratamiento del fruto completo se considera idóneo, según Di Giacomo y Mincione (1994), para la transformación en continuo de grandes cantidades de fruto, mientras el proceso de “*sfumatura*” se prefiere en empresas de tipo medio o artesanales especializadas en producir aceites esenciales de calidad “exquisita”.

En el primero los frutos se someten a raspado liberándose el aceite esencial de los utrículos, junto con restos de corteza, bajo la acción de una fina lluvia de agua que arrastra al aceite y los “detritus” hacia una refinadora que filtra y separa la emulsión oleosa de las partículas en suspensión, obteniéndose mediante la centrifugación de dicha emulsión una fase acuosa que se somete a recirculación, otra emulsión que se somete a destilación y una fase oleosa que tras una nueva centrifugación produce un efluente acuoso que es enviado a destilación, y el aceite esencial.

En el método de “*sfumatura*” se actúa sobre la corteza una vez se ha extraído el zumo, presionándola y comprimiéndola repetidamente para lograr la salida del aceite esencial de los utrículos que es arrastrado por una fina lluvia de agua, dispuesta oportunamente en el interior de la máquina. La fase líquida se filtra para separarla de los restos de corteza y se somete a una primera centrifugación en la que se obtiene una emulsión enriquecida en aceite esencial -cerca de un 80%- y una fase acuosa que se recircula tras decantación.

La fase oleosa sometida a una segunda centrifugación permite obtener el aceite esencial y una fracción acuosa con un elevado contenido en ceras. Los restos de corteza se prensan

añadiendo agua -siempre en forma de fina lluvia- líquido que a continuación se somete a destilación en corriente de vapor y bajo condiciones de vacío.

En cuanto a maquinaria se refiere, se pueden mencionar las siguientes: Pickin Roll, Screw press, Fraser-Brace excoriator, AMC scarifier, Brown peel shaver, etc. que recuperan el aceite del fruto en un paso previo a la extracción de zumo (Holbrook y Bushman, 1981).

En la patente para la Brown International Corporation, se describe el sistema como una cama de rodillos con superficies punzantes o abrasivas. Los frutos avanzan en una sola capa y se van rompiendo las glándulas oleíferas del pericarpio, quedando el aceite recogido en el agua de arrastre formando una emulsión que se descarga sobre una prensa y pasa posteriormente a través de un separador de partículas y centrifugación para separar el aceite esencial. Los aceites así obtenidos cumplen las especificaciones de la USP, excepto lo referente a los residuos de evaporación (Kesterson *et al.*, 1979).

En este tipo de maquinaria se opera sobre el fruto entero por abrasión como en los primeros sistemas manuales (Di Giacomo y Mincione, 1994) siguen también éste sistema las máquinas “Pelatrice” (peladora) que producen el raspado del fruto completo mediante varios pares de rodillos -entre tres y seis- de superficie punzante dispuestos trapezoidalmente con el eje longitudinal paralelo al sentido de avance de los frutos, los que rotan hacia el exterior impiden que los frutos sean aplastados, haciendo que resbalen sobre sí, cambiando continuamente su posición ofreciendo toda la superficie a la acción abrasiva de las puntas de

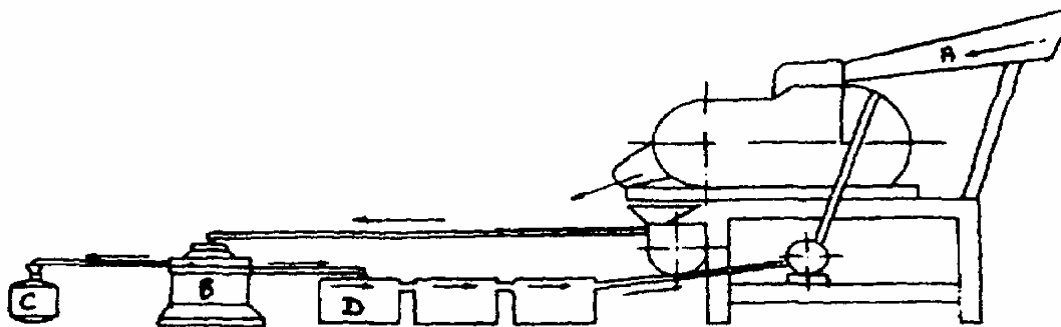
los rodillos, al mismo tiempo que el aceite es arrastrado mediante agua fuera de la máquina.

La velocidad de carga y la de rotación de los rodillos depende del cítrico que se trate, de su estado de maduración; la forma del fruto condiciona el tiempo de procesado de los mismos, siendo necesarios tiempos más prolongados en el caso del limón que en la naranja y frutas no ovaladas por ejemplo el modelo de seis pares de rodillos, procesa entre doce y catorce toneladas de naranja en una hora (Di Giacomo y Mincione, 1994).

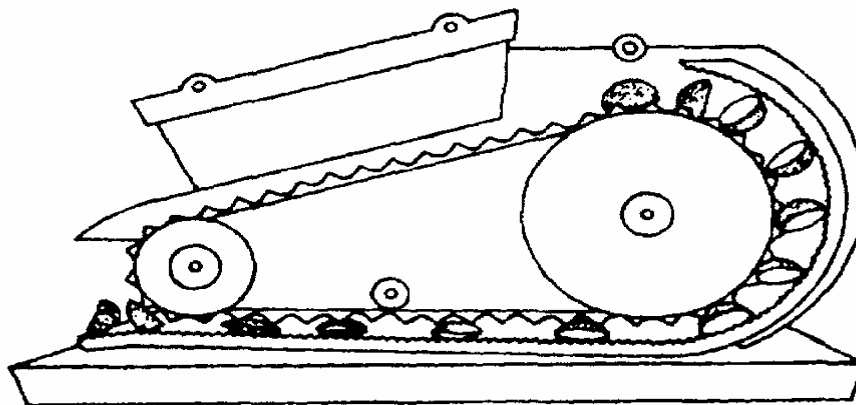
Otros tipos de maquinaria como “Torchio” (prensa) y “Sfumatrice” (esfumadora) -“Speciale” e “Indelicato”- obtienen el aceite esencial de un fruto al cual ya se ha extraído el zumo. El tipo “Torchio” produce el prensado de la corteza mediante dos hélices que giran en sentidos opuestos, hélices situadas en jaulas que hacen de filtro y abrasivo al estar surcadas por fresas longitudinalmente y talladas con fisuras calibradas para permitir la salida de la esencia. El primer prensado se realiza a presión no muy elevada y el líquido obtenido atraviesa, con ayuda de agua a presión, un cedazo giratorio del que se recupera el aceite tras centrifugación. Los restos de corteza se someten a un segundo prensado de mayor intensidad consiguiendo una pasta densa que diluída con la fase acuosa procedente de la centrífuga atraviesa el filtro y se destina a la destilación.

En la figura I.2.3.3 se muestran los esquemas de los dos modelos más usuales “Indelicato” y “Speciale” (Di Giacomo y Mincione, 1994).





A: Modelo "Indelicato"



B: Modelo "Speciale"

**FIGURA I.2.3.3- MÁQUINAS TIPO SFUMATRICE. A) MODELO "INDELICATO", B) MODELO "SPECIALE"** (Di Giacomo y Mincione, 1994).

El tipo de máquinas -de implantación casi exclusiva en Sicilia- denominadas “sfumatrice”, poseen una cinta sin fin, modelada a propósito con salientes orientados hacia una superficie fija, provista a su vez de protuberancias. La distancia entre éstas y las de la cinta sin fin se regula de modo que se consigue la escarificación de la corteza, procurando que no se rompa la corteza totalmente y sea rentable la proporción de aceite esencial obtenida.

Por último nos encontramos con maquinaria que realiza simultáneamente la separación de zumo y aceite esencial. Entre éstos se puede citar la “Unidad mondadora-esfumadora” (Indelicato), el extractor FMC “In-Line” (Food Machine Corporation) y el extractor “pelatrice” Speciale que es capaz de procesar entre 5.000 y 15.000Kg de limón por hora y que junto con el anterior son los sistemas más utilizados en la cuenca Mediterránea. De éstas últimas se muestran los esquemas en las Figuras I.2.3.4 y 5 respectivamente.

La FMC “In line”, consiste fundamentalmente en dos copas dentadas que intercalan sus dientes cuando se cierran a presión. Se clasifican los frutos por tamaños, a continuación se colocan en el centro de la copa inferior, la presión generada por la bajada progresiva de la copa superior produce la ruptura de las glándulas oleíferas, el diseño de los perfiles de las copas impiden que la corteza se rompa. Un potente chorro de agua micronizada arrastra el aceite, se consigue así una primera emulsión con cuatro componentes: agua, aceite, restos de corteza y sólidos en suspensión.

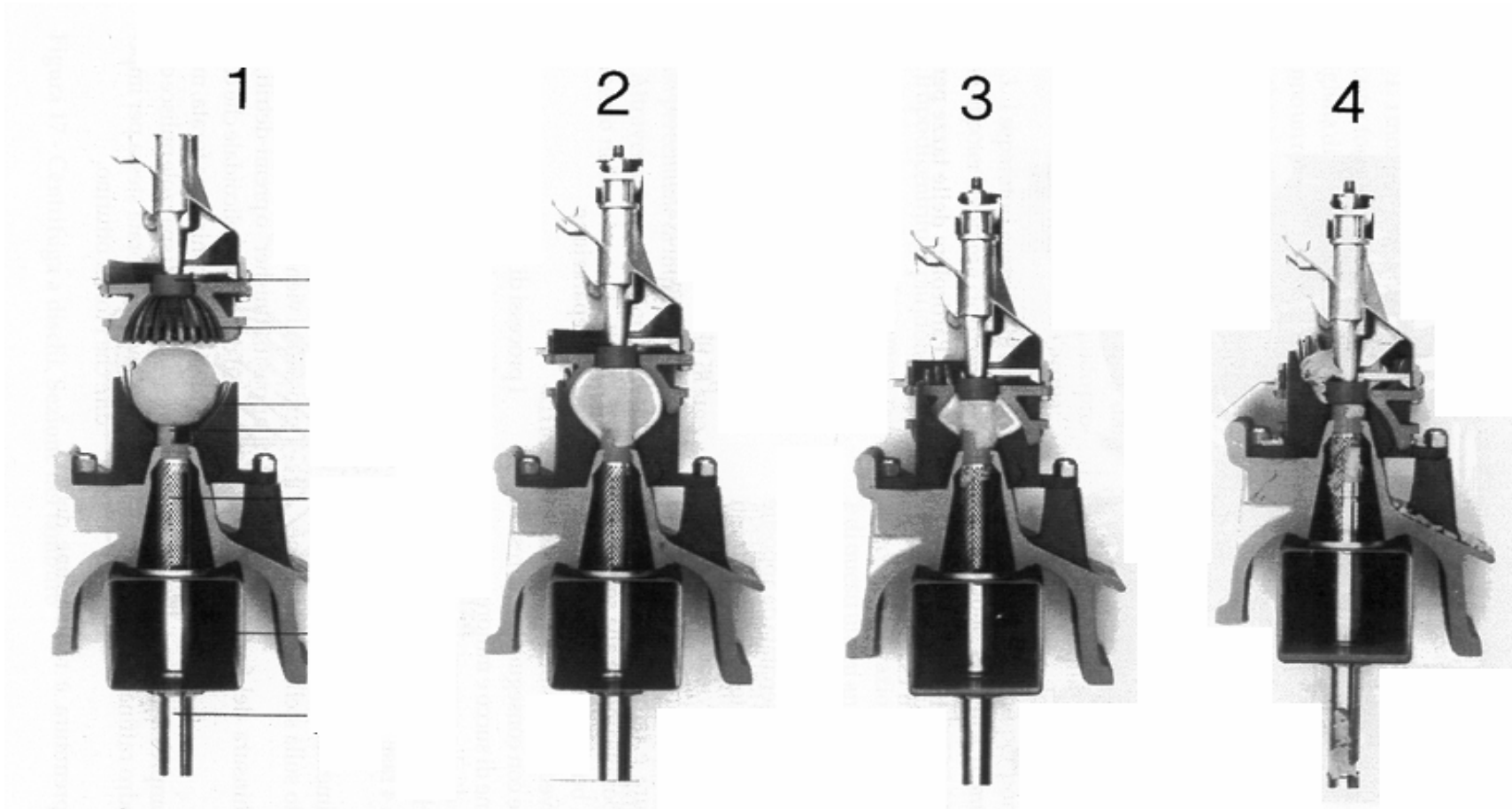
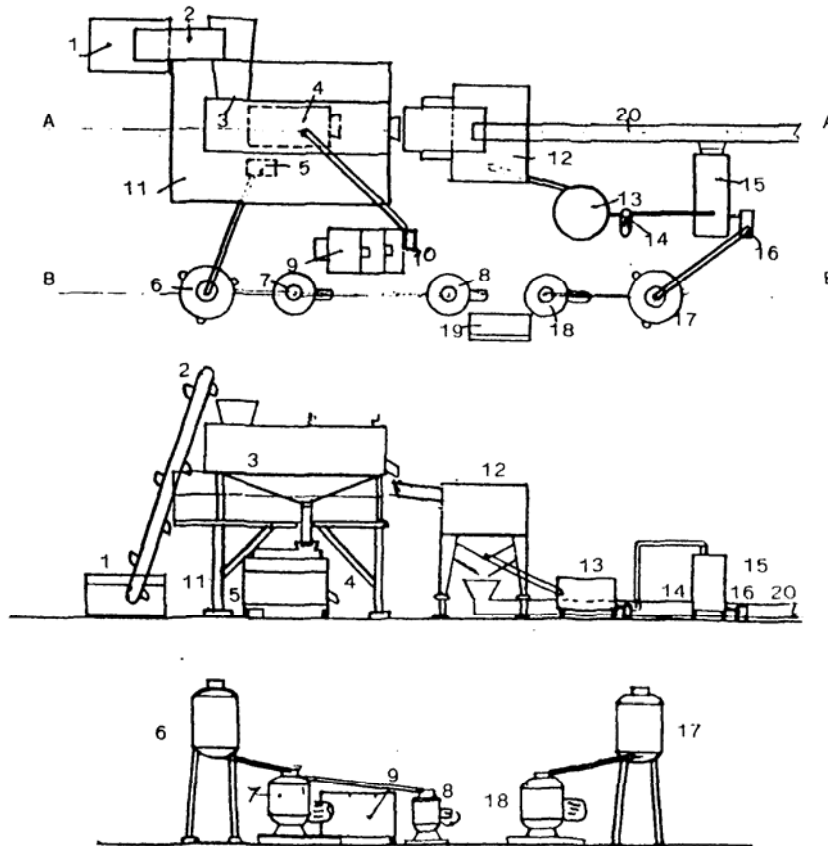


FIGURA I.2.3.4- MÁQUINAS “FMC IN-LINE”



Dibujo n. 156



VISTA DE ARRIBA

VISTA LATERAL AA

VISTA LATERAL BB

- 1) Vaso de alimentación
- 2) Elevador a tazas
- 3) Extractor automático del aceite esencial
- 4) Filtro - prensa rotativo automático
- 5) Bomba de la emulsión aceite - agua
- 6) Vaso de alimentación de la centrifuga
- 7) Separador autolimpiador
- 8) Separador abrillantador
- 9) Vaso de decantación
- 10) Bomba de recirculación
- 11) Palco de acero
- 12) Extractor del jugo
- 13) Vaso del jugo
- 14) Bomba "mono" del jugo
- 15) Refinadora
- 16) Bomba "mono" del jugo
- 17) Vaso del jugo de clarificar
- 18) Clarificador centrifugo
- 19) Cuadro electrico de distribución
- 20) Cóclea de las cáscaras y desechos

FIGURA 1.2.3.5- ESQUEMA DE UNA PLANTA DE ELABORACIÓN CON MAQUINARIA F. SPECIALE

Al mismo tiempo que se ejerce la presión sobre el fruto, se fuerza la introducción del tubo pre-refinador (prefinishing strainer tube) a través de la apertura efectuada por la cortadora inferior. Cuando las copas están totalmente cerradas, las cortadoras superior e inferior se engranan, cerrándose así la apertura superior del tubo pre-refinador, construido de malla perforada que retiene parte de la pulpa y demás fracciones sólidas, impidiendo que se mezclen con el jugo. Un tubo (orifice tube) comienza a subir por el interior, ejerce presión sobre la masa del fruto expulsando el jugo a través de las perforaciones hacia el recipiente que lo recoge (juice manifold). La corteza es expulsada a través de la apertura anular existente entre el diámetro exterior de la cortadora superior y el final de los dedos de la copa superior.

Cualquier resto de zumo en el pre-refinador es extraído por la presión ejercida por el tubo de orificio cuando completa el golpe. Los desperdicios son expulsados a través de la apertura diseñada en la parte inferior del tubo de orificio.

La selección del tamaño de las copas se realiza en función del rango de tamaños de la fruta a procesar. Las extractoras “In line” presentan muy buena eficiencia para los rangos de tamaños de frutos recomendados. Sin embargo pueden ocurrir pérdidas en los rendimientos de zumo y aceite esencial debido a la rotura de los frutos cuando piezas demasiado grandes o pequeñas alimentan una determinada copa. Este problema se reduce mediante la selección por calibrado del tamaño de fruto adecuado antes de la extracción (FMC, 1980).

En la extracción del aceite esencial, la dirección del chorro micronizado producido por el aro atomizador “spray ring”

representa un factor crítico. Por lo tanto los aros, así como el resto de la línea, deben ser limpiados periódicamente para evitar el taponamiento que impida el correcto flujo del chorro de agua. La forma de los agujeros es fundamental para asegurar un flujo de agua uniforme y lineal desde los aros atomizadores.

La cantidad de agua también es muy importante en el proceso de recuperación del aceite, pudiéndose obtener las cantidades necesarias de agua por tonelada de fruto para un óptimo de recuperación, de forma que cantidades menores de agua producirán pérdidas, mientras que cantidades superiores no mejoran el rendimiento.

FMC recomienda determinados consumos de agua dependiendo del tipo de aro atomizador, tamaño de copa y modelo del extractor; así mismo recomienda el uso de aros de 0,063 pulgadas en las aplicaciones de mayor velocidad, y el de 0,049” en las de menor velocidad. El uso de agujeros mayores en los anillos de las máquinas de alta velocidad se debe a que es necesaria más agua en éstas máquinas, ya que está siendo procesada más fruta por minuto, y para poder mantener el chorro micronizado de agua con la dirección y presión adecuadas es necesario incrementar el tamaño de los agujeros.

La presión del agua también es importante. Si es demasiado alta, parte del agua que ha arrastrado aceite podría escapar produciendo pérdidas. Por el contrario una presión baja indica falta de agua en el sistema, y no conseguiría arrastrar correctamente el aceite de la corteza.

La eficacia en la alimentación del fruto a las extractoras es también un factor importante en su correcto funcionamiento. Si ésta no es continua el porcentaje de aceite en la emulsión puede disminuir de forma significativa.

Cotroneo *et al.*(1986) realizan un estudio comparativo de las características de los aceites obtenidos de limones originarios de Sicilia con distintos tipos de maquinas extractoras, concluyendo que el contenido en hidrocarburos totales, monoterpenos y compuestos oxigenados de los aceites esenciales obtenidos por los sistemas “Pelatrice” e “In line” son muy similares. El método “Sfumatrice” produce aceites con mayor contenido en hidrocarburos y menor contenido en compuestos oxigenados, aldehídos y alcoholes que mediante “In line”. El contenido en ésteres apenas presenta diferencias entre los tres sistemas. Los valores CD eran similares para “In line” y “Pelatrice” siendo siempre menores para “Sfumatrice”.

El siguiente paso en el proceso corresponde a la separación de las partículas grandes de pulpa y raspaduras de la piel que acompañan a la emulsión aceite-agua generada por las extractoras. Para ello se hace pasar la mezcla a través de un sistema separador de partículas, que consiste en un tambor tamizador “finisher” con un diámetro comprendido entre 0,20 y 0,27 pulgadas. Las partículas de la corteza (raspaduras o “frit”), son separadas resultando una emulsión aceitosa, con tres componentes: agua, gotas de aceite esencial y sólidos finos que han atravesado el “finisher”.

Para que éste funcione correctamente se deben tener en cuenta el caudal de alimentación y el grado de funcionalidad; se



debe asegurar que el “finisher” empleado tenga capacidad para procesar la mezcla con que es alimentado y retenga los sólidos particulados. La presión del mismo será cuidadosamente controlada, de forma que se consiga una presión intermedia, ya que si es alta muchos sólidos y pectinas pueden ser forzados a pasar a la emulsión, con lo que aumentaría la viscosidad y dificultaría la separación en las centrífugas, y si es muy baja se perdería gran cantidad de agua y aceite esencial expulsados fuera del sistema a través de la corriente de raspaduras.

Usando cabezas de aire o mecánicas se consigue una presión media que permite que la emulsión que va a la primera centrífuga tenga en torno a un 2-4% de sólidos que se pueden separar mediante centrifugación a 4500rpm.

Acoplando dos centrífugas se recupera la práctica totalidad del aceite esencial contenida en la emulsión “ligera” procedente del “finisher” como aceite esencial puro. El paso por la primera centrífuga se conoce como concentración o deslodado o “desludging” y el paso por la segunda como refinado o “polishing”.

La capacidad de separación de una centrífuga ( $V_s$ ) viene dada por la siguiente expresión:

$$V_s = \frac{K \times D^2 \times (\delta_1 - \delta_2)}{v} \times R \times \omega^2$$

Siendo:

D - diámetro de la partícula.

$(\delta_1 - \delta_2)$  - Diferencia de densidad de los medios a separar.

$\nu$  - Viscosidad de la emulsión.

R - Radio efectivo de la centrífuga.

$\omega$  - Velocidad angular de rotación.

K - Constante que depende de la centrífuga empleada.

Los parámetros que determinan la capacidad de separación de una centrífuga son R y  $\omega$ . Así el funcionamiento de la centrífuga depende del diseño de la carga permisible del bolo ("bowl") cuando está girando y la capacidad del bolo depende de la presión debida a la rotación de su propia masa, y la debida a la presión del líquido.

En los bolos pequeños la presión debida a la rotación supone aproximadamente la mitad de la presión total, pero se incrementa significativamente con el aumento del tamaño. La presión del líquido depende del radio del bolo, que puede alcanzar presiones de 100bar en las centrífugas actuales. Por lo tanto, la forma y diámetro de la cubeta, la velocidad de rotación y elección del material del bolo son parámetros fundamentales en el diseño (Dickenson, 1987).

Cuando una mezcla de líquidos y partículas con distintas densidades se introduce en el bolo de una centrífuga, la mezcla entra en una serie de discos empaquetados "disc stack", que reducen la velocidad de flujo, facilitando de esa forma la separación. La capacidad de separación de la centrífuga puede ser expresada como función de la velocidad angular  $\omega$  y de las dimensiones de los discos apilados.

La fase líquida pesada y las partículas de mayor densidad se sitúan en la periferia, y pueden ser descargadas de forma rápida y automática a través de un dispositivo de pistón corredizo “sliding piston”, que cuando se desplaza hacia abajo abre un orificio en la pared exterior del rotor; los sólidos acumulados se expulsan por el efecto de la fuerza centrífuga. El pistón regresa a su posición de cerrado en una fracción de segundo, mientras la máquina sigue girando a gran velocidad. Este sistema está automatizado y puede ser iniciado por un sensor hidráulico del nivel de sólidos en el rotor.

La fase oleosa acumulada en el centro fluye hacia su salida por la parte superior, y según los tipos de centrífuga la fase acuosa puede ser expulsada bajo presión de una bomba centrípeta o por gravedad.

En la etapa del deslodado, la emulsión procedente del “finisher”, es sometida a una centrifugación de alta intensidad, ( $\omega$  entre 800-1000rpm), provocando la separación en tres fases de la emulsión (Kesterson *et al.*, 1971):

- fase acuosa: con muy bajo contenido en aceite.
- fangos: contienen la mayoría de partículas sólidas.
- crema: emulsión con el 70-80% de aceite esencial.

En esta fase pues, se consigue obtener de la primera centrífuga una emulsión con un alto porcentaje de aceite esencial.

Utilizando un tanque de alimentación, se asegura que la entrada de emulsión a esta primera centrífuga mantenga

condiciones de presión y flujo correctos, y se eliminan los volúmenes de aire que pudieran incorporarse desde el “finisher”.

El último paso del proceso de recuperación del aceite en frutos cítricos es el refinado “polisher”. Consiste en pasar la emulsión enriquecida a través de una centrífuga de alta velocidad, que opera entre las 16000 y las 18000rpm, con lo que consigue separar el aceite esencial del agua sobrenadante, decantando al mismo tiempo las partículas sólidas presentes en la emulsión.

La centrífuga refinadora, se alimenta directamente de la primera centrífuga, y pueden utilizar sistemas de control automático, que expulsan los sólidos del bolo, cuando el contenido en el espacio para retirar los sedimentos, alcanza un nivel óptimo (Bott y Schüttler, 1989).

Según FMC (1980) la instalación de sistemas de centrifugación bajodimensionados, contribuye a pérdidas entre el 50-60% de aceite esencial en el sistema, por ello es fundamental instalar sistemas con capacidad suficiente para procesar eficazmente toda la emulsión procedente del “finisher” y evitar así pérdidas importantes de aceite. Tras la centrifugación el aceite esencial de limón, es recogido en un tanque de acero inoxidable, donde floculan las ceras (Kimball, 1991).

Como bpf se considera la centrifugación en centrífugas herméticas (Di Giacomo y Mincione, 1994).

#### **I.2.4- Almacenamiento y conservación del Aceite Esencial.**

Los tanques de acero inoxidable que contienen el aceite esencial, se mantienen a temperaturas comprendidas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-25^{\circ}\text{C}$  durante veinte días en el proceso denominado de “winterización”, para lograr la separación de las ceras, traspasándolo a continuación a bidones de 200L de capacidad revestidos de resinas fenólicas.

Así envasado, se almacena en atmósfera inerte (de nitrógeno o carbónico) y  $+10^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Se ha sugerido, para lograr la máxima estabilidad del aceite esencial, el uso de antioxidantes (siempre subordinado a la legislación vigente), para evitar el enranciamiento de las grasas (Di Giacomo y Mincione, 1994). Esto último, en el caso del limón, no suele ser necesario ya que las propias cumarinas presentes en su composición poseen de forma natural esta actividad antioxidante.

---

El aceite esencial de limón obtenido durante el procesado del fruto, se considera como material aromático de la primera generación. A partir de este material se han creado un bloque de nuevos materiales aromáticos, mediante el uso de distintos procesos fisicoquímicos, que constituyen las sucesivas generaciones dentro de los productos aromáticos y que son:

Productos de segunda generación: Concentrados o “Folded oils”.

Productos de tercera generación: Aceites esenciales deterpenados y desesquiterpenados.

Productos de cuarta generación: “Top notes”, acetaldehído, linalol, valenceno, nootkatonas, fracciones carbonílicas, etc. (Fleisher *et al.* 1987; Pino *et al.* 1993; Kern, 1996).

### **I.3- DETERPENADOS**

La eliminación total o parcial de los aceites esenciales naturales de los hidrocarburos monoterpénicos y de mono y sesquiterpénicos, se denominan respectivamente, deterpenación y desesquiterpenación, se efectúan principalmente con los siguientes fines:

- Aumentar la concentración de los componentes que contribuyen en mayor medida al aroma.

- Incrementar la solubilidad del aceite esencial de limón en etanol, incluso de baja graduación, y así mismo en disolventes aptos para tecnología alimentaria, además los deterpenados son prácticamente solubles en agua a las dosis usadas en la aromatización de las bebidas refrescantes y se elimina el antiestético collarín provocado por los terpenos en la parte alta de la botella.

- Eliminar la aparición de olores desagradables procedentes de procesos como la resinificación y enranciamiento provocados por los hidrocarburos terpénicos.

Los sistemas de deterpenación utilizados son los siguientes:

- 1- Destilación fraccionada a vacío.
- 2- Extracción con disolvente
- 3- Cromatografía de adsorción
- 4- Nuevas tecnologías

### **I.3.1- Destilación fraccionada a vacío**

Consiste en aislar la fracción con mayor proporción en componentes oxigenados. Esto se realiza mediante las siguientes fases:

a) Preparación del décimo, en la que se elimina una notable alícuota de terpenos, mientras la esencia se concentra en una proporción de 10:1 en peso. Se usa para ello un balón de destilación de acero inoxidable calentado por un lecho de vapor, una columna de rectificación con anillos Raschig, un dispositivo de refrigeración a reflujo mediante el paso de agua, que termina en dos colectores para recoger alternativamente las fracciones terpénicas destiladas, debiendo mantener el sistema durante la operación a presiones muy bajas -inferiores a 15mm- (Red, 1976; Di Giacomo *et al.*, 1992).

b) Eliminación del residuo no volátil por arrastre en corriente de vapor, la mezcla de agua y esencia se separa por decantación.

c) Concentración final que se realiza tras una nueva destilación a vacío más bajo que en la primera fase, reuniendo aquellas fracciones que permitan obtener las características deseadas de solubilidad en alcohol, densidad y rotación óptica.

Los rendimientos que se obtienen varían mucho de unos frutos cítricos a otros siendo los más bajos los que corresponden a mandarina (1%), naranja dulce (3%), limón (6%), y muy superiores en el caso de la bergamota (40%) (Di Giacomo, 1974; Calvarano y Di Giacomo, 1984).

### **I.3.2- Extracción con disolvente**

Se lleva a cabo mediante extracción en contracorriente con dos disolventes inmiscibles entre sí, como el pentano y el alcohol metílico diluido. Cada uno de ellos al atravesar el aceite va solubilizando los compuestos solubles -hidrocarburos terpénicos en el pentano, y los compuestos oxigenados en el alcohol metílico- y a continuación se eliminan los disolventes; el pentano se evapora a presión atmosférica, mientras que el alcohol metílico se evapora bajo vacío a temperatura inferior o igual a 55°C.

Cuando se recupera un 80% del alcohol, el líquido residual se diluye en cinco volúmenes de solución salina y la esencia se separa por decantación (Di Giacomo, 1974, Moyler *et al.*, 1992).



Si el aceite esencial deterpenado se ha de destinar a consumo de boca se utiliza alcohol etílico de diferente graduación.

### **I.3.3- Cromatografía de adsorción**

Por éste método se pueden eliminar completamente hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, como adsorbente se usa desde ácido silícico, alúmina, etc. hasta bentonita, tierra de diatomeas, etc.; se hace una primera elución con hexano para arrastrar monoterpenos y sesquiterpenos; como eluyente para arrastrar los compuestos oxigenados que quedan adsorbidos en la columna, se utiliza acetona, éter etílico, acetato de etilo o etanol (Di Giacomo, 1974).

### **I.3.4- Nuevas tecnologías**

La innovación tecnológica se ha orientado a la obtención de mayores rendimientos de aceite esencial así como a la obtención de productos peculiares o de mayor calidad. A nivel industrial los que ya tienen aplicación son:

I.3.4.1- *Procesos de membrana* (Ultrafiltración -UF-, y la Ósmosis inversa -OR-) que se utilizan para separar y concentrar la fracción terpénica sobre todo limoneno. Las membranas operando con UF retienen del 78 al 97% de limoneno presente en el efluente de la centrífuga en una concentración del 0,04% al 0,6%(v/v), la membrana en OR retiene del 87 al 99% del limoneno que está presente en cantidades comprendidas entre 0,06% y 0,23%. El contacto con el limoneno produce una progresiva disminución del

flujo, más o menos drástica según el tipo de membrana, respondiendo mejor las de teflon que las de acetato de celulosa y éstas mejor que las de polisulfonas (Paulson *et al.*, 1985; Di Giacomo *et al.*, 1992).

I.3.4.2- *Tratamiento enzimático* de la emulsión obtenida durante el proceso de extracción en frío de aceites esenciales, que contiene cantidades considerables de sustancias pécticas provocando un aumento de la viscosidad que implica menores rendimientos en la centrifugación, y además éstas sustancias pécticas son responsables de posibles enturbiamientos del aceite esencial; el uso de enzimas pectolíticos, reduce la viscosidad y facilita la separación del aceite esencial y se obtiene más límpido.

El enzima, que se puede añadir en dos puntos del ciclo -en las aguas de recirculación de la primera centrífuga tratadas durante unos treinta minutos con el enzima en ciclo cerrado y en la emulsión de alto contenido en aceite esencial obtenida en la primera centrífuga-, además de aumentar el rendimiento global de la extracción, disminuye el consumo de agua y reduce los volúmenes de efluentes finales, con lo que se producen mayores beneficios económicos (Coll, 1992; Coll *et al.*, 1995).

I.3.4.3- Empleo de la *extracción con fluidos supercríticos* como el anhídrido carbónico que a temperaturas superiores a 31°C y presiones mayores de 74bar, es un fluido capaz de actuar como disolvente en función de su densidad, que es directamente proporcional a la presión e inversamente a la temperatura a que se encuentra; a valores altos de densidad el poder disolvente es mayor, haciéndose más selectivo conforme disminuye (McHugh y Krukonis, 1986; Reverchon *et al.*, 1995; Medina y Martínez, 1997).

Las ventajas de carbónico supercrítico son: la fácil eliminación del mismo en condiciones de presión atmosférica, la baja viscosidad y su gran difusión que permite una buena penetración en el material a extraer, no es tóxico, no es inflamable y su coste es bajo. La matriz a extraer se dispone en cestillos con las superficies superior e inferior de metal sinterizado. El cestillo va inserto en un autoclave termostataado a la temperatura adecuada, el solvente ingresa por un orificio situado en la parte inferior y por un orificio situado en la parte superior sale la disolución.

El CO<sub>2</sub> se introduce a la presión de trabajo mediante una bomba de pistones o de membrana, y se pasa a través de un intercambiador de calor que lo lleva a la temperatura adecuada, así, como fluido supercrítico atraviesa la matriz y en el separador se produce la precipitación de los compuestos extraídos. El carbónico se lleva de nuevo al estado líquido por refrigeración, y se reutiliza. La posibilidad de realizar extracciones en serie, variando las condiciones de densidad del fluido supercrítico, permite fraccionar las distintas clases de componentes del aceite esencial.

Esto se ha realizado sobre corteza de cítricos para extraer aceite esencial utilizando CO<sub>2</sub> a densidad de 0,300Kg/L (temperaturas de 45-50°C y presiones inferiores a 90bar); en el extracto obtenido el residuo no volátil es insignificante. La auténtica innovación no es tanto la extracción de aceite esencial que no resulta competitiva económicamente frente a los métodos tradicionales, sino como uso para la deterpenación de los aceites esenciales por separación en contracorriente y se piensa en su uso en la extracción de la esencia de flores y hojas (Temelli, 1987;

Yamauchi y Saito, 1990; Mincione *et al.*, 1991 y 1992; Poiana *et al.*, 1992 y 1993).

#### **I.4- ALCOHOLATOS**

Los extractos alcohólicos de los aceites esenciales se conocen comúnmente como alcoholatos o aromas solubles, y revisten particular interés en los sectores industriales de bebidas y perfumería, ya que al ser solubles en fase acuosa, permiten la aromatización de bebidas y siropes, además poseen mayor resistencia a fenómenos de oxidación, y mayor proporción de los componentes que más contribuyen al aroma, que en el aceite esencial de partida.

Se obtienen por extracción con alcohol de baja graduación - entre 60 y 80°- durante quince a veinte minutos, repitiendo la operación varias veces. Los extractos de mayor graduación, poseen mayor concentración aromática y recuerdan mucho al del aceite esencial de partida, los de baja graduación tienen un contenido elevado en componentes oxigenados y terpenos y permiten obtener distintas tonalidades como aromatizantes (Di Giacomo y Mincione, 1994).

También se preparan alcoholatos por maceración directa de fracciones de corteza o de residuos con todo el aceite esencial en disoluciones etanólicas que posteriormente se separan y se someten a destilación con columnas de rectificación hasta diferentes grados de concentración.

## **I.5- AROMAS EN POLVO**

La producción de las llamadas esencias en polvo, se basa en la ya conocida técnica de microencapsulación por “spray drying” (secado por pulverización). Se forma una microemulsión estable de la sustancia aromática y el componente que va a servir de revestimiento y a continuación se pulveriza para obtener el producto microencapsulado. Los materiales empleados para el revestimiento son polímeros orgánicos, gomas y gelatinas modificadas. La elección dependerá del tipo de maquinaria disponible, de las condiciones necesarias para la formación de la emulsión estable, con una viscosidad aceptable y a baja concentración, y si su destino es el uso alimentario debe estar permitido como aditivo con este fin.

La proporción de materia seca en la emulsión varía entre un 25 y un 50%, y el producto obtenido es en la mayoría de los casos soluble en agua; si se quiere obtener microcápsulas hidrófobas, se puede usar como material de revestimiento amidas oportunamente modificadas.

Las ventajas que los aromas microencapsulados ofrecen se pueden resumir en la protección de la fuerza y calidad del aroma de la evaporación y la oxidación incluso a temperaturas elevadas y durante periodos superiores a un año; el producto microencapsulado se puede añadir directamente a mezclas sólidas (en polvo), obteniendo fácilmente mezclas homogéneas.

Por su escaso contenido en humedad no sufren contaminación bacteriana y se mezclan fácilmente con productos

alimentarios desecados; al no ser higroscópicos se mantiene el polvo suelto sin aglomerarse largo tiempo (Kopeland *et al.*, 1977; Crocker y Protchett, 1985; Bangs y Reinecius, 1990; Huet, 1991, Di Giacomo y Mincione, 1994).

## **I.6- ACEITE ESENCIAL OBTENIDO POR DESTILACIÓN**

Poco antes de la I Guerra Mundial, aparece en Palermo la primera aplicación de la destilación para recuperación de aceite esencial de limón. Este método conocido con el nombre de su autor -Peratoner- consiste en el triturado y prensado de los frutos, seguido de la destilación en corriente de vapor del líquido obtenido, separando la esencia por decantación. La esencia de característico olor empireumático y escasa calidad respecto a las obtenidas por expresión en frío, presentaba fenómenos de hidratación de monoterpenos y otros hidrolíticos, formando alcoholes como  $\alpha$ -terpineol, terpinenol-4, linalol y nerol, así como la formación de metil-heptenona procedente del citral (Calvarano y Di Giacomo, 1984).

El método Peratoner se limita en la actualidad al tratamiento de las cortezas, ya privadas de la mayor parte de la esencia, y que prensadas a intensidades cada vez mayores y con la ayuda de pequeñas cantidades de agua, producen un líquido que se destina a destiladores fabricados en acero inoxidable que operan con bombas de vacío, en corriente de vapor y una temperatura no superior a 60°C (Di Giacomo, 1987).

Los aceites obtenidos por arrastre en corriente de vapor "Stripper oils" de los efluentes de las centrifugas de obtención del aceite esencial prensado en frío, son los que se recuperan al hacer pasar una corriente de vapor de temperatura comprendida entre

110°C y 132°C, que arrastra de 0,1 a 1,2% de aceite a una zona donde tiene lugar la evaporación a muy baja presión. Los vapores condensados se separan mediante decantación. Estos aceites destilados en condiciones de vacío tienen mayor calidad aromática que los obtenidos por destilación a presión atmosférica (Kesterson y Braddock, 1976).

Prácticamente es un método el de destilación por arrastre con vapor de agua que se emplea para recuperar el aceite esencial residual de los desperdicios del proceso general de elaboración del limón y aunque la esencia obtenida es de una calidad claramente inferior a la obtenida por extracción en frío tiene una demanda que justifica su elaboración. Además constituye el método aplicado para la recuperación de los constituyentes volátiles de otras partes del vegetal como hojas (nerolí de limón) y de tallos y brotes (petit grain de limón).

### **I.7-ESENCIAS DEL ZUMO.**

Durante el procesado de los zumos pasteurizados y en la obtención de concentrados de zumos, se ve necesaria la eliminación en los mismos, de pequeñas cantidades de constituyentes volátiles presentes, derivados del tratamiento del fruto completo en dicho procesado. En zumo final no debe existir una cantidad superior a 0,015-0,02% en volumen de aceite esencial, sin embargo el zumo procedente del extractor, puede contener más del 0,05%, especialmente cuando el fruto es sobreextraído o dependiendo del tipo de tratamiento seguido en la extracción del zumo. El exceso de aceite puede eliminarse (deoiling)

por desaireación en caliente y a vacío e incluso por destilación en corriente de vapor, y ser recuperado (Hendrix y Redd, 1990).

El inconveniente del arrastre del aceite presente en el zumo, es que éste no se encuentra libre como gotas, sino absorbido en las partículas de pulpa (Scott *et al.*, 1965). La cantidad de aceite que se elimina se controla por el “flash” a través de la temperatura y el vacío que se provoca en el separador de vapor. La eliminación del aceite es especialmente importante en el procesado del zumo pasteurizado en una sola etapa o zumo enlatado, siendo desarrollada como parte integrante de dicho proceso (Rebeck, 1990).

Los volátiles recuperados durante la obtención de concentrados de zumo se conocen como *esencias*. En cítricos estas esencias se dividen en dos fases -hidrosoluble y liposoluble-. La porción hidrosoluble se conoce como *aroma* o *esencia de fase acuosa*, y la fracción liposoluble como *esencia oleosa* o *esencia de fase lipídica* del cítrico correspondiente. Ambas fases tienen las notas del aroma características del zumo fresco del que provienen y se utilizan en la industria para realzar el aroma de los concentrados, poseyendo la ventaja de que la legislación los contempla como parte integrante del fruto completo del que derivan y no se precisa declararlos como añadidos (USFDA, 1982, 1984 y 1988; Red *et al.*, 1986, 1992 y 1996).



## **I.8- SISTEMAS INDUSTRIALES DE CONCENTRACIÓN DEL AROMA**

Morris (1970) define evaporar como “convertir o pasar a vapor, extraer en forma de vapor, extraer de una mezcla, etc.”. Webster (1967) lo define como “*transformar* en vapor o en partículas diminutas invisibles”. Bennett (1974) dice que es el “cambio del estado de líquido a gaseoso a temperatura, cercana al punto de ebullición”.

Otras definiciones relacionadas que podemos encontrarnos son las siguientes: “rango de evaporación” volumen evaporado en un instante dado, por unidad de área y tiempo; “evaporador multiple-effect” series de cuerpos evaporadores tan conectados, que el vapor de uno es el medio de calentar el siguiente.

Redd y Hendrix (1993) comentan como Bristow en los principios de la industria de concentrados cítricos, cuando aún se producía el concentrado de naranja con evaporadores a vacío, a escala de laboratorio, colaborando con Skinner, fabrica el primer evaporador a escala industrial, logrando que sea operativo industrialmente en 1937.

Chen (1982), describe varios tipos de evaporadores usados en la industria cítrica de Florida, desde sus comienzos. Los evaporadores a baja temperatura usados en los años cincuenta, son del tipo “single effect single pass” un sólo paso un sólo efecto, “single effect” con recirculación, recirculación con un sólo efecto y “multiple effect” con recirculación los de recirculación y efecto múltiple. Estos evaporadores operaban en un rango de

temperatura comprendido entre los 18°C y los 50°C. (Kelly y Schwarz, 1955).

El evaporador de la “Citrus Commission” de Florida (Atkins *et al.*, 1950), es un ejemplo temprano de diseño de baja temperatura.

Los tipos de evaporadores de vacío a baja temperatura según Ashrae (1971), son:

1- Tipo Mojonnier - la evaporación se induce bajo vacío, mientras el zumo se calienta, por la condensación con refrigerante (nitrógeno). Esto recibe el nombre de contacto directo con el refrigerante.

2- Tipo Kelly- el zumo se calienta por circulación de agua caliente y el vapor del zumo se condensa evaporando al refrigerante; a esto se le llama, contacto indirecto con el refrigerante.

3- Sistema de recompresión de vapor- el vapor se comprime a más alta temperatura y presión, y se usa para evaporar más zumo.

4- TASTE- Los evaporadores que operan según el principio de altas temperaturas durante poco tiempo, tienen unidades con superficies tubulares o planas. “Thermally accelerated short time evaporators” (TASTE), operan en rangos de temperaturas comprendidas entre 95 y 105°C, a causa del corto tiempo de exposición al calor, el evaporador TASTE se sitúa definitivamente como la mejor tecnología de recuperación en cuanto al aroma en zumos concentrados (Welch, 1989 A y B).

La transferencia de calor a un producto que pasa a velocidades extremadamente altas en un medio no confinado, da como resultado un tiempo muy bajo de permanencia, y elimina los problemas de calentamiento localizado. Además la exposición al calor se reduce por el hecho de que estos evaporadores son generalmente de un solo paso. El producto concentrado así obtenido presenta un aroma superior y otros factores de calidad (Cook, 1963).

El “boom” de la tecnología de aromas cítricos, se produce cuando se comprueba que el TASTE, es excelente para recuperar la fragancia de los constituyentes volátiles que generalmente se pierden en la atmósfera y/o con la eliminación del agua a través de las unidades de recuperación de esencias (Jones, 1968; Redd, 1988). El evaporador TASTE con recuperación de esencias, es un medio excelente para recuperar y reincorporar el aroma fresco a los productos procesados.

La configuración del flujo de zumo es esencial para la recuperación de una buena esencia, ya que determina a que temperatura es susceptible el zumo de ser separado de su esencia. El rango de recuperación y la calidad de la esencia se ven afectados por esta configuración.

Una contribución definitiva se debe a Gumaco (Odío y Tope, 1989; Odío, 1995), que mejora el proceso de la siguiente forma:

- un sistema de decantación muy eficiente y una unidad de esencia rediseñada para evitar el paso del aceite a la columna de separación. Se recupera así todo el aceite esencial.

- una columna de rectificación nueva diseñada usando la tecnología de la industria petroquímica, que descarga los finales de la columna que permanecen virtualmente libres de compuestos aromáticos.

- un sistema muy eficiente de arrastre, para atrapar el mayor número posible de compuestos de bajo punto de ebullición- la nueva columna de rectificación permite concentrar los aromas hasta un nivel tan elevado como un 40% de alcohol, esto hace los aromas más estables y menos costoso el almacén y transporte-, la nueva legislación permite estas elevadas concentraciones, con lo que la opción es bastante interesante.

Es necesario evaluar la calidad y fuerza de la esencia recuperada para asegurar la uniformidad de la mezcla cuando se produce la restauración (Johnson y Vora, 1983), como la mayoría de las pequeñas empresas con evaporadores no tienen a su alcance técnicas sofisticadas de análisis como la cromatografía de gases, tienen que recurrir a métodos de determinación rápida como los que Attaway *et al.* (1966) proponen de la estación experimental de "Lake Alfred" y descritos en el "Quality Control Manual for Citrus Processing Plants" Vol.III (1996).

## **II- CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL**



El aceite esencial de limón es, según la USP XX, un aceite volátil obtenido de exprimir, con o sin ayuda de calor, la corteza en fresco del fruto del limonero *Citrus limon* (Linneo) N.L. Burmann, con o sin separación previa de pulpa y corteza. En la norma ISO 855 (1981), se define como el aceite extraído sin calentar, mediante el tratamiento mecánico, del pericarpio fresco del fruto de *Citrus limon* (Linneo) N.L. Burmann. Sus características están íntimamente relacionadas con su composición química.

## II.1- FLAVOR

Para la valoración de un aceite esencial, el examen organoléptico constituye un test de fundamental importancia, una primera observación del aspecto, color, turbidez, olor, permite poner en evidencia posibles alteraciones, presencia de sustancias extrañas, grado de envejecimiento, etc.

El grado de aceptación depende sobre todo del olor, ya que de una u otra forma, es el aspecto primordial para su comercialización y por otra parte resulta el más complejo de definir, por ello debe ser examinado por un grupo de expertos que controlan el aroma que se desarrolla en el tiempo en una tira de papel absorbente empapada con el aceite esencial que se examina. Este, en nuestro caso, es el característico del pericarpio fresco de limón (Di Giacomo, 1974; ISO 855, 1981).

Fellers (1980) describe cuantiosos problemas en la investigación de la evaluación sensorial en *Citrus*, tales como la cantidad y calidad de los materiales de potenciación utilizados (aceites de expresión en frío y esencias), evitando los inmaduros, los de bajos Brix en acidez y los no amargos. Técnicas que utilizan la rueda de aroma y patrones de reconocimiento describen también los atributos “*off-flavor/off-odor*” que se deben evitar.

En zumos cítricos se han desarrollado modelos e investigación sobre zumo estándar, para consultar la opinión del consumidor. A veces, por ejemplo, probando zumo de pomelo no amargo, surgen problemas de solubilidad en la dispersión de la limonina, insoluble en agua, en mezclas acuosas y también en la



adición de naringina. Algunas veces, a causa de la cantidad de variables en el procesado de los zumos de *Citrus*, el uso de un zumo estándar como guía de la evaluación sensorial no resulta práctico.

Las primeras variables son las diferencias de variedad, madurez y estación, extracción y/o presión final, potenciadores como zumo “*cut-back*” y/o esencias y aceites de presión en frío, etc. incluso el uso de un lavado en línea de los sólidos de la pulpa puede que, en algunas ocasiones, conduzca a problemas con el aroma. Por supuesto la higiene y el uso de materia prima sana, minimiza la variable microbiológica de degradación.

Los aceites de expresión en frío pueden oxidarse, lo que se atribuye a la autooxidación del d-limoneno, constituyente mayoritario (Braddock *et al.*, 1986). Otros autores como Buckholz y Daun (1978) describen el esquema de esta oxidación como:



El zumo y el aceite esencial pueden ser evaluados y controlados sensorialmente y mediante análisis instrumentales (González *et al.*, 1986). Como el tiempo y temperatura de almacenaje y otras variables son tan importantes en los procesos oxidativos mencionados es fundamental establecer y mantener un buen sistema para la materia prima. Los productos instaurados y, especialmente, los productos en fase de investigación y desarrollo, se replantean continuamente su composición y procesos de producción para permanecer competitivos en el mercado.

El coste del material, repuestos, las cosechas y otros problemas forzarán estos cambios. La División Sensorial del IFT sugiere algunas opciones (Dethmers *et al.*, 1981), como son:

Mejoras en el producto: La mejora real de un producto se puede medir de muchos modos. La siguiente es una secuencia lógica de prueba. 1º. Test diferenciales para determinar hasta que punto el producto experimental es diferente del control (si no es diferente, no puede ser mejor). 2º. Test de aceptación, para establecer hasta que punto el producto difiere y gusta lo mismo o más que el producto control.

Proceso de cambio: Un proceso de cambio debiera mantener o mejorar el producto. La secuencia es similar a la de la mejora del producto. 1º. Test diferenciales para determinar hasta que punto el producto experimental es diferente del control (si no difiere, no puede ser peor). 2º. Test de aceptación, igual que en la mejora del producto.

Desarrollo del nuevo producto: En el desarrollo de un nuevo producto Köster (1990) prefiere una descripción cuantitativa como mejor modo de evitar errores. Aunque el coste es alto, se realiza con un número de consumidores cercano a 60.

### **II.1.1- Factores que afectan al aroma de frutos cítricos y sus productos.**

Los componentes volátiles del zumo de limón han sido ampliamente estudiados entre otros por Dougherty (1968); Huet (1969 y 1981) y Mussinan *et al.* (1981). Estos últimos extraen a

mano cuidadosamente el zumo para minimizar la incorporación del aceite de la corteza. Tratando el zumo con etanol para prevenir las reacciones enzimáticas, extraen la mezcla con freón 11, concentran el extracto y usan analistas entrenados para evaluar el extracto y asegurar la presencia de un aroma y “flavor” de zumo fresco, identificando trescientos componentes, entre los que aparecían éteres, uno de ellos es el p-cimen-8-il,etil éter de aroma semejante al zumo de limón. Sólo detectan un compuesto sulfurado, dimetil sulfito, empleando fotometría de llama sensible a compuestos sulfurados.

El componente más importante del aroma de limón es el citral, mezcla de geranial y neral. En la corteza de limón la proporción es aproximadamente 40% neral y 60% geranial, mientras que en el zumo el citral contiene 5% neral y 95% de geranial.

### **II.1.2- Componentes volátiles importantes para el aroma de productos cítricos**

Aunque el limón no se consume de igual forma que la mayoría de cítricos, probablemente tiene mayor variedad de usos: culinarios, bebidas, aplicaciones medicinales e industriales, que ninguna otra fruta; es probablemente el tercer condimento más ampliamente utilizado tras el azúcar y la sal, para ensalzar los aromas inherentes a la comida (Swisher y Swisher, 1980). El aceite de limón extraído en frío tiene tantas aplicaciones como el zumo por su uso generalizado en alimentos, refrescos, cosméticos, fármacos y productos de uso doméstico

(ambientadores, limpiadores, etc) (Safina, 1971 y 1984; Laencina, 1983; Carter, 1993).

Los actuales métodos de procesamiento para obtener, aceite esencial exprimido en frío, zumo, y zumos concentrados congelados y aditivos, han sido revisados por Carter en 1993.

La composición del “cold-pressed lemon peel oil” se ha estudiado a lo largo de los años en un esfuerzo para determinar la mezcla de constituyentes básica para un aceite de limón de alta calidad. Los constituyentes del impacto del aroma en su mayoría se deben, como ya hemos dicho anteriormente, al citral, su contenido en el aceite esencial se usa como índice de intensidad de aroma. El Food Chemical Codex especifica un rango entre 2’2-3’8 % total de aldehídos expresados como citral para el aceite esencial de limón de California.

Gunther (1968) estudió la composición de diecinueve aceites comerciales con cantidades de componentes específicos variables y concluyó que el aceite de mayor calidad era uno de California con una cantidad de citral relativamente baja (2%), y porcentajes relativamente altos de  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, bergamoteno, cariofileno, geraniol y acetatos de geranilo y nerilo. Por otra parte según Maarse y Visscher (1989) el rango de valores de citral en aceite esencial de limón puede variar entre un 2-13%, aunque este último valor es difícil pensar que corresponda a un producto genuino.

En un estudio más reciente de 85 muestras de aceite de siciliano, se compara la calidad y composición de los aceites procedentes de varios métodos de extracción Cotroneo *et al.*

(1986). Los aceites de mejor calidad aromática poseían también elevados niveles de constituyentes oxigenados como linalol, nerol y citronelol,  $\alpha$ -terpineol y terpinen-4-ol, y especialmente, aldehídos como geranial y neral.

Un programa llevado a cabo por un grupo de investigación de “International Flavour and Fragrances”, determina varios constituyentes traza del zumo de limón que poseían aromas y flavor característicos de cítricos y/o limón fresco (Mussinan *et al.*, 1981). Aproximadamente el 14% de los compuestos no cuantificados fueron posteriormente caracterizados. Cerca de la mitad (7,1%) eran una mezcla de alcohol fenchílico, terpinenol-4,  $\alpha$ -terpiniletiléter, carveol y acetato de  $\alpha$ -terpenilo. El 7% restante contenía constituyentes traza, que incluían dieciocho derivados de dimetil y etiléteres de monoterpenos.

Una fracción neutra de estos (16,1g), se divide en una fracción hidrocarbonada (8,96g) con un ligero aroma a limón, y una fracción oxigenada (5,79g) con el aroma característico del zumo de limón; las notas más fuertes descritas tanto de aroma de limón como de cítricos las poseen los cuatro éteres monoterpénicos: 8-p-cimeniletiléter (zumo de limón), linaliletiléter (corteza de cítrico), mircenilmetiléter (terpenos de cítricos) y fenchiletiléter (cítrico).

También poseen un aroma de limón los isómeros epijasmonato de metilo y jasmonato de metilo, siendo este último el más estable, excepto cuando la proporción es de 95:5 que se favorece la estabilidad del primero. El epijasmonato de metilo ha sido determinado en limón y en un insecto en el que

fue aislado previamente (Nishida y Acree, 1984 y Acree *et al.* 1985).

Los niveles umbrales de epijasmonato de metilo en agua son de 3ppb. En una aproximación, según datos de Nishida y Acree, la cantidad presente en los volátiles de limón es cien veces mayor que la umbral del aroma. Por tanto este compuesto contribuye al aroma de limón.

El aceite esencial de limón es el aceite cítrico más ampliamente usado e históricamente es uno de los más valorados junto al de lima. Hasta hace poco, tras la extracción del aceite, los restos del fruto incluido el zumo se consideraban desechos del procesado de obtención del aceite. (Carter, 1993). La estabilidad del aceite de limón durante el almacenaje y como agente aromatizante en bebidas ácidas, se ha estudiado extensamente. El neral y el geranial presentes en el aceite de limón se degradan a varios intermedios de dos compuestos “off-flavour”: p-cimeno, y  $\alpha$ -p-dimetilestireno. (Kimura *et al.*, 1983, Laencina *et al.*, 1988).

Otros constituyentes del aceite de limón se muestran como precursores de compuestos “off-flavour”, como  $\gamma$ -terpineno precursor del p-cimeno (Ikeda *et al.*, 1961). Schieverle y Grosch (1988) determinan que linalol, neral y geranial se degradan a p-cimeno y otros que incluyen p-cresol y p-metilacetofenona. Peacock y Kuneman (1985) muestran que el citral es inestable en bebidas carbonatadas en cantidades de 3ppm, degradándose a p-cimenil-8-ol y  $\alpha$ -p-dimetilestireno, dos compuestos que dan mal aroma al zumo de limón. Esto se podría retardar aumentando el pH, reduciendo la temperatura de almacén o

añadiendo ácido isoascórbico. El uso de antioxidantes para retardar esta degradación no ha tenido éxito.

El aroma y el aceite esencial natural del limón son productos comerciales que parecen tener una aplicación comercial limitada. Moshonas y Shaw (1972) identificaron veintisiete componentes del aroma de limón, algunos de los cuales se conocen por contribuir al aroma fresco de los zumos cítricos: acetaldehído, acetato de etilo, Z3-hexenol, con la presencia de neral y geranial. El aroma comercial de limón se vende concentrado 500 veces. Una muestra típica tiene un contenido mínimo de alcohol de un 4% (Tastemaker, 1994).

### **II.1.3- Alteraciones del aroma durante el almacenamiento**

En el estudio del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la fracción aromática del zumo de cítricos se han de considerar tanto las condiciones de almacenaje del fruto como del zumo ya que ambos, en condiciones usuales de trabajo, son almacenados previamente a su utilización (Lund *et al.*, 1981; Graumlich *et al.*, 1986).

Los frutos cítricos una vez cosechados sufren pérdidas de peso por respiración y progresivas deterioraciones, como consecuencia de acciones bacterianas y fúngicas y según las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. Tales efectos perjudican enormemente al sabor, aroma y apariencia del producto y son responsables a veces de cuantiosas pérdidas económicas.

Diferentes técnicas han sido diseñadas para prevenir estos cambios y deterioros, tales como almacenamiento frigorífico en atmósfera controlada y almacenamiento hipobárico (Grierson y Ben-Yeshohua, 1986), aunque estos métodos resultan muy costosos. Un sistema alternativo o complementario es la aplicación de ceras y otras capas protectoras y contenedores (Kester y Fennema, 1986).

Durante el procesado el zumo de limón sufre importantes pérdidas de componentes volátiles pasando de 612mg/Kg en el zumo procedente directamente de la extracción a 268mg/Kg en el concentrado, referidos a jugo simple. Ello no supone una pérdida proporcional de todos los componentes sino que depende de sus distintas volatilidades y estabilidades - formándose unos compuestos a partir de la degradación de otros- y del reparto de los mismos entre el zumo y la pulpa.

Si se emplea como marcador el limoneno se observa una pérdida total del 53%, la mayor parte en el proceso de concentración (23%) y en menor medida en la desaireación y centrifugación (14% y 10% respectivamente), por tanto se constata que los componentes volátiles se pierden en su mayoría debido a los tratamientos a vacío.

En los sistemas evaporadores con recuperación de aromas se obtiene la llamada esencia que en el caso del limón está compuesta en su mayoría por limoneno, mirceno y  $\gamma$ -terpineno (Moshonas y Shaw, 1972)

Según Radford *et al.*(1974) la distribución de componentes volátiles entre pulpa y suero del zumo es mayoritariamente de



hidrocarburos terpénicos y sesquiterpénicos en pulpa, mientras que los compuestos oxigenados se encuentran en su mayoría disueltos en el suero.

Es bien conocido que el citral en medio ácido, como ocurre en concentrados o bebidas alcohólicas de limón, se deteriora este componente de gran importancia en aceite esencial de limón se cicla rápidamente a p-cimeno y p-dimetilestireno, responsables del “off-odor” producido (Iwata *et al.*, 1978). El deterioro no se produce por acción del oxígeno, (Kimura *et al.* 1983) realizan el estudio, en presencia y ausencia de oxígeno, del deterioro del citral en disolución acuosa de ácido cítrico, comprobando que no hay diferencia en la producción de p-cimeno, p-cimeno-8 y  $\alpha$ -p-dimetilestireno, así mismo no son efectivos los antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol, BHT o BHA, en hacer que disminuyan las concentraciones de dichos productos de oxidación.

En la elaboración del concentrado de zumo de limón se degradan casi totalmente pasando hasta únicamente un 3% y 1% de neral y geranial respectivamente, observando que es el geranial -el de mayor contenido inicial- el que sufre pérdidas de mayor cuantía, quizás más por su degradación en el calentamiento que por su volatilización. Así mismo los ésteres y los hidrocarburos sesquiterpénicos se conservan mejor que el resto y se observa también aumento de  $\alpha$ -terpineol (Núñez, 1988).

Newmann *et al.* (1992) comprueban los mecanismos de deterioro (autooxidación) inducidos por la luz en aceites esenciales y productos alimenticios, en los que actúan como

aromatizantes, que provocan transformaciones irreversibles por fotólisis de sus componentes cuando no son almacenados en condiciones adecuadas y se exponen a la luz ambiental.

Una vez el zumo de limón ha sido procesado las modificaciones químicas acaecidas durante el almacenamiento son la desaparición total de geranial y neral, probablemente a consecuencia de las reacciones de ciclación y oxidación catalizadas por el pH bajo; los hidrocarburos sesquiterpénicos parecen presentar relativa estabilidad, sobre todo bisaboleno, aunque disminuyen todos al cabo de 12 días almacenados a 45°C.

Los ésteres se comportan de forma semejante y su degradación puede ocurrir por saponificación en medio ácido con liberación de alcohol. El limoneno presenta una velocidad de degradación seis veces superior a 45°C que a 30°C y además aparecen dos componentes que no están presentes en el zumo de partida que son fenchol y carveol que aparecen en los primeros días de almacenamiento (Núñez, 1988)

Así mismo se detecta la presencia de derivados furánicos, ácidos hidroxicinámicos y otros productos derivados por transformaciones de los componentes del aceite esencial incorporados durante el procesado industrial.

Los derivados de los furanos han sido identificados como productos de degradación asociados con el pardeamiento en productos cítricos; desde el punto de vista sensorial contribuyen al aroma y están principalmente asociados con el olor dulce, frutal, acaramelado... Aparentemente determinan el

pardeamiento desarrollado durante el almacenamiento, siendo furfural e hidroximetilfurfural los dos derivados más abundantes en los zumos cítricos.

El furfural es el componente más utilizado como indicador de la calidad del zumo, ya que su contenido en el zumo fresco y procesado puede ser considerado nulo frente a las cantidades detectadas en los zumos con un almacenamiento prolongado (Nagy y Randall, 1973). Este componente proviene de la degradación anaeróbica del ácido ascórbico, no estando relacionado con el desarrollo del olor de los zumos envejecidos, sino como indicador de un tratamiento térmico excesivo (Maraulja, *et al.*, 1973), ya que el valor umbral de detección del furfural en zumo es aproximadamente de 80 ppm y este valor es bastante más elevado que el que puede ser detectado en un zumo envejecido; legislativamente su contenido es mucho más bajo, del orden de 30 ppm.

El hidroximetilfurfural, es un aldehído cíclico formado por la deshidratación en medio ácido de hexosas cuando son sometidas a elevadas temperaturas. Siempre en condiciones de fabricación higiénicas un elevado contenido en este compuesto indica un excesivo tratamiento térmico durante la concentración o la pasteurización (Núñez, 1988; Lee y Nagy, 1996). Este componente es considerado como un precursor del pardeamiento en los zumos cítricos y está relacionado con la pérdida del color de los mismos.

En los zumos de frutas la concentración y tipo de azúcares, la cantidad y estructura de los aminoácidos, pH, así como empaquetado, almacenamiento y las reacciones con otros

compuestos pueden llegar a afectar a la producción de hidroximetilfurfural durante el procesamiento y el almacenamiento de los zumos de frutas.

Lee y Nagy en 1988 detectan en el zumo de pomelo envasado en botes de cristal y enlatado un aumento considerable del contenido en hidroximetilfurfural, siendo función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Así mismo, estos autores, en 1996, estudian el crecimiento gradual de la concentración de este componente sobre zumo de naranja concentrado y almacenado a temperaturas de 5 y 24°C. El contenido inicial de hidroximetilfurfural es de 0,03 ppm, detectándose en el zumo almacenado durante 22 semanas a 24°C un aumento de la concentración alcanzando 3 ppm, frente a 0,2 ppm detectadas en el zumo almacenado a 5°C.

Durante el procesamiento y almacenaje de los zumos cítricos, la descarboxilación catalítica en medio ácido de los ácidos hidroxicinámicos conducen a la formación de vinil-fenoles; así la descarboxilación del ácido p-cumárico produce p-vinil-fenol la del ácido ferúlico y p-vinil-guayacol, dos derivados que han sido detectados por Lee y Nagy (1996) en los zumos cítricos procesados. Los vinil-fenoles son compuestos de olor desagradable con un umbral de detección bastante pequeño, llegando su presencia a afectar a la aceptabilidad del zumo cítrico.

El 4-vinil-guayacol, imparte al zumo enlatado de naranja olor a envejecido o podrido a niveles de 0,075 ppm (Tatum *et al.*, 1975). Estos autores estudian la degradación durante el almacenamiento de los productos formados en zumo de naranja

enlatado, detectando compuestos de degradación como  $\alpha$ -terpineol, 2,5-dimetil-4-hidroxy-3-(2H)-furanona y 4-vinilguayacol, formados durante doce semanas de almacenamiento a 35°C, cuya contribución sensorial resulta negativa. El 4-vinilguayacol cuando es adicionado al zumo control imparte una característica de zumo envejecido que resulta más desagradable que los otros dos componentes.

No obstante, la eficacia de este componente como indicador de la degradación cualitativa de los zumos no es adecuada ya que, según lo expresado por Naim *et al.* en 1988, solamente trazas de este componente son detectadas en el zumo de naranja por la degradación del ácido ferúlico, cuando el pardeamiento no enzimático en el zumo ya es evidente. Estos autores también aseguran que se degrada de forma significativa durante el almacenaje prolongado a elevadas temperaturas.

Lee y Nagy en 1990, estudian la formación y degradación de este componente destacando que aumenta su concentración en el tiempo a elevadas temperaturas de almacenamiento, seguido de una disminución cuando la temperatura alcanza los 50°C. Esto es debido a que el 4-vinilguayacol actúa como sustrato de conversión en otros derivados fenólicos o bien este componente se polimeriza dando lugar a la formación de oligómeros.

La presencia de aceites esenciales en los zumos cítricos contribuye a mejorar los aromas y el sabor de estos productos, no obstante, bajo condiciones inadecuadas de procesamiento, almacenaje y empaquetado algunos de sus componentes se degradan dando lugar a la aparición de sustancias que aportan un aroma no deseado (Lee y Nagy 1996).

Estas reacciones de degradación en su mayoría son catálisis ácidas en medio, acuoso en las que tienen lugar reacciones de hidratación, deshidratación, ciclaciones e hidrólisis (Clark y Chamblee, 1992). Los compuestos oxigenados así formados proceden de reacciones de adición química de moléculas de agua, no por reacciones de oxidación debidas al oxígeno disuelto en el medio de reacción.

En la Tabla II.1.3.1, quedan esquematizados los compuestos degradados térmicamente derivados de los constituyentes del aceite esencial según lo expresado por Lee y Nagy en 1996. El  $\alpha$ -terpineol es un compuesto derivado de la degradación de algunos componentes presentes en el aceite esencial, caracterizado por impartir aroma desagradable descrito como tipo terpénico, alcanforado, rancio y picante.

Durante el almacenamiento del zumo limón se produce la disminución progresiva del contenido en hidrocarburos terpénicos, octanal y nonanal, neral, geranial y sus ésteres, y el aumento de componentes con olor desagradable, el  $\alpha$ -terpineol y terpinen-4-ol (Núñez, 1988). La adición de una pequeña cantidad (2,5 ppm) de  $\alpha$ -terpineol al zumo fresco recién exprimido causa el desarrollo de un “flavor” rancio y envejecido (Tatum *et al.*, 1975).

El desarrollo de aroma desagradable en los zumos es atribuido a las pérdidas de los ésteres de mayor volatilidad (Blair *et al.*, 1952) y a la aparición del  $\alpha$ -terpineol durante el almacenamiento, quedando el contenido de este componente más afectado por la temperatura de almacenamiento que por el contenido inicial de limoneno en el zumo (Durr *et al.*, 1981).

**TABLA II.1.3.1- COMPONENTES DERIVADOS POR DEGRADACIÓN TÉRMICA DE LOS CONSTITUYENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CITRICOS**

<b>PRECURSOR</b>	<b>DERIVADO</b>	<b>AROMA</b>
Limoneno	$\alpha$ -Terpineol	Rancio, envejecido, pino
Linalol	$\alpha$ -Terpineol	Rancio, envejecido, pino
	Nerol	Dulce, rosa, frutal
	Geraniol	Dulce, rosa floral
$\alpha$ -Terpineol	<i>cis</i> -1,8-mentanodiol	Dulce, alcanfor
<i>Cis</i> -1,8-p-mentanodiol	1,8-cineol	Pungente, alcanfor
	1,4-cineol	
Citral	p-menta-1,5-dien-8-ol	no caracterizado
	p-menta-1(7), 2-dien-8-ol	no caracterizado
	<i>cis</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	no caracterizado
	<i>trans</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	no caracterizado
p-menta-1,5-dien-8-ol	p-cimen-8-ol	desagradable no especificado
p-menta-1(7), 2-dien-8-ol	p-cimeno	desagradable terpénico
	$\alpha$ ,p-dimetilestireno	desagradable terpénico
$\gamma$ -Terpineno	p-cimeno	desagradable terpénico

(Lee y Nagy, 1996)

En la Tabla II.1.3.2, se detalla una lista de la descripción del flavor de algunos azúcares degradados detectados en zumos cítricos según lo expresado por Rousell *et al.* (1992). Estos autores destacan que furanonas y piranonas (compuestos heterocíclicos oxigenados) están asociadas con la nota de flavor caramelizado del zumo cítrico.

El ácido ascórbico es uno de los principales nutrientes en zumos cítricos, no obstante bajo condiciones adversas de procesamiento y de almacenamiento, esta vitamina se degrada dando lugar a la aparición de flavor desagradable y compuestos característicos del pardeamiento (Tatum *et al.*, 1969).

La velocidad de degradación de este ácido se relaciona con el contenido en sólidos solubles (°Brix) del zumo y la temperatura de almacenamiento. Otros factores de menor influencia, tales como el pH, presencia de iones metálicos y oxígeno libre (en el espacio de cabeza del contenedor y el disuelto en el zumo) son también considerados (Kanner y Shapira, 1989). La degradación del ácido ascórbico tiene lugar en los zumos cítricos por mecanismos oxidativos y no oxidativos. La velocidad de degradación mediante mecanismo no oxidativo es diez veces inferior a la degradación en condiciones aeróbicas (Kefford *et al.*, 1959).



**TABLA II.1.3.2- DESCRIPCIÓN DEL FLAVOR DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE AZÚCARES ASOCIADOS CON EL PARDEAMIENTO.**

<b>CONSTITUYENTE</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL FLAVOR</b>
<b>FURANOS</b>	
2-Hidroxiacetil-1-furano	Quemado, dulzón
Furfural	Pan dulce, acaramelado
5-hidroximetil furfural	Dulce, herbáceo
2-Acetil furano	Quemado, dulzón, cetónico
2-Acetil-3-hidroxifurano	Dulce, frutal-acaramelado
Acido 2-furóico	Ligeramente acaramelado
5-Metil-2 furfural	Nota de uva ácida
<b>FURANONAS</b>	
2,5-dimetil-4-hydroxi-(2h)-furanona	Dulce, quemado, olor a piña/fresa
Dihidro-2(3h)-furanona	Dulce, ligeramente sabor caramelizado
5-Metil-2(5H)-furanona	Intensamente dulce-herbáceo, también próximo a tabaco
<b>PIRANONAS</b>	
2,3-dihidro-3,5-dihidroxy-6-metil-4H-piran-4-ona	Nota caramelizada

Rousell *et al.* (1992)

## II.2- ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

La compleja mezcla de componentes del aceite esencial de limón está representada mayoritariamente por estructuras derivadas del isopreno, de naturaleza terpénica (Guenther, 1949; Pinder, 1960), entre las que el hidrocarburo limoneno es el más abundante como en el resto de los aceites esenciales de cítricos. Los derivados oxigenados de dichos terpenos no son mayoritarios, sin embargo tienen gran importancia en el característico aroma del aceite esencial (Laencina *et al.*, 1980; Prager y Miskiewicz, 1982; Sattar *et al.*, 1986).

Incluye, por tanto, mezclas de hidrocarburos terpénicos, sesquiterpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, residuos no volátiles, incluido alcanfor (Hunter y Brogden, 1965; Keffor y Chandler, 1970; Sinclair, 1984; Lawrence, 1989). Di Giacomo en 1973 propone para el aceite esencial de limón la composición cualitativa recogida en la Tabla II.2.1.

El uso de técnicas como HPLC y GC, hace que el estudio de los componentes se realice en base a los que pueden ser identificados con cada una. Así mediante HPLC se lleva a cabo el estudio de los componentes de la fracción no volátil, identificándose cada vez mayor número de éstos, como se verá más adelante. Lo mismo ocurre con la cromatografía de gases que refleja la compleja composición de los componentes más volátiles del aceite esencial logrando cada vez mayor número de componentes identificados, como sucede en la presente memoria.

**TABLA II.2.1- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

<i>Terpenos</i>	<i>Aldehídos y cetonas</i>	<i>Alcoholes</i>
mirceno	hexanal	hexanol
ocimeno	heptanal	octanol
limoneno	octanal	nonanol
terpinoleno	nonanal	decanol
$\alpha$ -terpineno	decanal	hexen-3-ol
$\gamma$ -terpineno	undecanal	citronelol
$\alpha$ -felandreno	dodecanal	linalol
$\alpha$ -tuyeno	tridecanal	geraniol
$\alpha$ -pineno	pentadecanal	nerol
$\beta$ -felandreno	hexadecanal	terpinenol
$\beta$ -pineno	citronelal	$\alpha$ -terpineol
sabineno	neral	terpinen-4-ol
$\Delta$ -3-careno	geranial	tetrahydrogeraniol
canfeno	metilheptenona	<i>trans</i> -carveol( ?)
p-cimeno	carvona	1,8-p-mentadien-9-ol
$\alpha$ -dimetilestireno	nootkatona	

<i>Sesquiterpenos</i>	<i>Ácidos</i>	<i>Ésteres</i>
$\beta$ -bisaboleno	acético	acetato de octilo
$\alpha$ -humuleno	caprílico	caprilato de nonilo
$\alpha$ -bergamoteno	cáprico	acetato de nonilo
cariofileno	láurico	acetato de decilo
$\beta$ -humuleno	mirístico	acetato de citronelilo
$\epsilon$ -cadineno	palmítico	pelargonato de decilo
	oleico	acetato de geranilo
	linoleico	acetato de nerilo
	linolénico	acetato de terpenilo

<i>Carotenoides</i>	<i>Varios</i>	<i>Cumarinas</i>
troleína	tetradecano	7-metoxi-5-geranoxicumarina
neoxantina	pentadecano	5-isopentoxi-7-metoxicumarina
violaxantina	1,8-cineol	8-geranoxipsoraleno
fitoflueno	octileno	7-metoxi-5( $\gamma$ -dimetil)psoraleno
$\beta$ -caroteno	antranilato de metilo	isoimperatorina
$\epsilon$ -caroteno		byakangelicina
hidroxi- $\epsilon$ -caroteno		bergamotina
hidroxi- $\alpha$ -caroteno		citropteno
criptoxantina		5,8-psoraleno
luteína		bergaptol
zeaxantina		
luteoxantina		
auroxantina		
hidroxi- $\alpha$ -caroteno-5,8-epóxido		
criptoxantina-5,6,5',6'-diepóxido		

Di Giacomo (1973)

### **II.2.1- Componentes característicos del aceite esencial de limón.**

La composición cuantitativa de los constituyentes individuales de aceites esenciales de cítricos naranja, mandarina, lima, limón, etc. ha sido progresivamente estudiada por diversos autores. Shaw (1979), recoge la composición de varios aceites esenciales de cítricos determinada mediante GLC, y los tabula de forma que se puedan comparar entre ellos. Para el limón además de los terpenos mayoritarios, aldehídos y ésteres, determina la presencia de alcoholes entre un 0,1 y 0,5%, y una fracción no volátil que supone el 2% del total.

Mussinán *et al.* (1979) identifican algunos de los componentes volátiles del zumo fresco de limón, en el que encuentran compuestos característicos de la corteza. Staroscik y Wilson (1982) determinan la composición cuantitativa del aceite esencial de frutos procedentes de California y de Arizona.

Melendreras *et al.* (1985) comparan, mediante técnicas cromatográficas, la composición química del aceite esencial de limón español obtenido de diferentes cultivares mediante destilación por arrastre con vapor; Sugiyama y Saito (1988) analizan la composición química de varios aceites esenciales de limón extraídos en diversas condiciones de temperatura; Boelens y Jiménez (1989) comparan la composición de una muestra procedente de Andalucía con otra procedente de Sicilia, y Chamblee *et al.* (1991) hacen lo mismo entre las procedentes de Sicilia y las de California, como muestra la Tabla II.2.1.1.

**TABLA II.2.1.1- COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PORCENTUAL DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN DE SICILIA Y CALIFORNIA**

<b>Componente</b>	<b>Sicilia</b>	<b>California</b>
$\alpha$ -tuyeno	0.420	0.380
$\alpha$ -pineno	1.840	1.750
canfeno	0.050	0.060
sabineno	1.790	1.850
$\beta$ -pineno	10.520	11.130
$\beta$ -mirceno	1.610	1.580
$\alpha$ -felandreno	0.040	0.040
$\alpha$ -terpineno	0.200	0.160
p-cimeno	0.070	0.140
limoneno + <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno+1-8-cineol	65.160	65.650
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0.110	0.090
$\gamma$ -terpineno	8.860	8.320
tepinoleno	0.390	0.340
octanol + <i>trans</i> -hidrato de sabineno	0.050	0.010
linalol + <i>cis</i> -hidrato de sabineno	0.180	0.130
borneol	0.009	0.010
terpinenol-4	0.050	0.110
$\alpha$ -terpineol	0.190	0.160
citronelol + nerol	0.030	0.060
geraniol	0.020	0.030
aldehído C8	0.100	0.080
aldehído C9	0.120	0.120
aldehído C10	0.050	0.050
citronelal	0.130	0.080
neral	1.260	0.740
geranial	2.050	1.180
perillilaldehído	0.030	0.030

**Tabla II.2.1.1. Continuación**

Componente	Sicilia	California
aldehído C11	0.030	0.030
aldehído C12 + acetato de decilo	0.008	0.010
<i>cis</i> - $\alpha$ - bergamoteno	0.030	0.030
$\beta$ -cariofileno	0.190	0.620
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno+propionato de citronelilo	0.360	0.380
<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	0.030	0.030
$\alpha$ -humuleno	0.020	0.020
$\beta$ -santaleno	0.010	0.010
$\beta$ -bisaboleno	0.520	0.550
geranoato de metilo	0.005	0.007
acetato de citronelilo	0.030	0.030
acetato de nerilo	0.520	0.600
acetato de geranilo	0.380	0.520
propionato de nerilo	0.007	0.007
propionato de geranilo	0.009	0.010
acetato undecílico	0.006	0.009
<i>trans</i> -1,2-óxido de limoneno	0.005	0.007
<i>cis</i> -1,2-óxido de limoneno	0.004	0.006
alcanfor	0.010	0.008
exo- <i>cis</i> -4,7-dimetilbiciclo(3.2.1)octa-3-en-6-ona	0.008	0.010
piperitona	0.004	0.004
nerolidol	0.004	0.004
2,3-dimetil-3(4-metil-3-pentenil)2-norbonanol	0.020	0.030
canferenol	0.030	0.030
$\alpha$ -bisabolol	0.040	0.040

---

Chamblee *et al.*, 1991

## **II.2.2- Métodos analíticos utilizados en la caracterización del aceite esencial de limón.**

El control analítico de aceites esenciales permite determinar la calidad y el grado de pureza además de ofrecer información sobre la tecnología de producción y el área geográfica de procedencia. El desarrollo de estos métodos está estrechamente ligado al progreso del conocimiento de la composición de los aceites esenciales para lo cual ha sido determinante el desarrollo de las técnicas de análisis instrumental (Comm. Norm. Grasse, 1959; Gruyter, 1985; Hanneguelle *et al.*, 1992).

En varios países existen normas que definen las características físico-químicas y los métodos de análisis de determinados aceites esenciales. Tales normas, se definen mediante comisiones de expertos, que proponen regularmente nuevas normas, mejoras de los métodos de análisis, o normas para nuevos productos.

Cabe destacar los Organismos de Normalización de diferentes países AENOR (en España), AFNOR (Francia), DIN (Alemania), etc. integradas en la International Standard Organization (ISO). También publicaciones como el FCC, USFDA, o las distintas farmacopeas que recogen las características principales de productos de aplicación industrial, alimentaria etc.

No es fácil determinar unos valores límites, ya que además de las limitaciones de los propios métodos analíticos, existen numerosos factores que influyen en el contenido de aceite

esencial en los frutos cítricos, así como en la composición del mismo Bartholomew y Sinclair (1945 y 1951) comparan la cantidad de aceite esencial obtenidas del polo estilar y el polo peduncular del limón y en distintos grados de maduración, comprobando que obtenían más cantidad de aceite esencial en el polo estilar que en el peduncular, asimismo obtenían más rendimiento en los frutos no excesivamente maduros.

Influyen además otros factores: la época del año, el portainjerto utilizado, la cantidad de agua y sol recibida y el método de extracción (Attaway *et al.*, 1967; Melendreras *et al.*, 1986 y 1988 a y b). Por otro lado, la cantidad de aceite esencial obtenida es importante desde el punto de vista económico para las empresas del sector pero, como ya se ha visto anteriormente, no lo es menos el flavor que se obtiene, en el que además tiene gran importancia el proceso de extracción y almacenamiento del aceite, y que se encuentra muy relacionado con la composición química que presenta el aceite esencial obtenido, como ejemplo mencionar el índice de carbonilo que resulta más elevado cuando procede de máquinas tipo “pelatrice” frente al que procede de máquinas “sfumatrice” (Di Giacomo y Mincione, 1994).

Las determinaciones, tanto de carácter físico-químico como espectrofotométrico, presentan márgenes de valores más o menos amplios y esto implica la necesidad de utilizar otras técnicas complementarias en el control real de la genuinidad y estado de conservación de un determinado aceite esencial (Liberti *et al.*, 1973; Braddock y Kesterson, 1976; Braddock, 1986; Dugo *et al.*, 1983 notas I, II y III; Dugo *et al.*, 1984).



Tratando de completar los datos obtenidos por las técnicas tradicionales de análisis con la aplicación de diversas técnicas instrumentales, como la espectroscopía UV, e IR, cromatografía en fase de vapor, se pueden obtener una serie de datos previos al tratar de definir unos criterios de calidad.

#### II.2.2.1- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.

Para el control analítico de aceites esenciales de cítricos se utilizan entre otras las siguientes determinaciones: Peso específico, Índice de refracción, Rotación, Residuo de evaporación, Solubilidad en etanol, Índice de Carbonilo. Por ejemplo, el peso específico nos indica la fracción no volátil que vamos a encontrar en el aceite esencial y que suele estar directamente relacionada con el método utilizado en la extracción.

Del índice de refracción del aceite esencial de limón se han dado determinados valores, desde la norma ISO 855 (1981) para limón italiano, que da valores semejantes al que el FCC (1981) determina para la esencia destilada de limón, o los valores que Kesterson *et al.* (1971) encuentran en limón procedente de California y para destilados, y que no cumplen las especificaciones del FCC. Estos mismos autores encuentran para aceites esencial de limón procedente de California e Italia el mismo rango de valores límites.

Así mismo otros autores como Di Giacomo y Mincione (1994) determinan los valores para aceite esencial de limón producido en Italia, y para destilados y deterpenados, y Liberti *et*

*al.* (1973) lo determinan en aceite esencial de limón producido en la Región de Murcia.

Las diferencias entre los distintos autores, salvo las del FCC, no se consideran significativas ya que según Sinclair (1984) es normal que existan diferencias con el mínimo y el máximo de aproximadamente 0,0007 unidades. El índice de refracción además disminuye cuando aumenta la temperatura y es directamente proporcional a la densidad.

La rotación óptica en el aceite esencial de limón se produce por la relación de las proporciones entre sus dos componentes mayoritarios (limoneno de naturaleza dextrógira y  $\beta$ -pineno de naturaleza levógira). Autores como Stanley *et al.* (1961) observan que las rotaciones ópticas de los aceites esenciales procedentes del interior de USA, son más altos que los producidos en la zona de costa; otros (Lodge *et al.*, 1977), encuentran diferencia de valores de rotación óptica en frutos de madurez similar y de similares propiedades fisico-químicas pero de distinta procedencia -Italia y USA-.

Otros autores (Di Giacomo y Mincione, 1994, entre ellos) realizan las determinaciones a temperatura de 15°C, para limón italiano así como para el destilado, deterpenados y desesquiterpenados. El FCC (1981) determina que para la esencia de limón destilada el poder rotatorio oscila entre +55° y +75°. Los valores de rotación óptica a lo largo de una campaña varían de forma que al inicio -noviembre/diciembre- son más elevados que al final -mayo- (Calvarano *et al.* 1988).

La solubilidad en alcohol de los aceites esenciales de cítricos será tanto mayor cuanto mayor sea la riqueza en componentes oxigenados. Esto permite observar la posible adición de sustancias poco solubles en alcohol que disminuyen de forma notable su solubilidad, u observar el proceso de envejecimiento, por la producción de polimerizaciones debidas a los hidrocarburos terpénicos (Di Giacomo *et al.*, 1994).

La determinación del índice de carbonilo permite conocer el contenido en aldehídos expresados como citral. Se usan para ello varios métodos, Yokohama *et al* (1961), comparan los resultados obtenidos con distintas técnicas analíticas y observan que los métodos que utilizan fenilhidrazina e hidroxilamina conducen a resultados similares, mientras las cantidades obtenidas mediante la condensación con ácido barbitúrico y el método de vainillina-piperidina son menores que los anteriores, y ninguno de ellos incluye la determinación de aldehídos alifáticos saturados o cetonas. Estos dos últimos métodos son altamente específicos y de gran reproducibilidad. Otro método descrito -Hiltner modificado- aporta valores netamente inferiores al resto.

Stanley *et al.* (1958) utilizando el método de vainillina-piperidina, determinan la influencia de los efectos del medio ambiente, cultivo y procesado, sobre el contenido de citral en aceite esencial de limón y en el propio fruto. Así confirman la observación de Poore (1932), sobre el mayor contenido en citral de los frutos producidos en las zonas costeras respecto a los producidos en regiones interiores.

La variación en el contenido en aldehídos del aceite esencial en relación con la cantidad de agua utilizada en el proceso de extracción fue estudiada por Kesterson *et al.* (1958) observando que el contenido disminuía conforme aumentaba la cantidad de agua utilizada en el procesado.

Otras determinaciones pueden llevarse a cabo, como el índice de acidez, índice de peróxidos, ésteres, alcoholes, compuestos carotenoides, residuos de pesticidas, cloroparafinas

A continuación se muestran los valores máximos y mínimos de los parámetros físico-químicos que proponen varios autores para aceite esencial de limón obtenido por expresión en frío (Tabla II.1.2.1).

La ampliación de los cultivos de limonero a nuevas zonas de producción y la introducción de procedimientos de cultivo diferentes a los tradicionales, tal como sucede en nuestro país donde el volumen de limón producido se ha más que quintuplicado en las últimas décadas, plantea la existencia de posibles variaciones en las características del aceite esencial obtenido en la actualidad.

**TABLA II.2.2.1- PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN OBTENIDOS POR DIFERENTES AUTORES**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>
Peso específico (25°C)	0,848	0,850
Indice de refracción	1,4738	1,4745
Rotación óptica	+57,82°	+68,98°
Aldehídos %	1,99	3,45
Residuo de evaporación %	1,6	3,0

*Kesterson et al. (1971)*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>
Densidad relativa 20/20°C	0,8462	0,8575
Indice de refracción a 20°C	1,4720	1,4753
Poder rotatorio 20°C	+57,60°	+66,9°
Residuo de evaporación %	2,14	3,77
Citral %	2,27	4,71

*Liberti et al. (1973)*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>Máquina</b>		<b>Sfumatrice</b>		<b>Pelatrice</b>	
	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>
Densidad relativa 15/15°C	0,85555	0,8572	0,8566	0,8590		
Poder rotatorio 15°C	+60,57°	+67,06°	+59,37°	+67,26°		
Indice de refracción 15°C	1,4734	1,4760	1,4735	1,4765		
Citral %	3,33	3,94	3,55	4,57		
Residuo de evaporación %	1,78	2,21	2,82	3,77		

*Di Giacomo et al. (1994)*

### II.2.2.2- ESPECTROFOTOMETRÍA DE ULTRAVIOLETA

En cuanto al índice CD es un parámetro útil para determinar la fracción no volátil de aceite esencial que generalmente está constituida por ceras, parafinas, cumarinas, furocumarinas y componentes de elevado peso molecular. Parece estar relacionado con el tiempo que está el aceite en contacto con la corteza durante la expresión, ya que a mayor tiempo aumentan los materiales de deshecho (Sinclair 1984). Los valores anormalmente altos podrían indicar una contaminación con aceites de diverso origen, por el contrario valores muy bajos determinarían una mayor presencia de terpenos.

Por tanto la presencia en los aceites esenciales de cítricos de constituyentes como cumarinas, furocumarinas, y el citral, determina el comportamiento característico en la zona de absorción del ultravioleta y ha sido utilizado para la puesta a punto de métodos de valoración de la calidad y para contribuir a determinar el origen geográfico, la tecnología empleada, la época de producción e incluso, a desvelar las sofisticaciones que escapan al análisis tradicional (Riganensis, 1955; Sergi *et al.*, 1968; Di Giacomo *et al.*, 1994).

El método Cultrera *et al.* (1954), comúnmente conocido como “método Palermo”, consiste en la medida del porcentaje de la transmitancia entre longitudes de onda comprendidas entre 270 y 340nm, en intervalos de 10nm, de una disolución de aceite esencial al 0,05%(v/v) en alcohol etílico de 95°. Para los aceites esenciales puros, los valores de transmisión a diferentes longitudes de onda poseen valores comprendidos entre límites bien definidos.

El método Sale (1953), o “método americano”, mide la curva de absorbancia de una disolución en etanol de 95°, de aceite esencial al 0,25%, en un intervalo de longitud de onda comprendido entre 270 y 390nm. En el caso de la bergamota, la disolución se hace al 0,1%, debido al alto contenido en cumarinas y furocumarinas de su aceite esencial.

El valor CD, como ya se ha dicho anteriormente, está influenciado por la acción, más o menos drástica, que se ejerce sobre la corteza durante el procesamiento, y obviamente de la adición de terpenos, sobre todo de naranja que se pueden encontrar con facilidad. Es posible añadir sustancias, que presentan un espectro de absorción semejante al de los aceites esenciales, pero esto puede considerarse superado, desde la aplicación en el estudio el aceite esencial de las técnicas de cromatografía -siempre más sofisticadas-, que permiten la individuación de las sustancias extrañas al propio aceite esencial (Di Giacomo *et al.*, 1994).

### II.2.2.3- ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO

Se obtiene el espectro infrarrojo en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 4.000 y 626cm<sup>-1</sup> utilizando una celda óptica de cloruro de sodio de 0,025mm de espesor. El aceite esencial de limón ha sido estudiado por este método por Pennisi y Di Giacomo (1965) en limón italiano, Navarro (1962), aplica esta técnica junto a la determinación en UV, para desenmascarar adulteraciones, Bellanato *et al.* (1971) determinan las diferencias entre los procedentes de Italia, USA y España, y por último Carmona *et al.* (1974) estudian los

espectros infrarrojos de las distintas fracciones del aceite esencial, para observar mejor los componentes minoritarios, ya que en el espectro total, la mayoría de las bandas corresponden al limoneno.

El envejecimiento en aceites esenciales ha sido estudiado por Roger (1963), Rispoli *et al.* (1965), Günther (1968), evidenciando la oxidación de algunos componentes y la formación de p-cimeno. Carmona *et al.* (1974) estudian el envejecimiento de cuarenta y dos muestras de aceite esencial de limón, envejecidas la mitad de ellas naturalmente y la otra mitad artificialmente. Obtienen primero el espectro total del aceite envejecido y a continuación lo fraccionan por cromatografía en columna estudiando posteriormente los espectros de las distintas fracciones.

Comprueban así mismo que los espectros obtenidos del envejecimiento natural y artificial son semejantes y en el estudio de las fracciones observan la disminución del  $\gamma$ -terpineno y el aumento del p-cimeno y una concentración relativa menor de mirceno/limoneno. Así mismo disminuye el contenido en citral y aumentan las bandas debidas a productos de oxidación: *cis* y *trans*-carveol, *cis* y *trans*-2,8-p-mentadienol-1, carvona, óxido de limoneno, limonenol-10. También indican la acción antioxidante que ejercen las cumarinas.



#### II.2.2.4- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las técnicas de cromatografía gaseosa son las que se utilizan preferentemente para el estudio y determinación de componentes de naturaleza volátil presentes en alimentos y otros productos a veces en cantidades realmente difíciles de discriminar por otros métodos analíticos menos sofisticados (Masada, 1973; Parliment y Spencer, 1981; Moshonas y Shaw, 1984, 1987, 1989, 1990 y 1997; McDaniel *et al.*, 1990; Marsili, 1997; Mosandl y Juchelka, 1997).

##### II.2.2.4.1- *Análisis de componentes volátiles*

Análogamente a lo expresado por Parliment (1986) respecto a la recuperación de constituyentes volátiles en alimentos se puede resaltar que la elección del método cromatográfico apropiado depende de las características fisico-químicas de los componentes volátiles de interés -rango de punto de ebullición y polaridad, especialmente-, de cual sea su concentración en el producto y que existen diferentes factores que hacen complicada la preparación de la muestra como son:

- 1.- Nivel de concentración de los compuestos aromáticos que es generalmente baja del orden de ppm, ppb y ppt, por lo que no es solamente necesario aislar los componentes sino que han de concentrarse en un alto nivel si quieren determinarse a fondo los constituyentes minoritarios.

2.- Los componentes aromáticos en los alimentos, en su mayoría se encuentran a nivel celular, asociados con componentes no volátiles que complican el proceso de aislamiento, o pueden crear problemas por la formación de espumas y emulsiones y dan lugar a la aparición de contaminantes a nivel del sistema de inyección en cromatografía de gases.

3.- En general la composición aromática de los alimentos resulta bastante compleja; a esto se le suma el hecho de que cada componente tiene características físico-químicas diferentes tales como polaridad, solubilidad.....

4.- Los componentes aromáticos poseen diferente volatilidad, variando desde aquellos que tienen un punto de ebullición por debajo de la temperatura ambiente a los que se encuentran en estado sólido en las mismas condiciones.

5.- Inestabilidad. Muchos componentes aromáticos son inestables y pueden ser fácilmente oxidados por el aire, o degradados por el calor, etc.

#### II.2.2.4.1.1- *Inyección directa de la muestra en cromatografía de gases*

La inyección directa resulta la técnica de elección en el análisis de aceites esenciales y es por lo tanto la que generalmente se utiliza con el aceite esencial de limón, así mismo es adecuado en el caso de que las muestras hayan de ser diluidas con un disolvente para obtener respuestas dentro de los

límites del detector. También puede utilizarse en el análisis de muestras acuosas concentradas.

En la industria alimentaria a menudo durante el procesamiento la materia prima está disponible en estado acuoso; en este caso la muestra puede ser inyectada directamente si se encuentra suficientemente concentrada, ya que el problema se plantea con la vaporización del agua en el interior del sistema de inyección (1µl de agua se transforma en aproximadamente 1000 µl en estado vapor), el volumen final resulta mucho mayor que el volumen del sistema de inyección. Además, a nivel de columna, las fases estacionarias líquidas polares, como es el caso de las de Carbowax, pueden llegar a degradarse en presencia del vapor de agua, sobre todo si no son fases fijas ligadas.

Por inyección directa en cromatografía de gases del aceite esencial de limón diversos autores han determinado cada vez un mayor número de componentes (Cotroneo *et al.*, 1983 y 1985). Esta técnica se utiliza tanto con el aceite esencial directamente, como con las distintas fracciones que se obtienen, tras hacerle atravesar una columna de cromatografía preparativa de sílice de 100-200µm de actividad III (Chamblee *et al.*, 1991) que permite la obtención de los componentes separados según sus grupos funcionales, facilitando la identificación de aquellos que eluyen juntos por posterior cromatografía de gases de las distintas fracciones obtenidas.

Algunos autores determinan el orden de elución de algún componente en orden inverso utilizando columnas de igual polaridad. Chamblee *et al.* (1991) sitúan primero al *trans*-óxido

de limoneno y a continuación, *cis*-óxido de limoneno, mientras que para Di Giacomo *et al.* (1994) el *cis*-óxido de limoneno, eluye por delante del *trans*-óxido de limoneno.

Los resultados anteriormente citados corresponden a trabajos realizados con columnas de tipo apolar. Con columnas polares Baaliouamer y Meklati (1980) determinan el orden de elución de los componentes del aceite esencial y de “petit grain” de limones de la variedad “Eureka” cultivados en Argelia. Así mismo hacen una comparación entre los resultados obtenidos por diferentes autores sobre columnas polares, comparando a su vez una columna tipo Carbowax 20M y una tipo SE-30.

De esta forma obtiene, para aceite esencial de limón procedente de la corteza 118 picos en Carbowax 20M de los que identifica 98 mediante inyección de sustancias patrón, comparando tiempos de retención, y en la columna SE-30 obtiene 155 picos de los que identifica por el mismo método anterior un total de 88 picos. En la columna SE-30 obtiene un mayor número de picos debido a que esta puede trabajar a temperatura de 250°C, mientras que con Carbowax 20M, sólo alcanza los 180°C.

Posteriormente somete las muestras a derivatización, que permite adjudicar los grupos funcionales propios a determinados picos no bien diferenciados, y algunos de ellos sometidos a identificación mediante gas cromatografía usando como detector un espectrómetro de masas.

Sebastiani *et al.* (1983), ofrecen la comparación entre dos perfiles de elución de aceite esencial de limón en OV-101 y

Carbowax 20M, pero esta última no parece ser dicha columna ya que el perfil cromatográfico difiere del obtenido en la misma, se podría tratar de una columna de polaridad intermedia probablemente OV-330; otros autores como Mazza (1987) aportan una relación de componentes presentes en aceite esencial agrupándolos por grupos funcionales.

En cuanto a los datos cuantitativos Boelens *et al.* (1989) comparan los porcentajes obtenidos con aceite esencial de limón procedente de Sicilia y otro procedente de Andalucía pero no comentan de que época de producción se trata. Chamblee *et al.* (1991) comparan un aceite producido en Sicilia y uno producido en California, tampoco hacen referencia a la fecha de producción, aunque en este último los porcentajes se aproximan más que en el primero y concluyen que el procedente de Sicilia tiene mayor contenido en citral, aldehídos y compuestos oxigenados, mientras el de California posee mayor proporción de ésteres y de residuo no volátil y a continuación ofrecen otros porcentajes de área para limón siciliano con los que calculan el factor de respuesta frente a soluciones estándar que difieren ligeramente de los anteriores pero no hace referencia a si son de la misma fecha o no que los anteriores.

Staroscik *et al.* (1982) comparan los porcentajes de área de California y Arizona en tres momentos de la producción; el de California se toma en mayo, julio y octubre y el de Arizona en septiembre, diciembre y marzo. Otros autores (Cotroneo *et al.*, 1986; Calvarano *et al.*, 1988), observan la variación de los porcentajes de una treintena de componentes a lo largo de una campaña desde octubre a mayo, e incluso las variaciones que

produce el utilizar distintas técnicas de extracción (“sfumatrice”, “pelatrice” o FMC).

La fracción terpénica va disminuyendo ligeramente a lo largo de la campaña, esta disminución es más suave en los casos de “pelatrice” que de “sfumatrice” y en FMC se produce una disminución semejante a “pelatrice” salvo en el mes de enero, que es más acentuada. Los sesquiterpenos poseen un variado comportamiento según la forma de extracción presentando los valores más próximos entre enero y marzo.

Los compuestos oxigenados en el caso de FMC y “pelatrice” aumentan hasta diciembre -siendo ligeramente superiores los de FMC-, bajan en enero, se mantienen más o menos entre febrero y marzo -algo mayores los de “pelatrice” para descender hacia abril y mayo; los procedentes de “sfumatrice” van aumentando -aunque siempre con porcentajes más bajos que los anteriores- hasta febrero para disminuir a partir de entonces.

En cuanto a los compuestos carbonílicos son también inferiores los porcentajes de “sfumatrice” a las otras dos tecnologías, pero los tres presentan un aumento de los mismos hasta el mes de enero para ir posteriormente disminuyendo. Por último los ésteres aumentan a lo largo de la campaña, y los alcoholes van disminuyendo muy ligeramente durante la misma, siendo inferiores los porcentajes -como en los casos anteriores- los obtenidos de máquinas “sfumatrice”.

Estos mismos autores (Cotroneo *et al.*, 1986) comparan la evolución de varios de los componentes entre sí; así por ejemplo,  $\beta$ -pineno y sabineno aumentan progresivamente y al mismo

tiempo el limoneno va disminuyendo. Llama también la atención que los menores porcentajes de limoneno son producidos por la máquina tipo FMC, que a su vez presenta mayores porcentajes de los otros dos hidrocarburos terpénicos.

En cuanto a los aldehídos se observa el aumento a lo largo de la campaña de citronelal, nonanal y decanal, mientras geranial y neral aumentan ligeramente de noviembre a enero, para ir disminuyendo progresivamente. Los porcentajes de geranial y neral son inferiores en máquinas “sfumatrice” que en las otras consideradas, y no se observan diferencias entre los porcentajes de citronelal, nonanal y decanal. Los alcoholes  $\alpha$ -terpineol y linalol van disminuyendo progresivamente, sin embargo, terpinenol-4 y la suma de nerol y citronelol (por eluir conjuntamente), se mantienen o disminuyen ligeramente al inicio de la campaña, para aumentar ligeramente a partir de febrero, siendo siempre inferiores los porcentajes de “sfumatrice”. Los ésteres acetato de nerilo y geranilo aumentan paulatinamente en el transcurso de la campaña.

#### II.2.2.4.2- *Elución en columnas de diferente polaridad*

Se recogen en este apartado algunas tablas que permiten observar los datos bibliográficos referentes tanto a orden de elución en columnas apolares (Tablas II.2.2.4.2.1 y 2) y polares (Tabla II.2.2.4.2.3) como una recopilación de todos los componentes del aceite esencial por grupos funcionales descritos en bibliografía y recogida por Maarse *et al.* en 1989 (Tabla II.2.2.4.2.4).

**TABLA II.2.2.4.2.1- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA J&W  
DB-5**

	<b>Componente</b>		<b>Componente</b>
1	$\alpha$ -tuyeno	37	geranial
2	$\alpha$ -pineno	38	perialdehído
3	canfeno	39	undecanal
4	sabineno	40	geranoato de metilo
5	$\beta$ -pineno	41	acetato de citronelilo
6	mirceno	42	acetato de nerilo
7	octanal	43	acetato de geranilo
8	$\alpha$ -felandreno	44	tetradecano
9	$\alpha$ -terpineno	45	dodecanal
10	p-cimeno	46	acetato de decilo
11	limoneno+(*y <sup>^</sup> )	47	<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoteno
12	cineol-1,8(*)	48	$\beta$ -cariofileno
13	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno(^)	49	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno
14	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	50	propionato de citronelilo
15	$\gamma$ -terpineno	51	propionato de nerilo
16	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	52	<i>trans</i> - $\beta$ -farneseno
17	octanol	53	$\alpha$ -humuleno
18	terpinoleno	54	<i>trans</i> - $\beta$ -santaleno
19	linalol	55	propionato de geranilo
20	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	56	acetato de undecilo
21	nonanal	57	$\beta$ -bisaboleno
22	<i>trans</i> -limoneno-oxido	58	nerolidol
23	<i>cis</i> -limoneno-oxido	59	2,3dimetil-3(4metil-3-pentenil) 2norbornanol
24	alcanfor	60	canferenol
25	citronelal	61	$\alpha$ -bisabolol
26	borneol	62	desconocido
27	terpinen-4-ol		
28	$\alpha$ -terpineol		
29	4,7dimetilbicycloocta-3-en-6-ona		
30	decanal		
31	acetato de octilo		
32	citronelol		
33	nerol		
34	neral		
35	geraniol		
36	piperitona		

Chamblee *et al.*, 1991



**TABLA II.2.2.4.2.2- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA SE-52**

	<b>Componente</b>		<b>Componente</b>
1	triciclono	37	geraniol
2	$\alpha$ -tuyeno	38	geranial
3	$\alpha$ -pineno	39	perillilaldehído
4	canfeno	40	acetato de bornilo
5	sabineno	41	undecanal
6	$\beta$ -pineno	42	acetato de nonilo
7	metilheptenona	43	geranoato de metilo
8	mirceno	44	acetato de citronelilo
9	octanal	45	acetato de nerilo
10	$\alpha$ -felandreno	46	acetato de geranilo
11	$\Delta^3$ -careno	47	dodecanal
12	$\alpha$ -terpineno	48	acetato de decilo
13	p-cimeno	49	$\beta$ -cariofileno
14	limoneno	50	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno
15	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	51	$\alpha$ -humuleno
16	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno		<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno
17	$\gamma$ -terpineno	52	+ <i>trans</i> - $\beta$ -santaleno
18	<i>trans</i> hidrato de sabineno	53	$\gamma$ -muroleno
19	octanol	54	germacreno D
20	terpinoleno	55	<i>sesquiterpeno</i>
21	<i>cis</i> hidrato de sabineno	56	valenceno
22	linalol	57	<i>sesquiterpeno</i>
23	nonanal	58	<i>sesquiterpeno</i>
24	<i>cis</i> -limoneno-oxido	59	$\beta$ -bisaboleno
25	<i>trans</i> -limoneno-oxido	60	$\gamma$ -elemeno
26	alcanfor	61	tetradecanal
27	citronelal	62	2,3dimetil-3(4metil-3-pentenil) 2norbornanol
28	borneol	63	canferenol
29	terpinen-4-ol	64	$\alpha$ -bisabolol
30	$\alpha$ -terpineol	65	nootkatona
31	decanal		
32	acetato de octilo		
33	citronelol+ nerol		
34	carbonílico		
35	neral		
36	piperitona		

Di Giacomo *et al*, 1994

**TABLA II.2.2.4.2.3- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA PEG 20M.**

<b>n° pico</b>	<b>Componente</b>
1	
2	
3	
4	2-propanol
5	$\alpha$ -pineno+(-) <i>trans</i> -pinano
6	tricicleno+aldehído C6
7	$\beta$ -pineno + sabineno
8	canfeno
9	mirceno+ limoneno+aldehídoC7+ $\Delta$ 3 careno
10	eucaliptol
11	$\gamma$ -terpineno
12	heptanol-4
13	$\alpha$ -felandreno+ p-cimeno+ $\alpha$ -terpineno+ terpinoleno
14	octanal
15	metilheptenona
16	hexanol
17	3-nonanona
18	3-hexenol-1
19	3-octanol
20	<i>trans</i> -2-hexenol
21	neolocimeno?+ acido acético
22	acetato de tetrahidrolinalilo
23	
24	
25	
26	<i>trans</i> -2-octenal
27	<i>trans</i> -linalol-óxido
28	
29	
30	butirato de <i>cis</i> -3-hexenilo
31	acetato de octilo+3-decanona
32	citronelal+ <i>cis</i> -óxido de linalol
33	decanal
34	mentona
35	acido propiónico
36	butirato de octen-1,3-ilo
37	
38	alcanfor
39	

**Tabla II.2.2.4.2.3- Continuación**

<b>n°</b>	<b>componente</b>
40	linalol
41	octanol
42	
43	acetato de linalilo
44	
45	isopulegol
46	
47	acetato de nonilo
48	metilnonilcetona
49	p-carvona
50	terpinen-4-ol + isoforona
51	p-ment-1-enol-4
52	mircenol
53	$\beta$ -cariofileno
54	
55	
56	mentol
57	1-nonanol + nootkatona
58	acetato de citronelilo
59	isoborneol
60	acetato de decilo
61	$\alpha$ -humuleno + neral
62	$\alpha$ -terpineol
63	borneol
64	butirato de linalilo + aldehído laúrico
65	geranial
66	valenceno + antranilato de metilo
67	citronelol
68	acetato de geranilo
69	p-metil-acetofenona
70	
71	aldehído perillilico
72	cuminaldehído
73	nerol + mirtenol
74	geraniol + farnesil-metileter
75	timol

**Tabla II.2.2.4.2.3- Continuación**

<b>n°</b>	<b>componente</b>
76	undecanol
77	guayacol
78	$\alpha$ -ionona + (-) <i>trans</i> -mirtanol
79	
80	
81	
82	
83	3-metoxibenzaldehído
84	$\beta$ -ionona
85	aldehído mirístico
86	
87	2-anisaldehído
88	
89	1-dodecanol
90	ácido L(-)málico
91	óxido de cariofileno
92	
93	(-) <i>perillilalcohol</i>
94	
95	
96	anisaldehído
97	cinamaldehído
98	
99	isosafrol
100	ácido caprílico
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	
108	
109	eugenol
110	

Baaliouamer y Meklati, 1980

**TABLA II.2.2.4.2.4- COMPONENTES DESCRITOS POR GRUPOS FUNCIONALES EN BIBLIOGRAFIA en ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

---

**HIDROCARBUROS**

---

triciclono	$\beta$ -bisaboleno
$\alpha$ -tuyeno	$\alpha$ -bisaboleno
$\alpha$ -pineno	tetradecano
canfeno	pentadecano
$\beta$ -pineno	
sabineno	

**ESTERES**

---

$\beta$ -mirceno	acetatos de C7-C10
$\alpha$ -terpineno	acetatos de geranilo y nerilo
limoneno	acetato de perillilo y limonenilo-10
$\beta$ -felandreno	acetato de linalilo y de citronelilo
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	formiato de geranilo
$\gamma$ -terpineno	propionatos de geranilo y nerilo
$\alpha$ -felandreno	propionato de linalilo
$\Delta$ -3-careno	jasmonato y epijasmonato de metilo
valenceno	acetato de p-menta-1,8(10)dien-9-ilo
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	acetato de 3,7-dimetil <i>cis</i> y <i>trans</i> -2,7-octadien-1,6-diol
p-cimeno	benzoato de etilo y butanoato de geranilo
terpinoleno	

**VARIOS**

---

$\alpha$ -p-dimetilestireno	nootkatona, $\beta$ -ionona, mentona
<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoteno	6-metil-5-hepten-2-ona
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	3-nonanona, y 3-decanona
$\beta$ -cariofileno	piperitona e isopiperitona
$\alpha$ -farneseno	alcanfor y carvona
$\beta$ -santaleno	<i>cis</i> -4,7-dimetilbiciclo[3.2.1]oct-en-6-ona
$\alpha$ -humuleno	biciclo[3.2.1]oct-en-6-ona
$\beta$ -humuleno	<i>trans</i> y <i>cis</i> -limoneno-1,2epoxido
$\beta$ -farneseno	ácido acético y ácido caprílico
$\beta$ -acoradieno	
$\alpha$ -selineno	

---

**Tabla II.2.2.4.2.4- Continuación****ALCOHOLES**

terpinen-4-ol	metanol
heptanol	etanol
<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1-hexanol
linalol	3-hexen-1-ol
<i>cis</i> -sabineno-hidrato	3,7-dimetil-1-octanol (tetrahidrogeraniol)
octanol	decanol
<i>trans</i> -p-menta-2,8-dienol	undecanol
nonanol	dodecanol
<i>cis</i> y <i>trans</i> -p-menta-2,8-dienol	mircenol
$\delta$ -terpineol	nerolidol
$\alpha$ -terpineol	mentol
borneol	isopulegol
<i>cis</i> -isopiperitol	<i>trans</i> -p-menten-9-ol
<i>trans</i> -isopiperitol	
citronelol	
<i>trans</i> -p-menta-1(7)8-dienol-2	
$\gamma$ -isogeraniol	
nerol	<b>ALDEHÍDOS</b>
<i>cis</i> -p-menta-1(7)8-dienol-2	aldehídos: C6-C16
<i>trans</i> - y <i>cis</i> -carveol	acetaldehído
p-cimenol-8	<i>trans</i> -2-octenal
geraniol	<i>trans</i> -2-nonenal
<i>cis</i> -carveol	<i>trans</i> -2-decenal
limonenol-10	<i>trans</i> -2-tetradecenal
perllilalcohol	citronelal
<i>cis</i> -acetoxi-3,7-dimetil-2,7-octadienol-6	mirtenal
<i>trans</i> -acetoxi-3,7-dimetil-2,7-octadienol-6	geranial
1,4-cineol y 1-8-cineol	neral
timol	perillialdehído
carvacrol	<i>trans</i> -2- <i>trans</i> -4-decadienal

Maarse *et al.*, 1989

#### II.2.2.4.3- *Determinación de componentes volátiles en espacio de cabeza.*

El aislamiento de volátiles mediante la extracción de un volumen de aire del espacio libre sobre un recipiente, seguido de una inyección directa en un cromatógrafo de gases, quizá sea el más representativo de los análisis de la composición de la fracción volátil (Alberola e Izquierdo, 1978), ya que contiene los volátiles que son responsables del olor, en las concentraciones y relaciones en las que son percibidas por la nariz humana.

Esta técnica se utiliza en zumos cítricos y conduce a pensar que puede ser utilizada en la diferenciación de zumos procedentes de diferentes cultivos (Wolford *et al.*, 1963).

Además ha sido utilizada por un gran número de autores con el objeto de obtener cromatogramas de los componentes volátiles emanados de los alimentos y recomendada por los miembros del grupo sobre métodos de análisis de la IOFI (International Organization of the Flavour Industry). El cromatograma así obtenido recibe el nombre de aromagrama (Teranishi *et al.*, 1962), presentando numerosas ventajas tales como la reducción de la manipulación de la muestra y la no introducción de componentes indeseados por uso de disolvente.

Mediante esta técnica el volumen extraído del espacio de cabeza es arrastrado con un gas inerte hacia una trampa de frío, la cual puede formar parte de un sistema cromatográfico (Schultz *et al.*, 1971). En la actualidad las técnicas descritas en espacio de cabeza pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Espacio de cabeza estático,
- Espacio de cabeza dinámico.

En los dos casos el principio fundamental es el mismo, los componentes volátiles de una muestra sólida o líquida se analizan mediante el estudio de la atmósfera adyacente a la muestra que queremos analizar (Wampler, 1997).

#### II.2.2.4.3.1- *Espacio de cabeza estático*

En el espacio de cabeza sobre una determinada muestra existen componentes en fase vapor a la temperatura ambiente a la cual se encuentran, o bien tienen una presión de vapor lo suficientemente elevada para evaporarse y producir una disolución gaseosa; en ambos casos el gas en sí mismo puede ser inyectado en el cromatógrafo de gases mediante una jeringuilla. La cantidad de gas que puede ser inyectada en el cromatógrafo, está limitada por la capacidad del inyector y la columna; también ha de considerarse el aumento de presión y flujo producido al ser inyectada una muestra gaseosa de un volumen relativamente grande.

Normalmente la cantidad de muestra inyectada está comprendida entre 0,1-2mL. La utilidad de este sistema de inyección depende de que existan suficientes cantidades de analito en el volumen de gas que se inyecta para la detección mediante cromatografía gaseosa. En esta técnica la muestra se introduce en un vial cerrado y los compuestos volátiles presentes en la muestra pasan a formar parte del espacio de cabeza. Si su concentración es próxima a 1ppm podrán ser analizados por la



inyección directa de una parte alícuota de la atmósfera en el cromatógrafo de gases.

Así, la concentración de analito inyectado es directamente proporcional al volumen de la jeringuilla de inyección y a la cantidad de compuesto presente en el espacio de cabeza, e inversamente proporcional al volumen del espacio de cabeza presente en el vial. A veces la dinámica de trabajo requiere la introducción de la muestra en un vial y el calentamiento de la misma para favorecer el enriquecimiento en componentes volátiles en el espacio de cabeza.

Presenta las ventajas de no utilizar disolvente en el análisis, así como el bajo coste de la instalación de la misma pero supone que, para compuestos presentes en la muestra a muy baja concentración y que no son altamente volátiles, el método no tiene la suficiente sensibilidad para su determinación (Wampler, 1997).

En el aceite esencial de limón dada la elevada volatilidad de sus componentes, se puede obtener con facilidad sin necesidad de calentamiento y evitando la posibilidad de la formación de artefactos, una proporción de volátiles suficientes como para ser detectados tras inyección directa.

No existen trabajos realizados a este respecto, comparando los porcentajes de componentes volátiles obtenidos por inyección directa en cromatografía de gases, de aceite esencial de limón y de un espacio de cabeza de aceite esencial de limón, Sin embargo, Goretta *et al.* (1986) comparan los porcentajes de componentes obtenidos de aceite esencial de limón y el espacio

de cabeza de limón, los resultados se muestran en la Tabla II.2.2.4.3.1.

Se observa que aumentan notablemente las proporciones de  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -tuyeno en el espacio de cabeza frente al aceite esencial de limón y disminuyen el limoneno y  $\gamma$ -terpineno, así mismo disminuyen linalol, neral, geranial y antranilato de metilo. Esto contrasta con la idea de que son principalmente aldehídos -sobre todo citral- y ésteres, los principales contribuyentes al aroma apreciado en los frutos cítricos.

Otras técnicas utilizadas para realizar el espacio de cabeza, conllevan la utilización de microextracción en fase sólida -SPME (Steffen *et al.*, 1996; Penton, 1996; Peppard, 1999)- que realiza una extracción previa del espacio de cabeza aplicando una jeringa especial que posee un recubrimiento polimérico de naturaleza polar o apolar. Se resalta la importancia de la elección de la fibra según la naturaleza más o menos polar de los componentes a analizar, así con un recubrimiento polimérico de naturaleza apolar poldimetilsiloxano (PDMS), los hidrocarburos terpénicos presentan el inconveniente de que su afinidad por la fibra es diferente también según el porcentaje en que se encuentren los componentes en la muestra.

Por ello los que están en menor proporción pueden ser desplazados por los que se encuentran en mayor proporción, y además el aumento de temperatura y del tiempo que el espacio de cabeza está expuesto a la fibra actúan en el mismo sentido no llegando a ser totalmente exactos los porcentajes en que se encuentran en el espacio de cabeza y el que aparece tras desorber la fibra (Jordán, 1999).

**TABLA II.2.2.4.3.1- COMPARACIÓN PORCENTAJES RIQUEZA DE ACEITE ESENCIAL Y ESPACIO DE CABEZA**

<b>Componente</b>	<b>% aceite esencial</b>	<b>% espacio cabeza</b>
$\alpha$ -tuyeno		
+ $\alpha$ -pineno	2.26	5.81
canfeno	0.16	0.35
$\beta$ -pineno	12.48	21.29
sabineno	1.94	3.32
mirceno	1.32	1.57
$\alpha$ -felandreno	0.21	0.22
limoneno	66.45	56.58
$\gamma$ -terpineno	9.31	6.20
p-cimeno	1.80	1.60
terpinoleno	0.42	0.30
octanal	tr	0.02
metilheptenona	tr	0.02
acetato de octilo	0.06	0.03
citronelal	0.05	0.03
decanal	tr	
linalol	0.10	0.07
acetato de linalilo	0.04	0.03
$\beta$ -cariofileno	0.12	0.02
terpinen-4-ol	0.06	0.02
neral	0.48	0.18
$\alpha$ -terpineol	0.16	0.07
acetato de nerilo	0.18	0.04
geranial	0.85	0.26
acetato de geranilo	0.12	0.02
citronelol	tr	0.00
nerol	0.03	tr
geraniol	0.03	0.02
antranilato de metilo	0.49	0.19

Goretti *et al.*, 1986

#### II.2.2.4.3.2- *Espacio de cabeza dinámico*

Esta técnica implica el movimiento de analitos desde la matriz del alimento hacia el espacio de cabeza. La atmósfera que rodea al alimento es atravesada de forma continua por una corriente de gas portador que arrastra con él a los componentes volátiles presentes en el espacio de cabeza, facilitando la salida de estos desde la muestra hacia el mismo, sin necesidad de esperar a que se alcance el equilibrio químico entre las fases que conforman el sistema, además de incrementar el volumen de muestra utilizado más allá del volumen del vial que contiene la muestra (Padrayuttawat y Tamura, 1996).

En esta clase de análisis es usual el empleo de volúmenes comprendidos entre 100mL y 1000mL de espacio de cabeza, asegurando de esta forma la captación de todos los componentes volátiles de la muestra problema. La ventaja de este sistema es que todos los volátiles de este volumen son transferidos directamente hacia el cromatógrafo de gases.

El análisis se completa con el paso del gas portador a través de una serie de trampas que retienen los componentes volátiles, dejando pasar a través de ellas el gas portador. El atrapamiento de los componentes volátiles supone su adsorción en un material de gran superficie, ó bien atrapamiento por frío mediante condensación o congelación del analito en la trampa.

De esta forma el sistema de espacio de cabeza dinámico actúa como concentrador de muestras, mientras que cuando los componentes volátiles son arrastrados por un gas portador y atrapados para su determinación esta técnica también recibe el

nombre de purga y trampa (“purge and trap”), únicamente en el caso de que la muestra sea líquida, y si la muestra es sólida se le denomina como espacio de cabeza dinámico.

La selección de la técnica y del medio, depende de diversos factores entre los que se incluyen: la naturaleza química del analito, su estabilidad térmica, características de adsorción y desorción del material adsorbente, volumen del analito sobre el material, capacidad y coste del agente criogénico y por último la presencia de material contaminante entre la que se incluye el vapor de agua.

Una norma general es que a mayor capacidad de retención del polímero, o menor sea el tamaño de molécula que pueda retener, mayor será la temperatura requerida para desorber y regenerar la trampa. El uso de carbón activo y gel de sílice plantea el problema de su gran capacidad de retención de agua (Houston y Ji, 1991).

#### II.2.2.5- *ESPECTROMETRÍA DE MASAS*

La innovación tecnológica que ha supuesto el acoplamiento de la cromatografía de gases y espectrometría de masas, permite determinar el espectro de masas de un componente determinado, presente en un pico de un cromatograma de gases, determinando su estructura, e identificándolo con mayor certeza (Prager y Miskiewicz, 1982; Di Giacomo y Mincione, 1994).

Tateo *et al.* (1981) utilizan la espectrometría de masas para controlar la calidad de la esencia deterpenada soluble de limón, producida mediante el uso de resinas estirólicas, ya que durante su puesta a punto aparecían restos de la matriz en el aceite esencial mediante el cambio a resinas de grado alimentario consiguen la producción de deterpenados hidroalcohólicos de limón que analizados por GLC y UV no presentaban ningún tipo de residuo extraño al aceite; para certificar esto utilizan la espectrometría de masas.

Ziegler *et al.* (1992) realizan un estudio sobre las cumarinas y psoralenos presentes en el aceite esencial de limón procedente de Sicilia utilizando las técnicas de HPLC-MS, GC-MS, y NMR, tras varias etapas de separación cromatográfica, y mediante el uso de una columna de fase reversa (RP18), y cromatografía preparativa en capa fina la mayoría de los compuestos se aíslan puros para su posterior identificación en masas. Las cumarinas que no se separan bien en HPLC se analizan mediante GC-MS, tras formar su derivado trimetilsililado para aumentar su volatilización.

#### II.2.2.6- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN NO VOLÁTIL POR HPLC

Las cumarinas y psoralenos, constituyen una clase de compuestos caracterizados por una gran diversidad estructural y una presencia diferenciada en el reino vegetal. Estos compuestos pueden jugar un importante papel en el control de calidad y

genuinidad de los aceites esenciales de cítricos, así como en sus métodos de producción.

Según McHale y Sheridan (1988) se puede determinar la adición fraudulenta de sustancias como pueden ser el p-dimetilaminobenzoato y algunos derivados cumarínicos que poseen la misma absorción en UV que las cumarinas y psoralenos presentes de modo natural en aceite esencial de limón.

Cuando los aceites esenciales poseen valores de CD altos admiten la dilución con pequeñas cantidades de aromas recuperados por corriente de aire sin que se puedan detectar por este método. La dilución puede ser mayor si además se le añaden al aroma recuperado compuestos con una absorción UV semejante a la que producen los propios componentes existentes en el aceite natural.

Con este propósito se incluyen filtros solares como ocurre con la mezcla salicilato y antranilato de metilo y el p-dimetilaminobenzoato de etilo, así como aceites esenciales de pomelo-lima. La absorbancia en UV del aceite de lima es diez veces mayor que el del limón y el de pomelo unas tres veces mayor. Esta medida de CD que detecta adulteraciones groseras, no es capaz de detectar la adición de aceites recuperados a los que se les añaden pequeñas cantidades de estos otros aceites.

Los compuestos oxigenados heterocíclicos no volátiles, responsables del espectro característico de absorción en UV del aceite esencial del limón son estructuras de composición química bien conocida. Cada uno de ellos posee un punto

diferente de máxima absorción en UV, dependerá pues de la concentración en la que se encuentre cada uno la variación en la absorción que aparezca en el espectro y por tanto podría ser un método útil de detección de anomalías la determinación de las variaciones de las concentraciones de los distintos compuestos oxigenados heterocíclicos presentes, de forma natural en el aceite esencial de limón a lo largo de la campaña. La composición que estos autores determinan en cumarinas y psoralenos es la mostrada en la Tabla II.2.2.6.1

Se observa en un 25% de aceites esenciales comerciales la aparición de un pico eluído antes de la bergamotina atribuido a etil-p-dimetilaminobenzoato, confirmando que éste éster es el que se utiliza con más frecuencia para enmascarar la adulteración. Aparece también aurapteno que eluye junto a la 5-penteniloxi-7-metoxicumarina (cumarina minoritaria en el aceite esencial del limón) y que reduce el reduce aproximadamente 4 veces el área del pico de absorción en el espectro de UV y sitúa un punto de inflexión aproximadamente en los 295nm. El aurapteno es la cumarina presente en mayor proporción en el aceite esencial de pomelo, que presenta otra serie de picos que eluyen con posterioridad al byakangelicol y permiten determinar la presencia de este aceite.



**TABLA II.2.2.6.1- COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN DE CUMARINAS Y PSORALENOS EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

<b>Componente</b>	<b>ppm</b>
bergamotina	2.200
5-geraniloxi-7-metoxicumarina	1.600
isoimperatorina	180
5-isopenteniloxi-7-metoxicumarina	80
? (UV cumarina sustituida en 7 )	10
citropteno	650
8-geraniloxipsoraleno	750
felofterina + isoimperatorina	90
5-isopennteniloxi-8-epoxiisopentiloxipsoraleno	220
? (UV mal definido)	-
oxipeucedanina	1.100
byakangelicol	450
hidrato de oxopeucedanina	260
byakangelicina	70

McHale y Sheridan, 1988

Se ha observado también que algunos aceites esenciales comerciales presentaban valores de herniarina inferiores a los normales, lo que sugiere que esta cumarina se utilizó para ajustar el valor del mínimo de absorción que se registra en el espectro. Según Robards *et al.* (1997) los flavonoides tienen un papel idóneo como marcadores quimio-taxonómicos por su ubicuidad y número en los frutos y su especificidad en las distintas variedades e incluso cultivos. Esta aplicación se ha extendido con el fin de detectar adulteraciones del zumo (Robards y Antolovich, 1995).

A pesar del éxito de la RPC (Reversed Phase Chromatography) (Perfetti *et al.*, 1988; Sendra *et al.*, 1988; Fernández de Simón *et al.*, 1992; Mouly *et al.*, 1994; Ooghe *et al.*, 1994) la separación entre glicósidos y agliconas no es adecuada para la resolución de una mezcla compleja que contiene muchos compuestos de cada grupo. Por esta razón se ha hecho práctica regular separar las diferentes clases de flavonoides en un paso previo de extracción. Por otro lado, la elución en columna se usa particularmente en los análisis de glicósidos para desechar los grupos de compuestos no deseados tras un cromatograma.

Usando HPLC con detectores de UV y fluorescencia, los cromatogramas son como “huellas dactilares” cuantitativas de los flavonoides presentes en el zumo. La composición de estos zumos es ideal para este tipo de análisis: La mayoría de los enzimas son inactivados en la primera hora tras la extracción por el pH relativamente bajo, y procesos de oxidación que pueden causar cambios en flavonoides sensibles se suprimen gracias a concentraciones de ácido L-ascórbico relativamente altas.

Según los datos del espectro los flavonoides que predominan en el limón son la hesperidina y la eriocitrina. Los cromatogramas de fluorescencia son más complejos que los de UV, lo que sorprende, ya que el número de compuestos fluorescentes es menor que el de materiales absorbentes; esto hace pensar que las medidas por fluorescencia no son fiables en el rango de emisión de 300-350nm.

Ziegler *et al.* (1992) sobre diferentes muestras de aceite esencial de limón de “invierno” obtenido mediante máquinas “sfumatrice” procedente de Sicilia de la campaña 89-90, extraen los volátiles a vacío y temperatura ambiente, el residuo se pasa por una columna de fase reversa RP-18, para eluir los componentes no polares; el eluato se fracciona posteriormente mediante TLC (thin-layer chromatography), se obtienen ocho fracciones que se estudian posteriormente por HPLC para purificarlas y poderlas analizar mediante HMNR, y GC-MS bien directamente o mediante derivatización. Determinan de esta forma veintinueve componentes de los que once de ellos no habían sido detectados hasta ese momento como presentes en el limón, y entre estos:

5-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutioxi)-7-metoxicumarina

5-(2',3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)-7-metoxicumarina

8-(7',8'-epoxigeraniloxi)psoraleno

5-(3'-metilbut-2'-eniloxi)-8-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutoxi)psoraleno

Con excepción de cuatro derivados del sinapil-alcohol, el resto de componentes se identifica como cumarinas, entre ellas aurapteno, considerado como característico del pomelo, y heraclenina indicador de aceite esencial de lima, que están presentes en cantidades traza, sin embargo no se han podido detectar herniarina, isopimpinelinea y epoxibergamotina, -las dos primeras, constituyentes principales del aceite de lima y la última del pomelo-, por ello se puede decir que éstas tres no se encuentran presentes en aceite esencial de limón.

Lo mismo se puede decir del bergapteno que según Shu *et al.* (1975) se encontraría en aceite de limón, aunque su presencia en el mismo no había sido confirmada por medidas espectroscópicas (McHale *et al.*, 1989, Benincasa *et al.*, 1990) y que se ha comprobado no forma parte del mismo. La mayoría de los compuestos se encuentran en cantidades comprendidas cerca de 10mg/K, excepto la cnidicina que se sitúa sobre los 30-40mg/K.

A continuación se presentan según el orden de elución en HPLC los principales componentes cumarínicos determinados por estos autores para el limón siciliano (Tabla II.2.2.6.2).

**TABLA II.2.2.6.2- ORDEN DE ELUCIÓN EN HPLC DE CUMARINAS  
EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN ITALIANO**

---

5-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutoxi)-7-metoxicumarina
hidrato de oxipeucedanina
byakangelicina
citropteno
heraclenina
pabulenol/gosferol
neobyakangelicol
oxipeucedanina
5-(3'metilbut-2'eniloxi)-8-(2',3'dihidroxi-3'metilbutiloxi)psoraleno
imperatorina
7-(3'-metilbut-2'-eniloxi)cumarina
8-(7',8'-epoxigeraniloxi)psoraleno
felofterina
isoimperatorina
5-(3'-metilbut-2'-eniloxi)-7-metoxicumarina
5-(3'-metilbut-2'-eniloxi)-8-(2'',3''-epoxi-3''-metilbutoxi)psoraleno
cnidicina
8-geraniloxipsoraleno
aurapteno
bergamotina
5-geraniloxi-7-metoxicumarina

---

Ziegler y Spiteller, 1992

## **II.3- ACTIVIDADES PARTICULARES**

Determinados componentes específicos del aceite esencial de limón pueden presentar actividades que pueden ser en unos casos favorables y en otros adversas. Así ocurre con los compuestos que poseen actividad antioxidante, sobre todo en la fracción no volátil correspondiente a las ceras, y contrariamente las propiedades alergénicas de los hidrocarburos terpénicos.

### **II.3.1- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Miyake *et al.* (1997) encuentran una mayor actividad antioxidante para la eriocitrina que para el  $\alpha$ -tocoferol actuando sobre el metabolismo de las bacterias intestinales humanas, y en cuanto a sus metabolitos eriodictiol, 3,4-DHCA y PHL, no poseen gran actividad, pero actúan como coadyuvantes protegiendo dicha actividad.

Así mismo estos autores aíslan dos c-glucosilflavonas de la corteza de limón que identifican mediante UV, IR, FAB-MS (fast atom bombardment-mass spectra), H-NMR y C-MNR como 6-8-di-C- $\beta$ -glucosildiosmina (LE-B) y 6-C- $\beta$ -glucosildiosmina (LE-C). Su concentración en HPLC se estima en 216 y 34,8 ppm respectivamente. Se comparan la actividad antioxidante de LE-B y LE-C y de los glicósidos flavonoides del limón usando el sistema del ácido linoleico. Ambas poseen actividad antioxidante aunque menor que la de la eriocitrina y el  $\alpha$ -tocoferol.

Estos resultados sugieren que la eriocitrina tiene la mayor actividad de los flavonoides glicosídicos del limón porque

contiene grupos dihidroxi adyacentes al anillo B, que no tienen LE-B ni LE-C. La actividad de LE-B, LE-C y la diosmina son también distintas aún teniendo la misma aglicona (diosmetina), se piensa que la diosmina tiene menor actividad porque se une a la rutinosa por la posición 7-OH de su anillo A.

Bocco *et al.* (1998) consideran que un modo de valorizar las semillas y cortezas de limón, subproductos de la extracción de zumo, es usarlos como antioxidantes naturales. Se examinaron los extractos en metanol (compuestos fenólicos libres) y los de hidrólisis alcalina (compuestos fenólicos ligados) con un modelo basado en la oxidación acelerada del citronelal. Generalmente las semillas poseen mayor actividad antioxidante que la corteza; según análisis HPLC, los extractos metanólicos eran ricos en flavonas y flavononas glicosiladas, mientras los hidrolizados contenían principalmente ácidos fenólicos y flavonoles.

Las semillas de limón contienen eriocitrina y hesperidina, mientras la piel es rica en neoeriocitrina, naringina y neohesperidina; la concentración de las flavononas glicosiladas es también distinta: neoeriocitrina y naringina tienen concentración similar en la piel, mientras que en la semilla la de eriocitrina es 40 veces mayor que la de naringina.

No se observa una relación clara entre la capacidad antioxidante y la concentración de flavononas glicosiladas de una muestra, pero es conocido que éstas no pertenecen a la familia de antioxidantes más potente. En porcentaje, las semillas, tienen mayor poder antioxidante, pero su contenido en flavononas es menor, además, los extractos que contienen

eriocitrina y neoeriocitrina -las flavononas glicosiladas más eficientes- no son más activos que aquellos que no las presentan (Bocco *et al.*, 1998).

El cálculo de la actividad antioxidante de los extractos en relación con la actividad de cada flavonona y su concentración en el extracto pone de manifiesto que las flavononas sólo pueden explicar un 1% del 20% de actividad de los extractos de semillas y un 36% del 83% de la actividad que posee la corteza. Está claro que especialmente en las semillas, incluso si existe sinergia entre las flavononas glicosiladas; la actividad antioxidante se debe principalmente a otros compuestos como tocoferoles, ascórbico, limonoides y otras sustancias sin identificar. En cuanto a los compuestos fenólicos ligados, los resultados son similares (explican un 2% del 22% de actividad detectada), en este caso parece que los flavonoles explicarían esta actividad en su mayoría.

### **II.3.2- REACCIONES ALÉRGICAS**

En general gran cantidad de plantas suelen producir dermatitis de contacto por diferentes mecanismos, irritativo, alergénico o mixto. El propiamente alergénico o inmunológico puede presentarse bien debido a una reacción de hipersensibilidad aguda, provocando una reacción inmediata, bien por una hipersensibilidad retardada provocando la dermatitis crónica, Las dermatitis de contacto, son frecuentemente señaladas como enfermedades profesionales. Audicana y Bernaola (1992), recogen un caso de dermatitis ocupacional en un camarero, que presenta un eczema crónico y



reacción a los dos y cuatro días cuando se le aplican test cutáneos con lemon-grass y aceite esencial de limón (++), así como con nerolí y geraniol (+). Se asocia fundamentalmente a la presencia de limoneno y geraniol, según estos autores. Esta dermatitis no es muy frecuente, y en cuanto a las reacciones de hipersensibilización aguda son aún más infrecuentes aunque de mayor importancia y se han observado en algunos operarios de empresas transformadoras de cítricos. Por otro lado la “International Fragrance Association”, recomienda que en caso de que se utilicen preparados cosméticos sobre zonas de la piel expuestas a radiaciones solares que contengan como aromatizante aceite esencial de limón, éste no puede superar el 10% (IFRA, 1991), concentración suficientemente elevada para no suponer un obstáculo de su uso en la mayor parte de estos productos cosméticos.

### **III- MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III.1- ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN.**

La materia prima utilizada son muestras comerciales de aceite esencial de limón suministrado por diferentes empresas del sector de transformación de frutos cítricos ubicadas en la región de Murcia, y que procesan fruta en su mayor parte procedente de las producciones de la Vega baja y media del río Segura, y de la provincia de Almería. Son, por tanto, muestras genuinas de aceite esencial de limón recogidas directamente en las factorías de elaboración y representan al aceite esencial de limón que se produce en nuestro país.

Las variedades procesadas son: la variedad Verna cuya producción se extiende más en el tiempo a lo largo del año por presentar varias floraciones durante el mismo, y de la variedad

llamada de limón Fino que se considera como limón de invierno. Dado que las zonas de cultivo de limón en España se han difundido de forma espectacular en las últimas décadas, desde zonas próximas al litoral marítimo hasta áreas del interior, desde el Sur de la Provincia de Alicante hasta la provincia de Málaga, los calendarios de producción se han extendido solapándose en muchas ocasiones en sus momentos de recolección.

### **III.1.1- Muestras de aceite esencial de limón.**

Las muestras en su mayoría han sido procesadas en extractoras FMC "In line". En cuanto a las fechas se han tomado muestras de distintas épocas de producción de varias campañas desde el año 1993, siendo el año 1996 del que mayor número de muestras se recogieron, y por último varias muestras de la última campaña 1998-99.

Se toman muestras directamente de la línea de producción, concretamente a la salida de la centrífuga de pulido, y algunas de la cámara de refrigeración, días después de su industrialización en aquellas épocas de producción más limitada.

Puesto que las muestras no poseen ningún elemento extraño ni añadido, se procede a su análisis directamente, actuando según cada técnica lo requiere. Las muestras se recogen en envases de vidrio color topacio de hasta 200mL, cerradas herméticamente y se conservan en cámara frigorífica a temperatura ligeramente superior a 0°C.

### III.1.1.1- *CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS: COLOR, ASPECTO Y OLOR.*

El aceite esencial de limón es un líquido ligeramente coloreado, que puede variar de amarillo pálido a amarillo-verdoso, algunas veces presenta incipiente turbidez y olor característico del pericarpio fresco de limón.

Para el estudio del color se ha utilizado un colorímetro Minolta CR-200 que permite medir la cromaticidad absoluta, es decir matiz, color y luminosidad, mediante los parámetros:  $Y_{xy}$ ,  $L^*a^*b^*$ ,  $L C H^\circ$ , y densidad colorimétrica. Las muestras de aceite esencial se sitúan en tubos de vidrio de veinte mL de capacidad llenos hasta la mitad, sobre fondo blanco para realizar las medidas.

## **III.2- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS**

### **III.2.1- Determinación de la Densidad**

El principio en que se basa es en la determinación de la masa de la unidad de volumen, expresada en g/mL, a una temperatura dada (20°C). La densidad se representa por "d". La temperatura se ha de controlar exactamente ya que la densidad de estas materias varía aproximadamente 0,00068 unidades por grado. La temperatura de la determinación no debe diferir de la de referencia en más de 5°C (ISO 279, 1981).

Por densidad absoluta de un aceite esencial a 20°C, se entiende el cociente de la masa de un cierto volumen de éste aceite esencial por su volumen, a ésta temperatura. Esta magnitud se expresa en  $\text{g cm}^{-3}$ , y su símbolo es  $\rho_{20^\circ\text{C}}$ .

Por densidad relativa de un aceite esencial a 20°C se entiende el cociente entre las densidades absolutas del aceite esencial y del agua, ambas a 20°C. Esta magnitud no tiene dimensiones y su símbolo es  $\rho_{20}^{20}$ , o bien  $d_{20}^{20}$ .

### **III.2.1.A- Método picnométrico**

Se utiliza un picnómetro normal, o con el termómetro acoplado. El picnómetro ha de estar a la temperatura ambiente. Se llena el picnómetro hasta el borde superior del tubo capilar y se introduce el termómetro, se pesa y se anota la  $T^a$  de la determinación.

Así se calcula la densidad expresada en g/mL y referida a una  $T^a$  de 20°C

$$\text{Densidad} = [(P''-P)/(P'-P)] \times D \text{ (g/mL)}$$

P = peso en g del picnómetro vacío.

P' = peso en g del picnómetro lleno con agua a 20°C.

P'' = peso en g del picnómetro lleno con aceite a 20°C.

D = densidad del agua a 20°C.

El valor de la densidad calculado anteriormente puede corregirse del efecto del empuje del aire por la fórmula:

$$\text{Densidad corregida} = d + 0,0012 \times (1-d)$$

Donde d es la densidad sin corregir.

La temperatura de la determinación y la T<sup>a</sup> de referencia se relacionan en la siguiente forma:

$$\begin{aligned} d' &= d + (t-t') \times 0,00068 && \text{si } t > t' \\ d' &= d + (t'-t) \times 0,00068 && \text{si } t < t' \end{aligned}$$

d = densidad a la temperatura de la determinación t.

d' = densidad a la temperatura de referencia t'.

### **III.2.1.B- Determinación de la Densidad Absoluta y la Densidad Relativa de Aceites Esenciales mediante Densímetro Digital.**

Se emplea el “Calculating Digital Densitymeter AP, PAAR/DMA46”, un instrumento de medida cuyo fundamento es la variación que experimenta la frecuencia de un circuito oscilante, excitado electrónicamente, al contener un volumen fijo de muestra.

La frecuencia de oscilación es influida únicamente por la masa del volumen de muestra y al mantenerse constante ésta magnitud (por las características de la célula de medida), para



una temperatura, la densidad de la muestra se obtiene como función de la medida de la frecuencia (o del periodo) de oscilación según la expresión:

$$\rho = (1/A) \times (T^2 - B)$$

T es el periodo de oscilación del sistema y A y B son constantes del aparato que se determinan en la operación de calibrado.

El aparato debe estar a temperatura de  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , en la posición "T" se mide el periodo de oscilación de la célula, se introducen aproximadamente 0,7 mL de agua destilada en el interior de la célula de medida, que debe llenarse totalmente. La muestra debe ser homogénea y libre de burbujas por pequeñas que sean. Se obtiene así el periodo de oscilación del agua a  $20^\circ\text{C}$ , y se expresa como  $T_{\text{H}_2\text{O}}$ .

Después de vaciar la célula, limpiar con etanol y secar conectando la bomba de aire del aparato hasta que esté completamente seca, se desconecta la bomba y se obtiene el periodo de oscilación del aire a  $20^\circ\text{C}$ , y se expresa como  $T_{\text{Aire}}$ .

Con los valores T correspondientes el periodo de oscilación de aire y agua y los valores tomados de unas tablas adjuntas, de la densidad de aire y agua, se calculan las constantes A y B de la siguiente forma:

$$A = (T_{\text{H}_2\text{O}}^2 - T_{\text{Aire}}^2) / (\rho_{\text{H}_2\text{O}} - \rho_{\text{Aire}})$$

$$B = T_{\text{Aire}}^2 - (A \times \rho_{\text{Aire}})$$

Se conoce la densidad relativa como:

$$\rho_{20}^{20} = \rho_{20} / \rho_{H_2O}$$

siendo  $\rho_{20}$ , la densidad absoluta de la muestra, y  $\rho_{H_2O}$  la densidad absoluta del agua a 20°C descrita en las tablas comúnmente.

Para calcular las constantes A y B de calibrado de la densidad relativa se usa la siguiente fórmula:

$$A = (T_{H_2O}^2 - T_{Aire}^2) / [ 1 - (\rho_{Aire}^{20} / \rho_{H_2O}^{20}) ]$$

$$B = T_{Aire}^2 - [ A \times (\rho_{Aire}^{20} / \rho_{H_2O}^{20}) ]$$

constantes para  $\rho_{20}^\circ$ : ( B = 36,8704 ) ( A = 26,354 )

constantes para  $\rho_{20}^{20}$ : ( B = 36,8704 ) ( A = 26,3067 )

Las constantes A y B así calculadas, se introducen en la memoria del aparato, con lo que se halla en disposición de medir densidad absoluta y la densidad relativa. Esta operación de calibrado y medida de constantes se lleva acabo en la puesta a punto del aparato. Posteriormente el equipo regula la calibración con la medida de las densidades –al inicio y final del muestreo– de una muestra “blanco” de densidad conocida (en este caso etanol cuya  $d_{20}^\circ = 0,8062$ ).

La determinación de la densidad se realizó en la mitad de las muestras, por el método picnométrico y otra mitad por densímetro digital.

### **III.2.2- Determinación del Índice de Refracción**

El índice de refracción de una sustancia dada es la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire sustancia. Es igualmente la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción (ISO 280, 1976).

Este parámetro, varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y con la temperatura. Salvo indicación contraria el índice de refracción viene referido a la longitud de onda correspondiente a la línea D 589,3 nm de la luz del sodio. El índice de refracción se indica con la notación  $n'_t$  para  $t^\circ\text{C}$  y longitud de onda de la línea D del sodio. Para otra radiación de distinta longitud de onda a  $t^\circ\text{C}$ , la rotación será  $n'_\lambda$ .

Con los refractómetros usuales la observación se hace en luz difusa, provistos de un dispositivo de acromatismo de la radiación D de la luz de sodio. Se utiliza un refractómetro de precisión, que permite apreciar las diezmilésimas, con prismas calentados por circulación de líquido termostatado  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Puede usarse luz blanca si el refractómetro utilizado posee un dispositivo de compensación cromática.

Se llena con una gota del aceite esencial el espacio comprendido entre los dos prismas, y se lee después de cinco minutos, al menos, de contacto. La T<sup>a</sup> de lectura es de 20°C -no debe sobrepasar en  $\pm 2^\circ\text{C}$  la temperatura de referencia-.

### **III.2.3- Determinación del Poder Rotatorio**

Como poder rotatorio (rotación óptica) de un aceite esencial se denomina al ángulo expresado en miliradianes y/o grados sexagesimales de ángulo, que gira el plano de polarización de una radiación luminosa de longitud de onda  $589,3\text{nm}\pm 0,3\text{nm}$ , correspondiente a la radiación D del sodio, al atravesar un paso de luz de 100mm de muestra a 20°C de temperatura (ISO 592, 1981, AENOR 159, 1984).

Si la medida se efectúa con un espesor distinto se debe hacer el cálculo para referirla a un espesor de 100mm. Se utilizaron dos polarímetros uno manual con una lámpara de luz de sodio, y un polarímetro semiautomático ATAGO Polax-D. La longitud de los tubos utilizados en unas muestras es de 20mm y en otras de 100mm.

La medida se efectúa a 20°C, se introduce en el tubo adecuado la muestra de aceite esencial, procurando no dejar ninguna burbuja de aire. Se coloca en el polarímetro, y se lee el ángulo de rotación en la escala que lleva el aparato. Se realizan tres medidas de cada muestra y obtenemos la media -siempre

que no difieran más de 0,08°, ó, 1,4mrads, que serán rechazadas-.

La expresión aplicada es la siguiente:

$$\alpha_D^t = ( A / l ) \times 100$$

A: Angulo de rotación en milirradiantes ó en grados

l: Longitud del tubo en mm

Se debe medir con una precisión de  $\pm 0,17^\circ$  o 0,3mrads

#### **III.2.4- Solubilidad en Etanol**

Generalmente los aceites esenciales son sólo ligeramente solubles en agua y miscibles en etanol absoluto. La determinación del número de volúmenes de alcohol diluido, a una graduación dada, que se requieren para la completa solubilización de un volumen de esencia, es una ayuda rápida en la evaluación de su calidad; aceites esenciales ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en etanol diluido que los aceites en cuya composición predominan los hidrocarburos terpénicos.

La temperatura influye en la solubilidad: según las normas que se apliquen (USP, NF, BP) se determina de 15 a 25°C. Se determina la solubilidad según ISO 875 (1981) a 20°C.

Se pone exactamente 1mL de aceite esencial en una probeta de tapón esmerilado y se añade etanol de una determinada dilución en proporciones pequeñas sirviéndose de una bureta. Después de cada adición se agita enérgicamente y se observa el resultado.

Una vez lograda la disolución clara, se anota la cantidad de alcohol añadida y se continúa añadiendo hasta completar los 10mL, observando si se produce algún enturbiamiento posterior. Puesto que la solubilidad varía con la temperatura, ésta determinación se realiza a temperatura constante con ayuda del baño termostático.

Se utilizan mezclas alcohólicas de 50 a 95% (v/v), empezando por las de mayor graduación, descendiendo de cinco en cinco grados. Si el aceite es soluble en 10 volúmenes de una graduación dada "G", se determinará su solubilidad en la inmediata disolución alcohólica superior "G+5". Por el contrario si es muy soluble en menos de un volumen de esa mezcla alcohólica, se determinará en la siguiente graduación inferior "G-5".

Para expresar el resultado de éste ensayo se define el aspecto de la disolución según las siguientes anotaciones típicas:

A) Solubilidad en etanol de **X°**. Claramente soluble en "A" volúmenes y en más, de alcohol y permanece clara con la adición hasta 10 volúmenes.

B) Solubilidad en etanol de **X°**. Claramente soluble en "A" volúmenes y turbio por dilución, si la disolución clara con "A" volúmenes se enturbia después de la disolución gradual hasta 10 volúmenes.

C) Solubilidad en etanol de **X°**. Claramente soluble en "A" volúmenes y turbio en "B" volúmenes, presenta el enturbiamiento de la disolución clara en A volúmenes, cuando se diluye a B y B es menor de 10.

Cuando no se obtiene una disolución clara se observa si se produce una separación después de 24 horas de reposo. Asimismo se dice que la disolución es "opalescente", "ligeramente opalescente" y "muy ligeramente opalescente", cuando la turbidez que presenta es comparable a la obtenida al añadir dos gotas de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  N/10 en 100mL de disolución de 2, 0,2 y 0,02g/L de  $\text{ClNa}$  respectivamente.

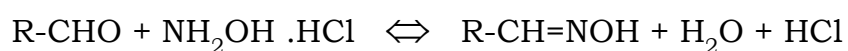
### **III.2.5- Residuo de evaporación**

La determinación del residuo de evaporación se lleva a cabo mediante el método descrito en la norma ISO 4.715 de 1978, para aceites esenciales. El residuo de evaporación es el porcentaje de masa que se obtiene tras la eliminación de la fracción volátil por calentamiento de la muestra al baño maría y posterior enfriamiento en un desecador. El resultado se expresa como porcentaje de masa del residuo respecto de la masa inicial.

### III.2.6- Índice de Carbonilo expresado como Citral

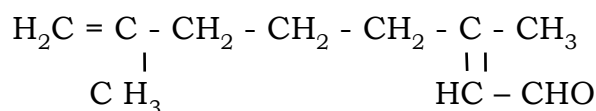
El fundamento de ésta técnica se basa en que la adición del clorhidrato de hidroxilamina produce la oximación -por parte de la hidroxilamina- del doble enlace carbonílico del grupo aldehído formando una aldoxima y liberando el HCl.

La reacción esquemáticamente presentada sería:



Completada la reacción se valora el HCl liberado que se relaciona con el contenido en grupos carbonílicos en la muestra y que se calcula en gramos del aldehído citral. El final de la reacción se ha determinado por viraje de indicador (azul de bromofenol) o por potenciometría.

En el caso de que más de un aldehído o cetona estén presentes en el aceite esencial, se expresan todos como uno de ellos, el que se considere más representativo. El aldehído predominante en el aceite esencial de limón es el citral que presenta dos isómeros citral *trans* o geranial y citral *cis* o neral.



*Citral*



Los reactivos preparados para la determinación se corresponden con:

-Clorhidrato de hidroxilamina: 3,6g se disuelven en 39,25 mL de agua destilada y se aforan a 100mL con alcohol de 95%

-Azul de bromofenol. Se prepara a partir de 0,1g del mismo disuelto en 5 mL de NaOH 0,5N

Se miden (pesan) exactamente 10mL de aceite esencial en una probeta de 25mL con tapón esmerilado. Se añaden aproximadamente 7 a 10mL de clorhidrato de Hidroxilamina en etanol de 60° y unas gotas de naranja de metilo y se valora con KOH 0,5 N (en etanol de 60°) pasados 15 minutos.

El punto final se puede determinar por potenciometría, para evitar los inconvenientes que provienen de la dificultad de apreciar el viraje con el indicador. En este caso se añaden 10g de aceite esencial a 30mL de clorhidrato de hidroxilamina y se agita durante quince minutos y se valora a continuación con KOH 0,5N. El pH de inicio es el que corresponde al clorhidrato de hidroxilamina más el aceite esencial, y el punto final se alcanza a pH de 3,4.

Los cálculos son los siguientes:

$$\text{Citral}_{(p/v)} = 0,0761 \times (V_{\text{KOH}} \times f_{\text{KOH}}) / 10 \times 100$$

$$\% \text{Citral}_{(p/p)} = 0,0761 \times V_{\text{KOH}} \times f_{\text{KOH}} / 10 \times d_{\text{ae}} \times 100$$

(La  $d_{\text{ae}}$  se considera 0,850)

Otro método de preparar la disolución de clorhidrato de hidroxilamina 0,5N es disolviendo 21,5g de polvo del mismo cristalizado en 30mL de agua destilada. Se calienta a 65° en baño de vapor hasta obtener una disolución clara. Se añade lentamente a 908,6 mL de etanol de 95% y se agita. Se añade entonces 12,5mL de una solución al 0,1% de azul de bromofenol en alcohol de 50% y suficiente cantidad de NaOH alcohólica 0,5N hasta viraje de amarillo a verdoso.

Esto requiere generalmente de 2 a 2,5mL. Se sabe que se adquiere un grado adecuado de neutralización cuando 35mL de la disolución de claro matiz verdoso cambia a amarillo con la adición de HCl 0.5N.

Los métodos de la hidroxilamina han sido desarrollados para determinados aldehídos y cetonas, la primera emplea una solución de clorhidrato de hidroxilamina y la subsiguiente neutralización con álcali factorado del clorhídrico liberado en la reacción. La segunda técnica emplea una disolución de hidroxilamina. (clorhidrato de hidroxilamina) en la que el HCl ha sido neutralizado previamente con un álcali, después de la reacción con el aldehído o la cetona la mezcla es valorada con ácido normalizado. El procedimiento anterior es conocido como método de Stillman-Red.

Estos métodos de la hidroxilamina ofrecen muchas ventajas sobre los procesos de absorción. Relativamente requieren menos cantidades de aceite esencial. para una

determinación. La reacción de la hidroxilamina con el aldehído es rápida acortando el tiempo necesario para una determinación.

Los métodos han sido comprobados satisfactoriamente para la determinación de ciertas cetonas (mentona y tuyona) que no pueden ser determinadas convenientemente por los procesos de absorción. De hecho la hidroxilamina reacciona prácticamente con todos los aldehídos y la mayor parte de las cetonas encontradas en el aceite esencial.

Además, éstos métodos, resultan excepcionalmente aplicables a aceites que contienen sólo pequeñas cantidades de aldehído o cetona por ejemplo aceite esencial de limón, y a aceites que contienen gran cantidad de ácidos libres por ejemplo lirio de Florencia. Las disoluciones usadas para los procedimientos estándar, son estables y pueden guardarse durante muchos meses, a excepción de la disolución de Stillman-Red que es conveniente prepararla sólo cuando se vaya a usar.

Las desventajas son que el cálculo de los resultados envuelve el peso molecular del aldehído o cetona, dando porcentajes por peso, por tanto adulteraciones con compuestos carbonílicos de bajo peso molecular dan porcentajes aparentes elevados.

### **III.3- ESPECTROFOTOMETRÍA UV. ÍNDICE CD**

El método se basa en la determinación del espectro de absorción de la disolución alcohólica de aceite esencial de limón (250mg en 100mL alcohol etílico), usando de blanco etanol, en el

rango de longitudes de onda comprendido entre 260 y 400nm, según la norma ISO 4.735 (1981).

La magnitud de la línea CD depende en parte de los hidrocarburos terpénicos, del citral, y principalmente de los constituyentes de naturaleza no volátil, como psoralenos y cumarinas. La curva de absorbancia en UV produce un máximo en torno a los 315nm. El valor CD se determina por la distancia entre el máximo de absorción y el punto que corta la tangente entre el mínimo y el punto de inflexión de la curva. En la Figura III.3.1 se observa el espectro en UV característico del aceite esencial de limón y el valor CD

Se utiliza también la relación siguiente:

$$CD \times 100/ED$$

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro digital UVIKON de la marca KONTRON.

Para facilitar la medida de este parámetro se realiza un pequeño programa en lenguaje BASIC que permite hacer los cálculos de dicho valor, ya que en la pantalla del espectrofotómetro o en el registro gráfico de la impresora obtenido a partir del mismo las imágenes se distorsionan fácilmente y pueden dar medidas equívocas al determinarlo en la representación gráfica.

ABSORBANCIA

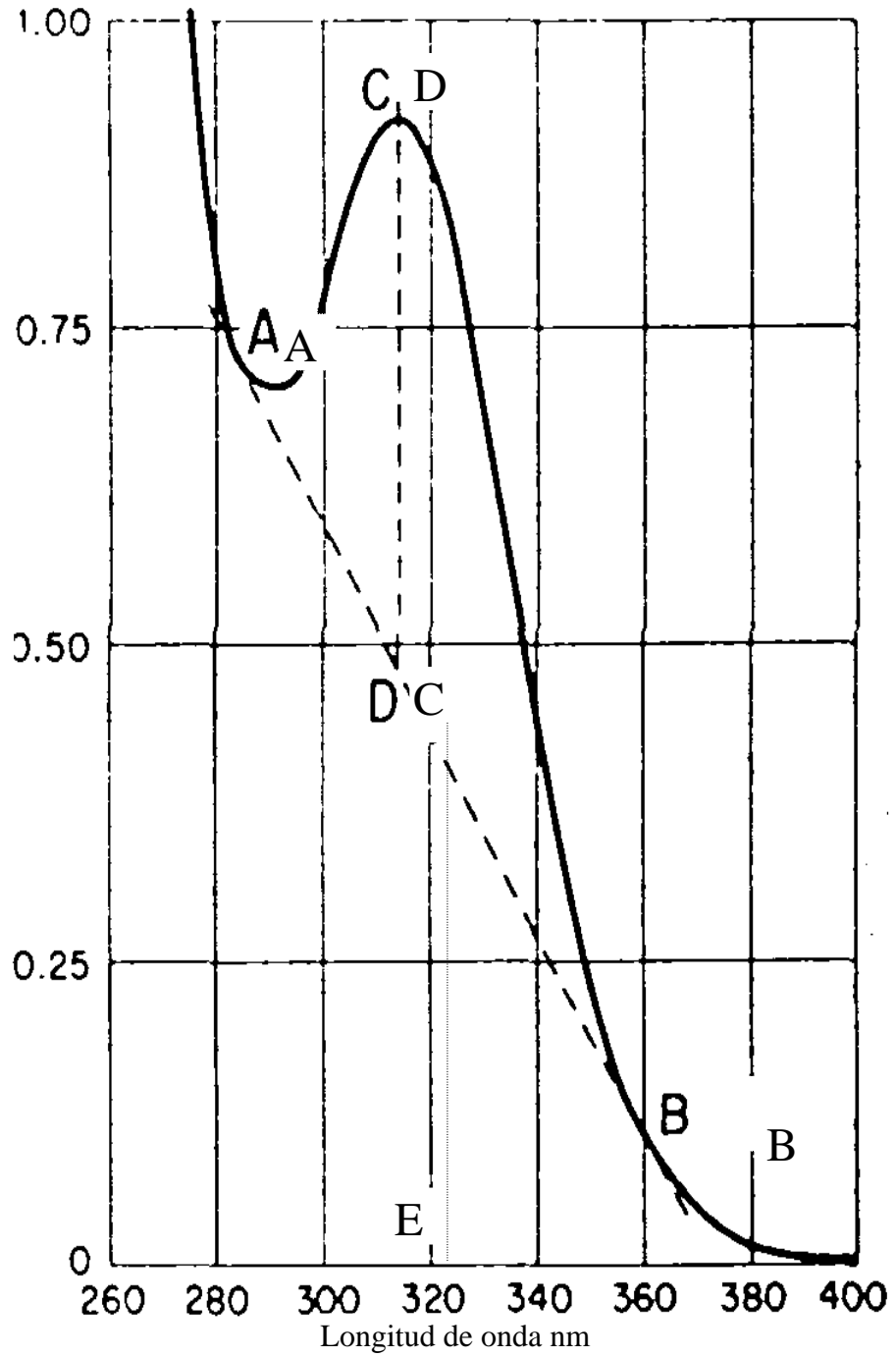


FIGURA III.3.1- ESPECTRO DE UV DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN Y LINEA CD

El programa es el siguiente:

List

Auto

```
10 INPUT "Abs max"; YM
20 INPUT "λmax"; XM
30 INPUT "Abs min"; YA
40 INPUT "Abs inf"; YB
50 INPUT "λmin"; XA
60 INPUT "λinf"; XB
70 A=(YA-YB)/(XA-XB)
80 B= YB- A . XB
90 PRINT "Parametro A="; A
100 PRINT "ParametroB="; B
110 Y= A . XM + B
120 YF= YM-Y
130 (L) PRINT "CD="; YF
140 RETURN
```

De esta forma introduciendo los valores de absorbancias y de longitudes de onda de máximo, mínimo y punto de inflexión obtenemos directamente el valor CD sin tener que recurrir al método gráfico, ahorrando tiempo y evitando el inconveniente de que los gráficos, obtenidos por impresora de un sistema digital, no coinciden con los registros sobre papel semilogarítmico.

### **III.4- CROMATOGRAFÍA DE GASES. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

El análisis por cromatografía en fase gaseosa, en condiciones especificadas de una pequeña cantidad (evitando que la muestra inyectada pueda llegar a saturar la columna) de aceite esencial en una columna de diámetro pequeño y longitud importante, como son las columnas capilares de pared recubierta (WCOT), permite la separación e identificación de los componentes de mezclas muy complejas como es el aceite esencial, y de una forma absolutamente sencilla, ya que al ser un producto de elevada volatilidad, puede ser sometido a ésta técnica sin necesidad de tener que actuar sobre la muestra, y evitando por tanto, toda alteración en el producto original, cosa que no es usual en la mayoría de los métodos de fraccionamiento e identificación.

Esta técnica permite, dado el caso, la localización de los distintos compuestos por mediación de sus índices de retención, así como la determinación cuantitativa de los compuestos específicos por medio del cálculo de área de sus picos (ISO 8.432, 1987).

#### **III.4.1- Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes volátiles en aceite esencial**

Los componentes volátiles son identificados y valorados cuantitativamente mediante cromatografía de gases, empleando para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 Serie II plus, equipado con un detector de ionización de llama (FID). La

separación se lleva a cabo en diferentes columnas capilares detalladas más adelante.

El perfil cromatográfico da una idea a simple vista tanto del aceite de que se trate como de la columna, pero para afinar más en la determinación de los componentes se debe conocer el orden en el que aparecen en el cromatograma, y este va a depender, además de la polaridad de la fase estacionaria utilizada, del programa de temperatura aplicado, del flujo de gas, y de la concentración de algunos componentes mayoritarios que asumen en su concentración a picos minoritarios que eluyen muy próximos.

Para determinar este orden se han utilizado las referencias bibliográficas existentes sobre cada columna o similares en su composición, además se han utilizado mezclas de patrones, bien inyectadas a modo de estándar, determinando sus parámetros de retención, bien añadiendo una alícuota a la muestra de aceite para observar el incremento del pico a determinar. Sería deseable poseer todos los patrones de los componentes que se supone forman parte del aceite esencial, pero estos son compuestos naturales a veces difícilmente purificables y en cantidades realmente pequeñas como para obtenerlos comercialmente.

Para intentar obviar este problema se recurre a la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases, muy valiosa cuando se trata de identificar compuestos puros o mezclas sencillas de componentes, pero que tiene el inconveniente en este caso de que al ser tan complejas las muestras, y además derivados del isopreno de estructura muy



similar generalmente en muy bajas concentraciones, ya que los mayoritarios están bien determinados, y por otra parte el vacío necesario para el detector de masas hace que los tiempos de retención varíen respecto a los determinados en el equipo con detector de ionización de llama.

Así mismo se ha utilizado la inyección de la muestra junto con patrones de la serie hidrocarburos saturados comprendidos entre C7 y C24, con el fin de determinar los índices de retención. Los índices de Kovats se obtienen para estas dos columnas utilizando el mismo programa de temperatura y tiempo, que comienza a 60°C con un gradiente de 2,5°C/min, hasta alcanzar 210°C que se mantiene durante 15 minutos comparándolos con los registrados en la bibliografía

Así se puede confirmar en mayor o menor medida -ya que influye el programa de temperatura utilizado por los distintos autores, así como las columnas que no son exactamente iguales o pueden tener ligeras modificaciones en su polaridad- que se trata del componente correspondiente.

Las características de las columnas utilizadas se exponen a continuación:

*1) Columna OV101 (polidimetilsiloxano)*

Polaridad de la columna	Apolar
Fase Estacionaria	OV-101
Longitud de la columna	60m.
Diámetro interno	0,25mm.
Diámetro externo	0,39mm
Espesor de la fase estacionaria	0,20µm.

2) CPWAX-52-CB (polietilénglicol ligado)

Polaridad de la columna	polar
Fase Estacionaria	CP-Wax-52 CB
Longitud de la columna	50m.
Diámetro interno	0,25mm.
Diámetro externo	0,39mm.
Espesor de la fase estacionaria	0,20 $\mu$ m.

3) HP5 (5%)difenil(95%)dimetilpolisiloxano copolímero

Polaridad de la columna	baja polaridad
Fase Estacionaria	HP-5
Longitud de la columna	30m.
Diámetro interno	0,25mm.
Diámetro externo	0,39mm.
Espesor de la fase estacionaria	0,25 $\mu$ m.

Las temperaturas de inyección y detección utilizadas han sido 250°C en ambos casos. El gas portador empleado es Helio, siendo el flujo en columna de 1mL/minuto. En la inyección se emplea una relación de división de flujo de 100:1. Las cantidades de muestra inyectada varían entre 0,05 $\mu$ L y 0,7 $\mu$ L.

A continuación se detallan los programas de temperatura y tiempo del horno aplicados en las diferentes columnas; se pretende con ello obtener la mayor resolución de los picos y evitar prolongar en exceso el tiempo de análisis. Esto se logra evitando los platos iniciales ya que concentran la muestra al inicio y empeora la resolución y adecuando la velocidad de la rampa de temperatura, que si es muy elevada, produce también la aglomeración de algunos picos y si es muy lenta, los deforma.

**Columna OV101:***Programa 1-*

Temperatura inicial	65°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	3°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	2,5 minutos

*Programa 2-*

Temperatura inicial	75°C
Tiempo inicial	8 minutos
Programa	4°C/min
Temperatura Final	200°C
Tiempo Final	4 minutos

*Programa 3-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	2 minutos
Programa	2°C/min
Temperatura Final	180°C
Tiempo Final	10 minutos

*Programa 4-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	2 minutos
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	180°C
Tiempo Final	10 minutos

*Programa 5-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	15 minutos

**Columna CPWax 52CB:**

*Programa 1-*

Temperatura inicial	65°C
Tiempo inicial	5 minutos
Programa	2°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	2,5 minutos

*Programa 2-*

Temperatura inicial	90°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	1,5°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	2,5 minutos

*Programa 3-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	4°C/min
Temperatura Final	220°C
Tiempo Final	15 minutos

*Programa 4-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	15 minutos

**Columna HP5:**

*Programa 1-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	4 minutos
Programa	1°C/min, hasta 64°C
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	155°C

*Programa 2-*

Temperatura inicial	60°C
Tiempo inicial	0 minutos
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	210°C
Tiempo Final	15 minutos

#### III.4.1.1- CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).

Se realiza en un cromatógrafo de gases de características idénticas al anteriormente descrito y acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972 como detector. La columna utilizada es la HP5. La temperatura programada para el inyector es de 250°C y para el detector de 280°C. El gas portador de igual forma es el Helio con un flujo en columna de 1,3mL/min y una relación de división de 16:1. La cantidad de muestra inyectada es de 1µL.

El programa de temperatura aplicado del horno ha sido:

Temperatura inicial	50° C
Tiempo inicial	2 minutos
Programa	1,5°C/min, hasta 85°C
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	160°C

La identificación se realiza por comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención de los componentes a identificar con los de los componentes puros empleados como patrones de referencia.

#### III.4.1.2- ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO:

Para llevar a cabo esta técnica de espacio de cabeza estático se han utilizado dos métodos:

A) La microextracción en fase sólida (SPME), mediante una jeringa especial con un relleno de carácter apolar (Peppard, 1999; Laencina *et al.*, 1999), el polidimetilxilosano (PDMS), se introduce en un vial sellado donde en el fondo se depositan 0,5mL de aceite esencial dejándolo cinco minutos a temperatura ambiente para que se alcance el equilibrio, tiempos mayores provocan la desorción de los componentes presentes en menores porcentajes y sobre todo los más polares que presentan menor afinidad por el recubrimiento polimérico.

No es necesario someter la muestra a la acción de ultrasonidos para favorecer la evaporación de los componentes ya que estos son altamente volátiles. A continuación se inyecta en el cromatógrafo de gases dejando dos minutos la fibra dentro del inyector, no se aconseja más tiempo ya que se acorta la vida útil de la misma por que puede perder relleno la fibra por sobrecalentamiento (Jordán, 1999).

B) Inyección del espacio de cabeza que produce en un vial de 5mL de capacidad, 0,5mL de aceite esencial de limón tras una hora a temperatura ambiente para alcanzar el equilibrio y lograr la saturación del espacio de cabeza con los componentes volátiles presentes en la muestra. Debido a la elevada volatilidad de la mayoría de los componentes este tiempo se considera suficiente para lograr el equilibrio.

## **IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





#### **IV.1- CARACTERÍSTICAS SENSORIALES.**

Se describen a continuación de forma somera, los aspectos más representativos de los análisis sensoriales en aceite esencial de limón. El aspecto de las muestras de trabajo, característico del aceite esencial de limón, es el de un líquido aceitoso entre amarillo-verdoso y amarillo oscuro que algunas veces puede presentar cierta turbidez y el olor característico del pericarpio fresco de limón.

##### **IV.1.1- Determinación del aroma**

En efecto, el análisis sensorial de los aceites esenciales en general y en concreto el de limón se limita a la estimación de los atributos de aspecto, color y olor fundamentalmente.

En cuanto al aroma en concreto algunos expertos pueden utilizar para describirlo diferentes calificativos: Fondo correcto, fresco, áspero, plano, regular etc. Salida muy bien, bien, correcta, verde, frutada, enclenque, etc. (AENOR, 1993).

Cabe destacar que el olor a pericarpio fresco de limón, cuando es percibido por un experto acostumbrado, encuentra una gran cantidad de matices que pocos aprecian, de aquí la importancia que se deriva de técnicas como el estudio del espacio de cabeza y de la nariz electrónica sobre todo, ya que entre los paneles de expertos existen también variaciones en la apreciación que resultan difíciles de relacionar pues a veces dependen también del destino final del aceite, por ejemplo, para aplicación en alimentos , como se ha venido usando en mejorar el gusto de los concentrados de zumo y para potenciar el aroma de zumos congelados y bebidas refrescantes y en perfumería.

#### **IV.1.2- Determinación del color en aceite esencial de limón**

Para un mismo método de extracción la medida del color de la muestra es resultado de la madurez del fruto procesado, así como de la variedad del limón o la zona de cultivo. Esta medida se viene realizando a simple vista calificando la tonalidad entre amarillo claro y verde amarillento. Utilizando un colorímetro digital podemos obtener unos parámetros físicos que nos den valores más objetivos de medida del color y permitan afinar más en la relación que posee el color de la muestra con la calidad del aceite esencial obtenido.

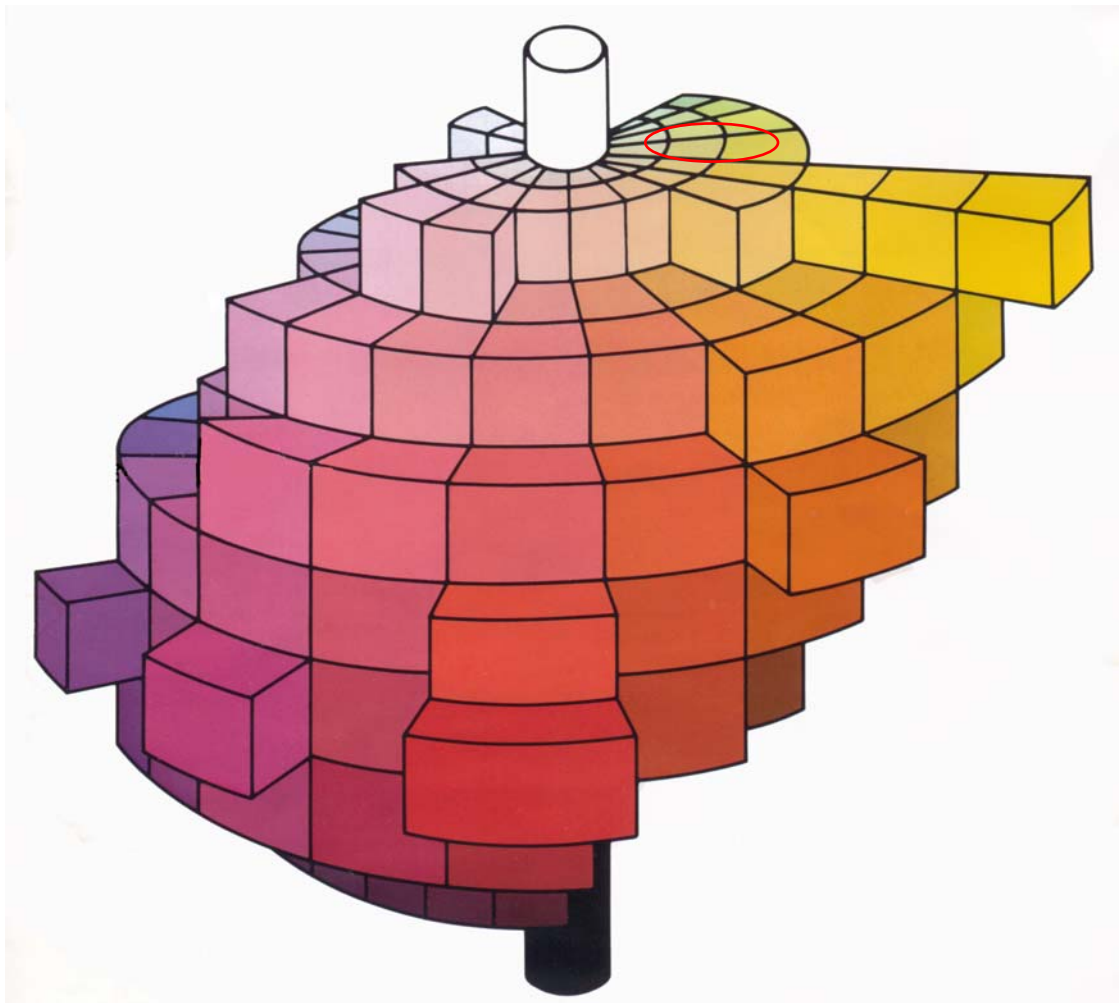
El valor numérico de “L\*” define la luminosidad y los parámetros “a\*” y “b\*” la cromaticidad. Cuando “a\*” toma valores negativos, la cromaticidad se aproxima al color verde, mientras que para valores de “a\*” positivos tiende hacia cromaticidad roja. En relación a la notación cromática de “b\*”, los valores más negativos, presentan tonalidad azul, y los positivos tonalidad amarilla. Los valores obtenidos mediante determinación colorimétrica para doce muestras diferentes de aceite esencial de limón se describen en la Tabla IV.1.2.1.

Representando los datos en el diagrama de L\*a\*b\* en la figura IV.1.2.1, se comprueba que se localizan en la zona del amarillo-verde. En relación a los resultados del parámetro b\*, las muestras poseen color amarillo más o menos intenso, y los valores de a\* -salvo dos muestras con tendencia a ligera coloración anaranjada- indican coloración verdosa. El conjunto de estos datos, y los valores de luminosidad que se sitúan todos por encima de 30 refleja la coloración característica del aceite esencial de limón amarillo-verdosa.

Realizando un seguimiento del color de los frutos previo su procesamiento y el resultado del color del aceite esencial de limón obtenido con el colorímetro digital se podría valorar la relación entre la variación del color de las muestras y el aroma obtenido, ya que interesa que los frutos no estén en condiciones extremas de desarrollo fisiológico. En cualquier caso la gama de color obtenida por los procedimientos de extracción actuales es comúnmente aceptada en el mercado de consumo.

**TABLA IV.1.1 PARÁMETROS CROMÁTICOS L\*a\*b\* EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

<b>L*<sub>max</sub></b>	<b>L*<sub>min</sub></b>	<b>L*<sub>med</sub></b>	<b>L*<sub>SD</sub></b>	<b>a*<sub>max</sub></b>	<b>a*<sub>min</sub></b>	<b>a*<sub>med</sub></b>	<b>a*<sub>SD</sub></b>	<b>b*<sub>max</sub></b>	<b>b*<sub>min</sub></b>	<b>b*<sub>med</sub></b>	<b>b*<sub>SD</sub></b>
35,05	34,77	34,87	0,11	0,26	-0,13	0,09	0,19	2,55	1,96	2,24	0,19
34,85	34,77	34,8	0,04	0,26	0,26	0,26	0	2,31	2,2	2,26	0,05
34,75	34,59	34,64	0,06	-0,11	-0,26	-0,18	0,06	2,02	1,25	1,73	0,3
34,75	34,6	34,66	0,07	-0,11	-0,26	-0,21	0,08	1,66	1,25	1,49	0,21
34,54	34,46	34,5	0,04	-0,19	-0,26	-0,22	0,03	1,99	1,86	1,91	0,07
34,74	34,63	34,67	0,05	-0,34	-0,42	-0,38	0,04	1,86	1,68	1,78	0,09
32,96	32,25	32,58	0,35	0,07	-0,26	-0,08	0,16	1,3	0,09	0,66	0,6
32,38	32,15	32,29	0,12	-0,41	-0,42	-0,42	0,01	2,85	2,73	2,8	0,06
32,25	31,92	32,11	0,17	-0,78	-0,89	-0,84	0,05	2,73	2,6	2,67	0,06
32,31	32,25	32,29	0,03	-0,77	-0,89	-0,85	0,06	3,64	3,31	3,5	0,17
32,27	31,9	32,11	0,19	-0,85	-1,02	-0,94	0,08	3,34	3,08	3,25	0,14
35,05	34,76	34,84	0,1	0,26	-0,37	-0,06	0,26	2,55	1,96	2,23	0,16



**FIGURA IV.1.2.1- DIAGRAMA DE COLOR L\*a\*b\***

## IV.2- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Los parámetros físico-químicos de los aceites esenciales de limón han constituido, junto a la evaluación sensorial, hasta la introducción del análisis instrumental el método más adecuado para definirlos y, aunque, a veces, no resultan muy específicos para cada una de las muestras, permiten detectar de forma rápida alteraciones en alguna de las fases de producción o son indicativos de la presencia más o menos destacada de algunos constituyentes del aceite (Liberti *et al.*, 1973).

### IV.2.1- RESIDUO DE EVAPORACIÓN

Este representa la fracción no volátil de aceite esencial que generalmente está constituida por ceras, parafinas, cumarinas, furocumarinas de carácter y componentes de elevado peso molecular. Parece estar relacionado con el tiempo que está el aceite en contacto con la corteza durante la expresión, y con el tipo de proceso de extracción que produce un mayor o menor esfuerzo mecánico sobre la corteza del fruto (Rodano, 1930; Kesterson *et al.*, 1971), este contacto es mayor en las máquinas tipo “pelatrice” que en las de tipo “sfumatrice”. Valores anormalmente elevados de algunos parámetros físicos (índice de refracción, poder rotatorio, etc.) indican en ocasiones posibles contaminaciones con aceites de diverso origen; por el contrario valores muy bajos determinarían una mayor presencia de terpenos.

Di Giacomo y Mincione (1994) obtienen para el aceite esencial de limón italiano los siguientes valores: 1,78% mínimo y 3,77% máximo, Kesterson *et al.* (1971) encuentran para limón

italiano un mínimo de 1,5% y un máximo de 2,2%; para el procedente de USA un mínimo de 1,5% y un máximo de 1,8%. En muestras de limón español Liberti *et al.* (1973) obtienen valores comprendidos entre 1,92% y 3,24%.

En la determinación del residuo seco realizado con cuarenta y siete muestras, procedentes de varias campañas, se obtuvieron los siguientes porcentajes que se presentan en la Tabla IV.2.1. Los resultados obtenidos en esta memoria oscilan entre 1,7 y 3% y son comparables a los obtenidos por Di Giacomo y Mincione en 1994, para máquinas de tipo “sfumatrice”, ya que las muestras no provienen de máquinas raspadoras y presentan menor porcentaje de residuo de evaporación.

**TABLA IV.2.1- VALORES DE RESIDUO DE EVAPORACIÓN EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL**

% Residuo Evaporación							
1,7	2,3	2,3	2,9	3,0	2,4	2,8	1,7
1,9	2,3	2,6	2,2	2,5	2,6	2,6	2,2
2,6	2,5	2,8	2,4	2,5	2,8	1,7	2,6
2,1	1,7	2,0	2,7	2,3	1,9	2,6	2,0
2,8	1,8	1,9	2,6	2,9	2,4	2,9	2,5
3,0	2,3	1,7	2,1	2,7	2,5	2,7	



#### IV.2.2- INDICE DE REFRACCIÓN.

La relación del seno del ángulo de incidencia de un rayo de luz y el seno del ángulo de refracción del agua destilada es de 1,3330 medida a 20°C, del p-cimeno 1,4906 y del benzoato de bencilo de 1,5685 (ISO 280, 1976; AFNOR 75-112, 1977).

El aceite esencial de limón de origen italiano debe presentar según la norma ISO 855 (1981) un valor comprendido entre 1,4740 y 1,4760. El FCC (Food Chemical Codex, 1981), determina para la esencia destilada de limón valores comprendidos entre 1,4740 y 1,475. Di Giacomo *et al.* (1994) encuentran valores comprendidos entre 1,4734 y 1,4765 para aceite esencial de limón producido en Italia, y para destilados entre 1,4724 y 1,4750, los deterpenados quedan comprendidos en torno a 1,4810. Liberti *et al.* (1973) para aceite esencial de limón producido en la Región de Murcia obtienen índices de refracción comprendidos entre 1,4727 y 1,4754 en muestras extraídas en frío.

En limón procedente de California, Kesterson *et al.* (1971), encuentran valores desde 1,4738 a 1,4745 y para destilados entre 1,4725 y 1,4731, que como vemos no cumplen las especificaciones del FCC. Estos mismos autores determinan los máximos y los mínimos de aceite esencial producido en California y en Italia y lo comparan con las especificaciones de la XX edición de la USP (United States Pharmacopeia, 1980) que propone un mínimo de 1,4739 y un máximo de 1,4755, encontrando para los productos de California e Italia los mismos valores de mínimo y máximo, que son 1,4742 y 1,4755 (Kesterson *et al.*, 1971).

Los resultados obtenidos en distintas muestras a lo largo de varias campañas, se reflejan en la Tabla IV.2.2. El valor máximo de

Índice de refracción observado en las muestras es de  $1,4752 \pm 0,0001$ , y el mínimo de  $1,4722 \pm 0,0001$ . El valor mínimo y el máximo tan sólo lo presenta una muestra, otras tres muestras tienen un valor de 1,4726 y cuatro más de 1,4728; diez se encuentran entre 1,4730 y 1,4732, diecinueve entre 1,4734 y 1,4739 y nueve entre 1,4740 y 1,4752 lo que implica que la mayoría de los valores obtenidos para estas campañas se hallan entre 1,4730 y 1,4740.

Según Sinclair (1984) el índice de refracción disminuye al aumentar la temperatura y es directamente proporcional a la densidad, los valores pueden presentar variaciones con el máximo y el mínimo de aproximadamente 0,0007 unidades no considerándose significantes. Los valores encontrados en diferentes muestras, permiten observar variaciones que no son significativas más que de distintas campañas, afectadas por diversos factores como son: variaciones climáticas, riegos, enfermedades (Drouet 1982), pero que se encuentran en el rango de valores normales del aceite esencial de limón.

**TABLA IV.2.2- MEDIDAS DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN EN MUESTRAS DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

Muestras/mes	I.refracción	Muestras/mes	I. refracción
XI	1,4732	VI	1,4730
XI	1,4728	VI	1,4728
XII	1,4736	VII	1,4726
XII	1,4746	VII	1,4728
I	1,4750	VIII	1,4726
I	1,4740	VIII	1,4728
I	1,4746	IX	1,4730
II	1,4742	IX	1,4734
II	1,4752	IX	1,4736
II	1,4734	IX	1,4732
II	1,4736	X	1,4734
II	1,4736	X	1,4734
II	1,4734	XI	1,4738
II	1,4734	XI	1,4732
III	1,4732	I	1,4746
IV	1,4738	I	1,4740
IV	1,4732	II	1,4748
IV	1,4734	II	1,4736
IV	1,4738	IV	1,4736
V	1,4732	V	1,4734
V	1,4737	V	1,4732
V	1,4739	VII	1,4726
VI	1,4732	VIII	1,4722

#### IV.2.3- ROTACIÓN ÓPTICA.

Los aceites esenciales de cítricos tienen la propiedad de producir una rotación dextrógira -más o menos acentuada- del plano de la luz polarizada. Esta medida se realiza de igual modo que las anteriores a una temperatura de 20°C (ISO 592, 1981; AFNOR 75-113, 1982; AENOR 159, 1984). Los componentes en mayor proporción en el aceite esencial de limón (d-limoneno y  $\beta$ -pineno), son los responsables de las variaciones que se producen en la rotación óptica. El limoneno es de naturaleza dextrógira y es el componente mayoritario en el aceite mientras que  $\beta$ -pineno, segundo en importancia, es de naturaleza levógira. La variación de las proporciones de ambos componentes es la principal causa que provoca los cambios en éste parámetro. Según ISO 592 (1981), los valores de rotación óptica para el aceite esencial de limón italiano han de estar comprendidos entre +57° y +65°.

Stanley *et al.* (1961) encuentran diferencias en las rotaciones ópticas de los aceites esenciales norteamericanos producidos en zonas interiores de USA, y los producidos en la zona de costa, siendo éstos más bajos -alrededor de +50°, los del interior alrededor de +70°-. Hendrickson *et al.* (1965) observaron que el rendimiento de aceite esencial producido afectaba a las propiedades físico-químicas del aceite esencial de naranja, Liberti *et al.* (1973) encuentran en aceite esencial de limón producido en España valores comprendidos entre +57° y +67°, y Lodge *et al.* (1977) comparando aceite esencial de limón de frutos con maduración similar procedentes de Italia y USA encuentran en ellos las mismas propiedades físico-químicas a excepción de la rotación óptica.

Calvarano *et al.* (1988) realizando las determinaciones a temperatura de 15°C, establecen para limón italiano los valores comprendidos entre +59,37° y +67,26°, para el destilado entre +61,97° y +68,66°, para diterpenados de -5° a -8°30' y para desesquiterpenados de -3°45' a +1°. Los valores de rotación óptica a lo largo de una campaña varían de forma que al inicio de campaña -noviembre/diciembre- son más elevados que hacia el final del periodo de elaboración -mayo-.

Estudios realizados por Kesterson *et al.* en 1971 con muestras de aceite esencial de limón producido en Estados Unidos, muestran un máximo de +68,98 y un mínimo de +57,82, próximos a los valores encontrados en aceite esencial de limón italiano por Di Giacomo y Mincione en 1994, comprendidos entre un máximo de +65 y un mínimo de +57.

Las variaciones encontradas en los valores de rotación óptica son debidas entre otras causas a los diferentes sistemas de extracción. Así los autores arriba citados determinan diferencias entre los valores de rotación óptica obtenidos con muestras de igual origen pero diferente método de extracción.

Los resultados obtenidos en la presente memoria se exponen en la Tabla IV.2.3. El valor máximo encontrado corresponde a +61,86 y el mínimo a +56,4. Esto sitúa los valores del aceite esencial de limón de origen español obtenidos durante estas campañas (1992-1994), en un margen más estrecho que el resto, pero las diferencias no son significativas, únicamente consecuencia de las múltiples variaciones que afectan a los frutos procesados en cada campaña.

**TABLA IV.2.3- VARIACIÓN DE LA ROTACIÓN ÓPTICA EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

<b>Muestras/mes</b>	<b>R.óptica</b>	<b>Muestras/mes</b>	<b>R.óptica</b>
XI	60,55	VI	60,58
XI	57,25	VI	60,43
XII	58,90	VII	57,62
XII	60,85	VII	56,92
I	60,20	VIII	56,73
I	61,30	VIII	56,54
I	59,63	IX	56,48
II	61,70	IX	59,78
II	61,86	IX	60,15
II	60,53	IX	57,89
II	61,64	X	56,98
II	60,92	X	59,46
II	61,21	XI	57,92
II	60,14	XI	57,45
III	60,20	I	60,53
IV	57,63	I	59,63
IV	61,25	II	60,51
IV	60,24	II	58,97
IV	59,12	IV	59,78
V	59,10	V	58,21
V	58,60	V	60,14
V	57,23	VII	59,98
VI	57,19	VIII	56,68

En cuanto a la variación a lo largo de la misma, parece que en estas del 1992-1994 son más elevados los valores hasta los meses de abril/mayo, empezando a disminuir a partir de entonces durante la época de verano hasta diciembre, pero no son variaciones que realmente se puedan considerar como significativas de una determinada estación.

#### IV.2.4- *PESO ESPECÍFICO.*

Los valores bajos de peso específico se deben al alto contenido en hidrocarburos terpénicos -los diterpenos poseen densidades más elevadas- y en general a la presencia de componentes volátiles por lo que pueden indicar la presencia de aceites esenciales destilados (Di Giacomo y Mincione 1994).

La laboriosidad del método picnométrico, hace que estas medidas, se realicen sólo con relativa frecuencia, pero esto puede ser solventado por el uso del densímetro digital. Los valores obtenidos por ambos métodos quedan reflejados en la Tabla IV.2.4. Los resultados obtenidos mediante el uso del picnómetro resultan ligeramente inferiores a los obtenidos mediante densitómetro digital, si bien las diferencias no son altamente significativas, y siempre utilizando el densímetro son más repetitivas las mediciones, dada la buena reproducibilidad de este equipo La desviación standard de las medidas realizadas con el picnómetro es de 0,003 y la de las medidas realizadas con el densímetro digital es 0,0005.

**TABLA IV.2.4- DENSIDAD ABSOLUTA ( $\rho_{20}$ ) Y DENSIDAD RELATIVA ( $\rho_{20}^{20}$ ) EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN DE ESPAÑA**

<b>Muestra (densímetro)</b>	$\rho_{20}$	$\rho_{20}^{20}$
1	0,8528	0,8543
2	0,8533	0,8548
3	0,8534	0,8549
4	0,8531	0,8546
5	0,8526	0,8541
6	0,8519	0,8534
7	0,8521	0,8536
8	0,8519	0,8534
9	0,8521	0,8536
10	0,8524	0,8539
11	0,8523	0,8538
12	0,8532	0,8547
13	0,8526	0,8541
14	0,8522	0,8537
<b>Muestra (picnómetro)</b>	$\rho_{20}^{20}$	
I	0,8520	
II	0,8470	
III	0,8520	
IV	0,8510	
V	0,8490	
V	0,8440	
VII	0,8460	
VIII	0,8453	
IX	0,8478	
IX	0,8457	
IX	0,8420	
IX	0,8456	
IX	0,8424	
IX	0,8480	

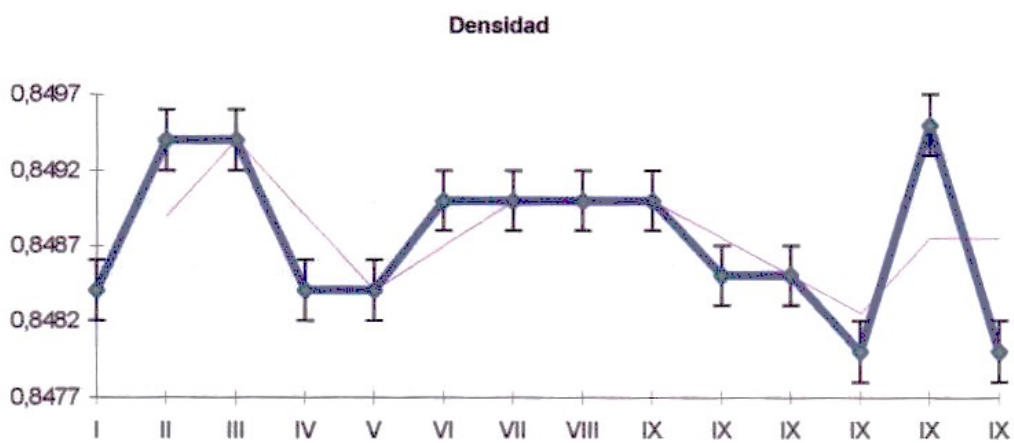
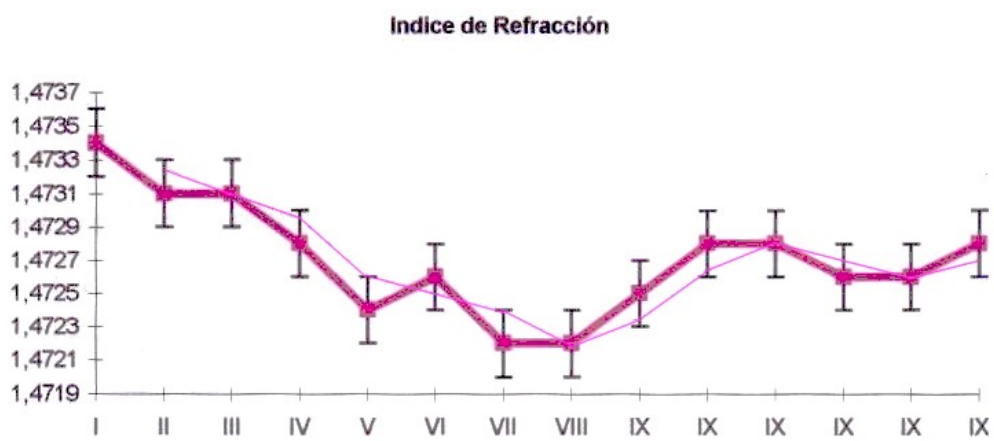
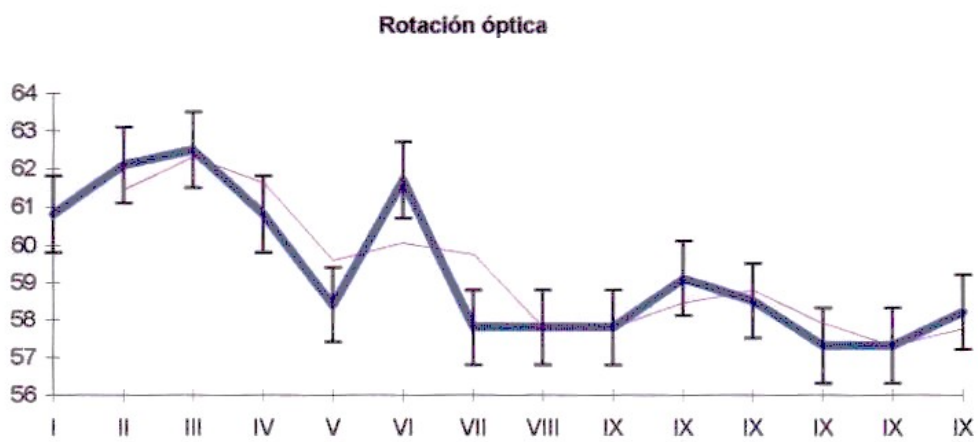


Los valores obtenidos con densímetro se sitúan para la densidad absoluta entre un máximo de 0,8534 y un mínimo de 0,8519; y para densidad relativa se encuentran entre 0,8534 y 0,8549 respectivamente. El picnómetro nos da valores comprendidos entre 0,8420 y 0,8520.

Teniendo en cuenta que los datos encontrados por Liberti *et al.* en 1973 y posteriormente por Drouet en 1982 y Di Giacomo y Mincione en 1994, varían sus mínimos entre 0,8462; 0,849; 0,8555 y 0,8566 y sus máximos respectivos entre 0,8575; 0,858; 0,8572 y 0,8590, se consideran los valores encontrados por lo tanto dentro del rango de valores normales para el aceite esencial de limón.

Para ofrecer una visión de conjunto de algunas de las propiedades físicas se muestran las gráficas con las variaciones de Rotación Óptica, Índice de Refracción y Densidad durante la campaña de producción 1994-1995, en la Figura IV.2.4.1.

Estas representaciones nos indican las tendencias en las evoluciones de estos parámetros; valores extremos en ocasiones pueden ser debidos más al muestreo practicado y peculiaridades puntuales de la fruta procesada que a tendencias en su evolución. Aparece cierta relación entre la rotación óptica y el índice de refracción que al principio son elevadas van descendiendo hasta mayo , aumentan hacia junio, los meses de julio y agosto son los más bajos y vuelven a elevarse a partir de septiembre. En cambio no parecen estar relacionadas con la densidad.



**FIGURA IV.2.4- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ROTACIÓN ÓPTICA, ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y DENSIDAD.**

#### IV.2.5- ÍNDICE DE CARBONILO

La determinación química del índice de carbonilo, expresando el resultado como porcentaje de citral, ha sido usada durante mucho tiempo como indicativa de la calidad comercial del aceite esencial de limón, y aún hoy día sigue siendo utilizada, ya que al citral se le atribuye ser el principal responsable del toque más agradable del aroma del mismo y, como consecuencia, su contenido es en cierta medida un indicador del precio del aceite esencial. Este valor de índice de carbonilo se corresponde, por exceso, con el porcentaje total de aldehídos que se obtiene por cromatografía de gases

Yokohama *et al.* (1961) obtienen porcentajes que sitúan el mínimo desde 1,87%, para el método por condensación con ácido barbitúrico hasta un máximo de 3,54%, obtenido utilizando el método de fenilhidrazina e hidroxilamina

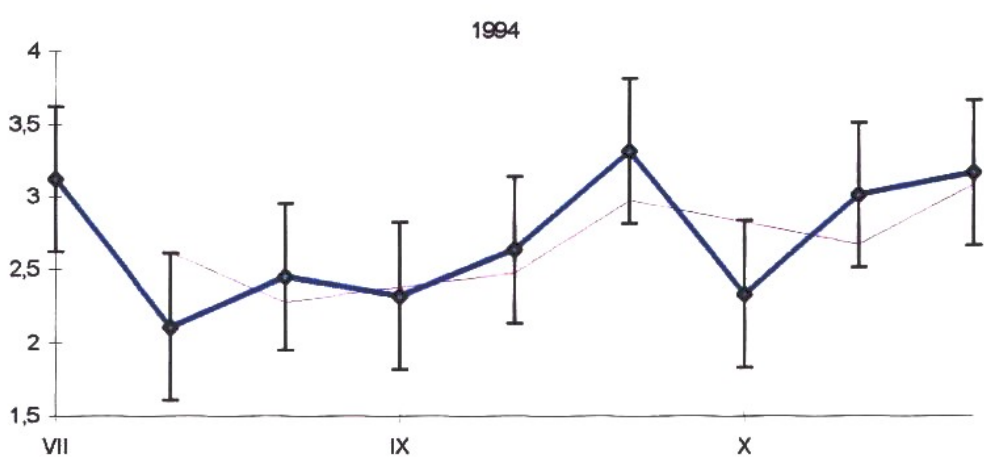
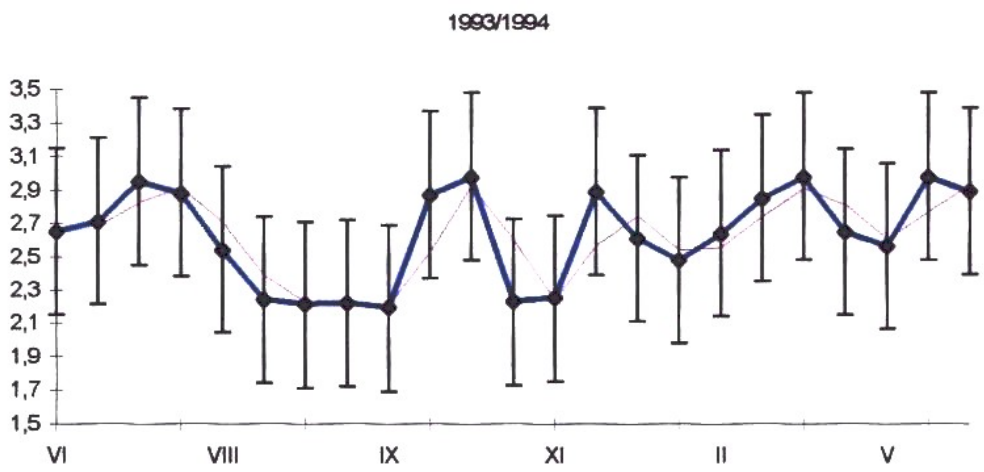
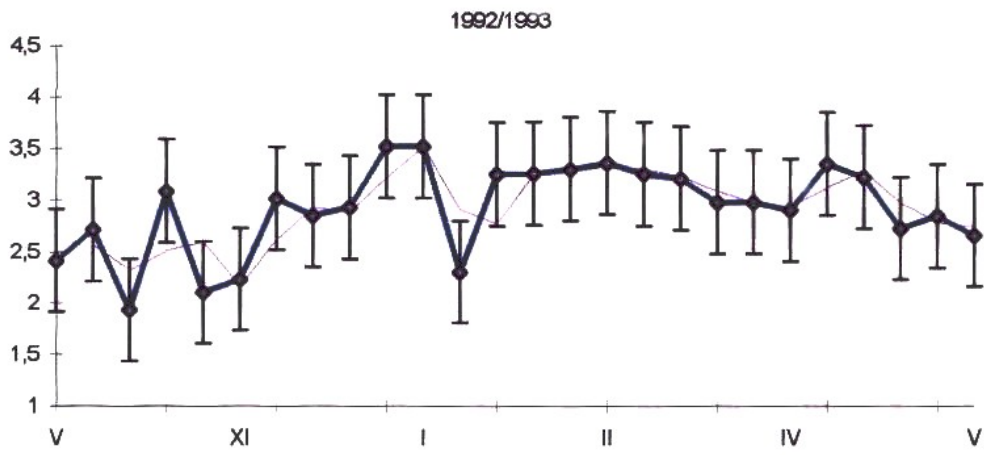
Utilizando el método de vainillina-piperidina, Stanley *et al.* (1958) encuentran valores comprendidos entre 2,74% para limón procedente de Arizona y 3,16% para el procedente de Ventura en California, confirmando así los datos de Poore (1932), que observa mayor proporción de aldehídos en los frutos de zonas costeras respecto a aquellos producidos en el interior.

Di Giacomo y Mincione en 1994 señalan para el limón de procedencia italiana valores comprendidos entre 3 y 4,5, aunque estos mismos autores indican en otro momento al describir las propiedades físico-químicas, que el contenido máximo de aldehídos expresado como citral es de 3%.

Se determina el contenido en aldehídos en ciento dieciséis muestras y los valores obtenidos oscilan entre 4,07 y 1,73%. La gran mayoría de los valores están comprendidos entre dos y tres por ciento -ochenta y dos valores-, y de tres a cuatro por ciento -veintiocho valores-. En la figura IV.2.5, se observa la variación que se produce dentro de las muestras estudiadas durante una misma época del año y la que se produce de la media de todas ellas a lo largo de la campaña.

Los valores más elevados suelen encontrarse en los primeros meses de la campaña hacia enero/febrero -esencia de invierno-, empezando a disminuir a partir de abril -esencia de verano-, pero pueden encontrarse en ocasiones algunos contenidos bajos en compuestos carbonílicos en los meses de enero/febrero y más elevados en los de agosto/octubre. Esto aparece reflejado en las gráficas anteriores, donde además de la tendencia (representada por la línea fina), se ve la variabilidad en los valores de las distintas muestras de un mismo mes.

La extensión de los cultivos con floraciones más o menos tempranas o tardías tiene como consecuencia la aparición de frutos de características variadas a lo largo de todo el tiempo que dura la campaña de procesado que proporcionan estas variaciones en el contenido de aldehídos.



**FIGURA IV.2.5- VARIACIONES DEL ÍNDICE DE CARBONILO ENTRE MUESTRAS DE LA MISMA CAMPAÑA**

Comparados estos valores con los encontrados por Kesterson *et al.* en 1971 para el aceite de esencial de origen norteamericano, quienes afirman que deben estar comprendidos entre un máximo de 3,45 y un mínimo de 1,49, se observa la elevada calidad del aceite esencial de limón obtenido en España.

La variación que se produce a lo largo de cada campaña de producción se debe en gran parte al tipo de limón procesado, el limón de “invierno”, presenta valores más elevados de limoneno, geranial y neral, mientras que el de “verano”, tiene un contenido más elevado en ésteres, alcoholes, sabineno y  $\beta$ -pineno (Lawrence, 1992; Di Giacomo y Mincione, 1994).

#### IV.2.6- SOLUBILIDAD EN ALCOHOL

En las diversas aplicaciones industriales de los aceites esenciales de limón (alimentación farmacia, perfumería, etc.) es muy frecuente recurrir a la preparación de disoluciones etanólicas. Para los aceites esenciales de cítricos se emplean normalmente disoluciones de alcohol etílico de elevada graduación alcohólica, comprendidas entre 80 y 96%. La solubilidad será tanto mayor cuanto mayor sea la riqueza en componentes oxigenados.

Por otro lado, la adición de sustancias poco solubles en alcohol influyen de forma notable en la solubilidad. De modo similar en el proceso de envejecimiento se producen polimerizaciones, principalmente de los constituyentes de carácter terpénico, con formación de polímeros insolubles (Di Giacomo y Mincione, 1994). Las disoluciones obtenidas pueden ser totalmente

límpidas o pueden ser más o menos turbias. Los valores encontrados por Calvarano *et al.* (1988) se encuentran comprendidos entre 5,0 y 8,5 volúmenes de alcohol de 90%(v/v) a 20°C.

Serán más solubles en alcoholes de baja graduación, los que tengan más cantidad de compuestos oxigenados, y cuando aumenten terpenos y sesquiterpenos sólo se disolverán en alcoholes de mayor graduación, siendo todos solubles en alcohol absoluto.

Por este método se puede observar la posible adición de ciertos adulterantes, que no son solubles en alcohol de una graduación en la que se conoce la solubilidad de la esencia genuina, así como también la solubilidad disminuye en aceites esenciales envejecidos, ya que se produce la polimerización sobre todo de hidrocarburos terpénicos, que presentan este fenómeno con gran facilidad. Las diez muestras estudiadas son totalmente solubles en alcohol de 95°, y en alcohol de 90° son solubles entre diez volúmenes y seis. Liberti *et al.* en 1973 encuentran valores similares a los encontrados en este estudio.

#### **IV.3- ESPECTROFOTOMETRÍA. ÍNDICE CD.**

El índice CD es un dato espectrofotométrico relacionado con la presencia en el aceite esencial de cítricos extraídos mecánicamente, de compuestos no volátiles del grupo de cumarinas y psoralenos, y que provocan junto con el citral una elevada absorción en UV entre 300 y 350 nm (Di Giacomo y Mincione, 1994).

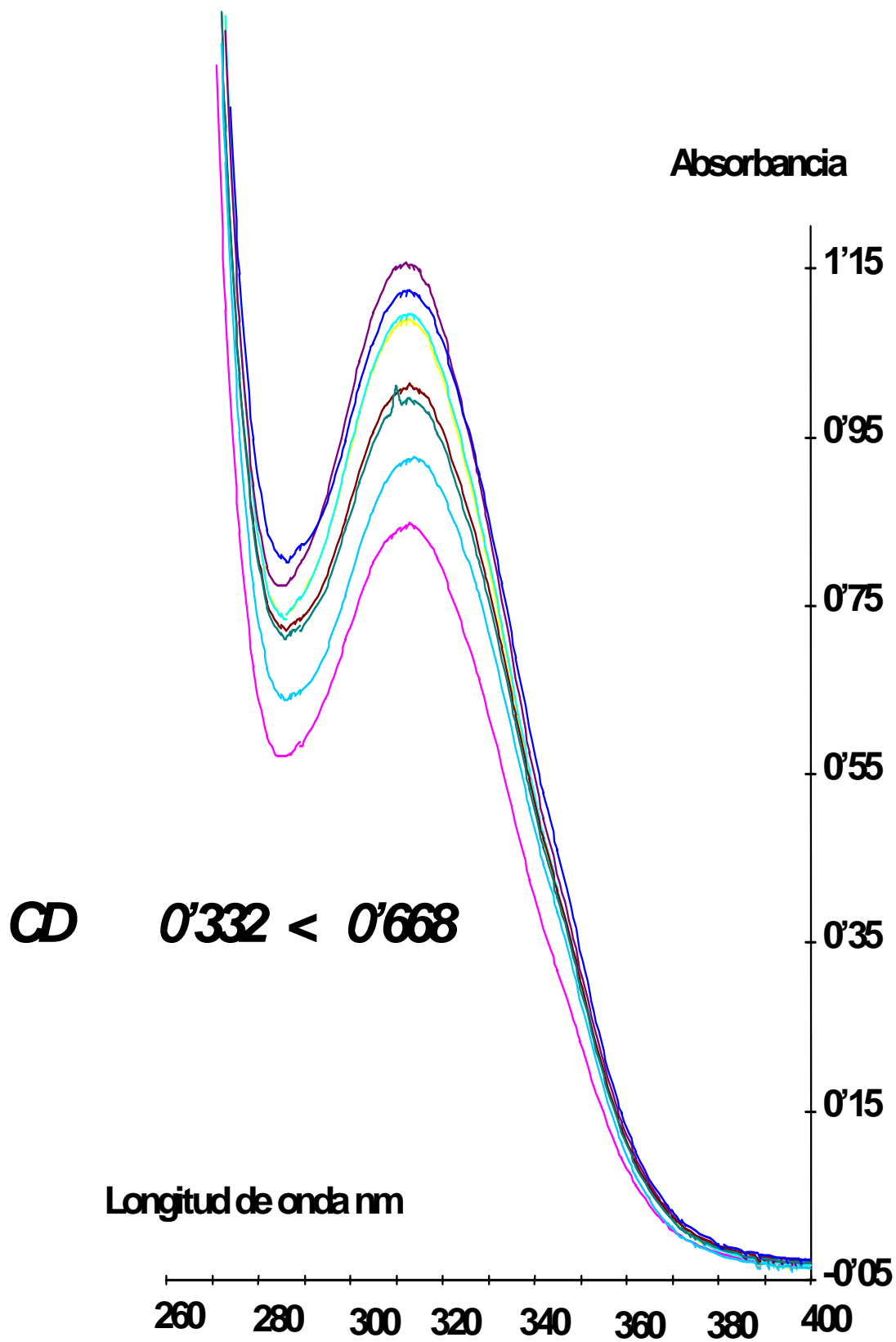
En el registro espectrofotométrico de esta zona del UV el aceite esencial de limón provoca un máximo de absorción en torno a los 315 nm., y un mínimo en torno a los 285nm. La posición de éste mínimo se desplaza hacia longitudes de onda más bajas cuando aumentan los compuestos cumarínicos, y hacia longitudes de onda más altas cuando aumentan los hidrocarburos terpénicos (Calvarano *et al.*, 1978).

Un pequeño programa en lenguaje BASIC, ha permitido a partir de los datos de absorción obtenidos cada segundo por el espectrofotómetro digital, calcular los valores de CD a partir de los datos de absorción que presentaban las  $\lambda$  en el máximo, el mínimo y el punto de inflexión.

En la figura IV.3.1 se muestran los espectros característicos del aceite esencial de limón de varias muestras, que permite observar la banda de margen de variabilidad de las mismas. Todas las muestras presentan el mínimo de absorción sobre 285nm y el máximo sobre 315.

De las treinta muestras estudiadas, se obtienen valores de CD comprendidos entre 0,668 y 0,332, la mayoría de los valores se sitúan entre 0,39 y 0,56.





**FIGURA IV.3.1- REGISTROS ESPECTROMÉTRICOS DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

#### **IV.4- CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

La complejidad de las muestras queda patente cuando se aplica esta técnica analítica, que permite profundizar en el conocimiento cualitativo y cuantitativo del aceite esencial de limón y sobre todo de su llamada fracción volátil que representa el 96-98% del aceite esencial.

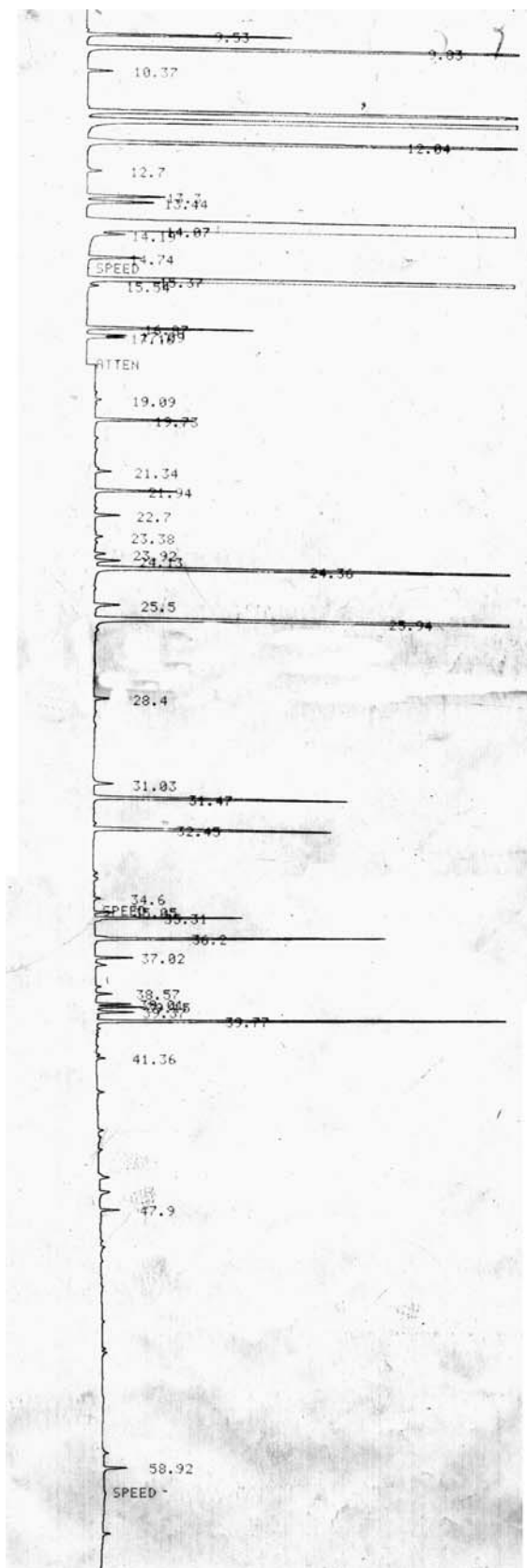
La fracción volátil se analiza por esta técnica que permite la separación de hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, además de algunos ésteres, alcoholes y aldehídos alifáticos (Chamblee *et al.*, 1991). El limoneno al ser el componente mayoritario, alrededor del 60% actúa como disolvente del resto y lo mismo sucede en otros aromas de cítricos, éste junto con el  $\beta$ -pineno que se sitúa sobre un 10%, y el  $\gamma$ -terpineno sobre un 9%, provocan la aparición de los tres picos más grandes del cromatograma a los que se irán sumando los de los compuestos oxigenados, sobre todo los isómeros constituyentes del citral (geranial y neral) cuyo contenido implica, como ya hemos dicho, una referencia clara para el establecimiento de la calidad del aceite esencial de limón. Estos, junto con el resto de aldehídos, pueden suponer entre un dos y un seis por ciento del total.

A lo largo de varias campañas se ha realizado el análisis cromatográfico de muestras procedentes de las diferentes empresas transformadoras de limón situadas en la Región de Murcia. Este estudio se ha llevado a cabo en tres columnas capilares diferentes: en primer lugar una columna OV-101 de carácter apolar, y posteriormente en columnas HP-5 y CPWax 52-CB, claramente polar esta última.

#### IV.4.1- Columna OV-101

El cromatograma obtenido en cada una de las columnas estudiadas nos ofrece lo que se conoce como un perfil cromatográfico de la muestra en esa columna. Este permite a simple vista, saber tanto de que muestra se trata como de la naturaleza de la columna aplicada, es decir: de tipo polar, apolar, etc. A continuación se presenta el perfil cromatográfico de la columna apolar OV101 (Figura. IV.4.1.1) y el orden de elución de la misma en la Tabla IV.4.1.1. con las referencias bibliográficas numeradas con el siguiente orden:<sup>1</sup>Chamblee *et al.* (1991); <sup>2</sup>Di Giacomo y Mincione (1994); <sup>3</sup>Sebastiani *et al.* (1983); <sup>4</sup>Anónimo (1983).

La bibliografía sobre la columna OV-101 es escasa pues la mayoría de los trabajos se han realizado en columnas polares o, al menos, ligeramente polares. En concreto, una referencia a la columna OV-101 es de un trabajo en el que se obtienen los cromatogramas simultáneamente en dicha columna y una Carbowax-20M (Phillips *et al.*, 1981) en el mismo cromatógrafo con una única inyección de aceite esencial de limón, para la obtención de los índices de retención. En el cromatograma correspondiente a OV-101 aparece el pico correspondiente a nerol, tras el de neral, y geraniol tras geranial, esto podría ser debido al programa de temperatura y tiempo, pero no es probable ya que es similar al utilizado en este trabajo 60°C con plato inicial de 2min, una rampa de 2°C/min hasta 180°C y un plato final de 10min, también podría ser una confusión con el pico de geraniol, que sí es de mayor proporción al de nerol que estaría antes de neral.



**FIGURA IV.4.1.1- PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN OV101.**

**TABLA IV.4.1.1- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA OV-101**  
**CONDICIONES: 60°C-2'5°C/MIN-210°C-10MIN**

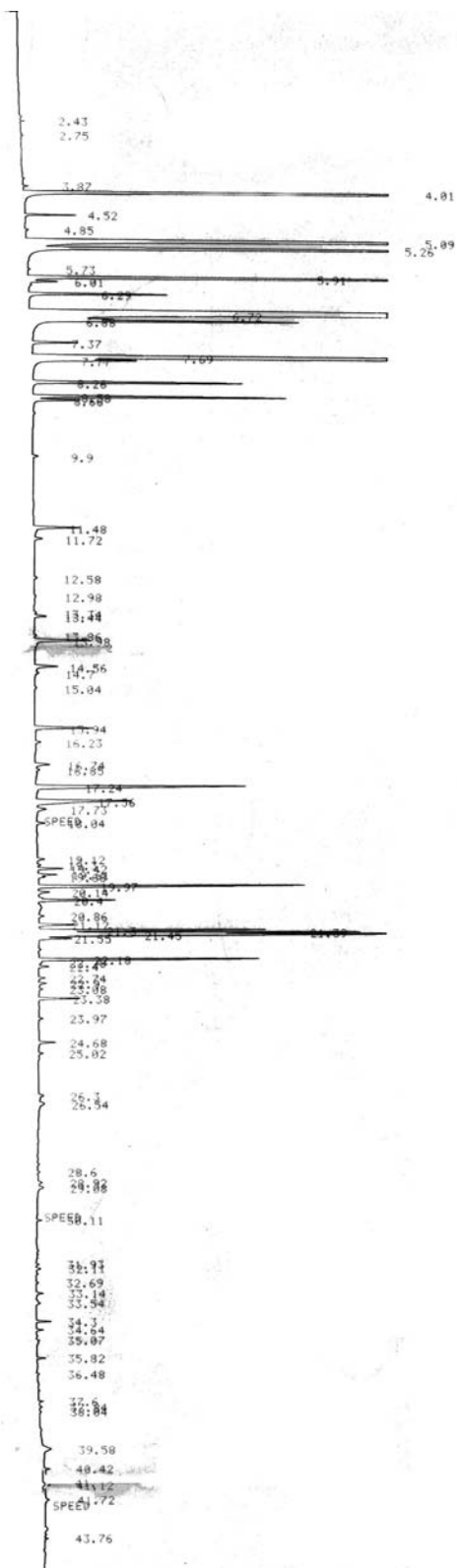
<b>Tr</b>	<b>Componente</b>	<b>Tr</b>	<b>Componente</b>
9.5	triciclono <sup>2</sup>		<i>carvona</i> <sup>4</sup> / <i>piperitona</i> <sup>1,2</sup>
9.53	$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2, 4</sup>	25.50	geraniol <sup>1,2, 4</sup>
9.83	$\alpha$ -pineno <sup>1,2, 4</sup>	25.50	acetato de linalilo <sup>2</sup>
10.37	canfeno <sup>1,2, 4</sup>	25.94	geranial <sup>1,2, 4</sup>
	metilheptenona <sup>4</sup>		perialdehído <sup>1,2</sup>
11.32	sabineno <sup>1,2, 4</sup>		acetato de bornilo <sup>2</sup>
11.56	$\beta$ -pineno <sup>1,2, 4</sup>	28.40	undecanal <sup>1,2, 4</sup>
12.04	octanal <sup>1, 2, 3, 4</sup>		acetato de nonilo <sup>2, 4</sup>
12.04	mirceno <sup>1,2, 4</sup>		<i>geranoato de metilo</i> <sup>1,2</sup>
12.70	$\alpha$ -felandreno <sup>1,2, 4</sup>	31.03	acetato de citronelilo <sup>1,2, 4</sup>
	$\Delta$ 3-careno <sup>4</sup>	31.47	acetato de nerilo <sup>1,2, 4</sup>
13.30	$\alpha$ -terpineno <sup>1,2, 4</sup>		<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>
13.44	p-cimeno <sup>1,2, 4</sup>	32.45	acetato de geranilo <sup>1,2, 4</sup>
14.07	limoneno <sup>1,2, 4</sup>	34.00	dodecanal <sup>1,2, 4</sup>
14.07	cineol-1,8 <sup>1,2, 4</sup>	34.60	acetato de decilo <sup>1,2</sup>
14.19	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	35.05	<i>antranilato de etilo</i>
14.74	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	35.31	$\beta$ -cariofileno <sup>1,2, 4</sup>
15.37	$\gamma$ -terpineno <sup>1,2, 4</sup>	36.20	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2, 4</sup>
15.54	<i>trans</i> -sabineno-hidrato <sup>12</sup>	37.02	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2</sup>
	octanol <sup>1,4</sup>		<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>2</sup>
16.87	terpinoleno <sup>1,2, 4</sup>		<i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>1,2</sup>
	<i>cis</i> -sabineno-hidrato <sup>1,2</sup>		$\gamma$ -muroleno <sup>2</sup>
17.09	linalol <sup>1,2, 4</sup>	38.57	germacreno D <sup>2</sup>
17.10	nonanal <sup>1,2, 4</sup>	39.04	valenceno <sup>2</sup>
	<i>cis</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	39.18	<i>tridecanal</i>
19.09	<i>trans</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	39.77	$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2, 4</sup>
19.27	alcanfor <sup>1,2</sup>	41.36	<i><math>\gamma</math>-elemeno</i>
19.73	citronelal <sup>1,2</sup>	42.83	<i>espatulenol</i>
20.31	borneol <sup>1,2</sup>	44.48	tetradecanal <sup>2</sup>
21.34	terpinen-4-ol <sup>1,2,4</sup>	46.51	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>
21.94	$\alpha$ -terpineol <sup>1,2, 4</sup>	47.14	canferenol <sup>1,2</sup>
22.70	decanal <sup>1,2, 4</sup>	47.91	$\alpha$ -bisabolol <sup>1,2</sup>
23.38	acetato de octilo <sup>2, 4</sup>		<i>nerolidol</i> <sup>1</sup>
23.92	nerol <sup>1,2, 4</sup>	58.92	<i>nootkatona</i> <sup>2</sup>
24.13	citronelol <sup>1,2, 4</sup>		
24.36	neral <sup>1,2, 4</sup>		

#### IV.4.2- Columna CPWAX 52CB

Esta columna polar de polietilenglicol ligado (PEG) permite separar algunos componentes como el  $\beta$ -felandreno que no se aprecian bien en una columna apolar, además tiene la ventaja de que los componentes poco volátiles aparecen antes que en las apolares y por tanto permite menores tiempos de duración de los programas. Por ejemplo la nootkatona eluye sobre los 50min, mientras en las apolares aparece sobre los 60 minutos en HP-5 y sobre los 80 en OV-101.

El perfil cromatográfico obtenido en CPWAX 52CB se muestra en la Fig. IV.4.2.1, y a continuación la Tabla IV.4.2.1 muestra el orden de elución obtenido. Los superíndices se refieren a las siguientes referencias bibliográficas: <sup>1</sup>Koketsu *et al.*, 1983; <sup>2</sup>Sugiyama *et al.*, 1988 y <sup>3</sup>Njoroge *et al.*, 1994.

Para la separación de acetato de nerilo, bisaboleno y geranial se han realizado tres programas de tiempo y temperatura, en el primero (A) un plato inicial de 5min a 65°C y un gradiente de 2°C/min hasta un plato final de 215°C durante 2,5min-. Se obtiene la elución en primer lugar del bisaboleno, y a continuación eluyen juntos acetato de nerilo y geranial, o los tres juntos; si se inicia a 90°C sin plato inicial, con gradiente de 1,5°C/min hasta alcanzar 210°C durante 2,5min, (B) eluyen juntos en primer lugar bisaboleno y acetato de nerilo y a continuación geranial. Se logra la separación de los tres iniciando a 60°C y con gradiente de 4°C/min hasta 220°C con un plato final de 15min (C) o modificando la velocidad de gradiente hasta 2,5°C/min y así eluye primero acetato de nerilo, a continuación bisaboleno y por último geranial.



**FIGURA IV.4.2.1- PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN CPWAX 52CB.**

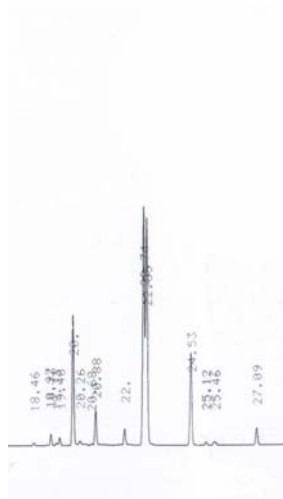
**TABLA IV.4.2. 1- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA CP-WAX-52 CB  
CONDICIONES: 60°C-0MIN-4°C/MIN -220°C -15MIN**

<b>Tr</b>	<b>Componente</b>	<b>Tr</b>	<b>Componente</b>
3.87	triciclono	18.04	undecanal <sup>1,2,3</sup>
4.01	$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2,3</sup>		<i>nonanol</i> <sup>1</sup>
4.01	$\alpha$ -pineno <sup>1,2,3</sup>	19.42	acetato de citronelilo <sup>1,3</sup>
4.52	canfeno <sup>1,2,3</sup>	19.63	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2,3</sup>
5.09	$\beta$ -pineno <sup>1,2,3</sup>	19.97	neral <sup>1,2,3</sup>
5.26	sabineno <sup>1,2,3</sup>	20.14	<i>isoborneol</i> <sup>1,2,3</sup>
5.73	$\Delta^3$ -careno <sup>1,2,3</sup>	20.40	germacrenoD
5.91	mirceno <sup>1,2,3</sup>	20.40	$\alpha$ -terpineol <sup>1,3</sup>
6.01	$\alpha$ -felandreno <sup>1,2,3</sup>	20.50	borneol <sup>1,2,3</sup>
6.29	$\alpha$ -terpineno <sup>1,2,3</sup>	20.86	dodecanal <sup>1,3</sup>
6.29	heptanal	20.86	<i>carvona</i> <sup>3</sup>
6.72	<i>cis</i> -ocimeno <sup>1,2,3</sup>	21.12	valenceno
6.72	limoneno <sup>1,2,3</sup>	21.30	acetato de nerilo <sup>1,2,3</sup>
6.88	$\beta$ -felandreno <sup>1,2,3</sup>	21.39	$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2,3</sup>
6.88	cineol-1,8 <sup>1,2,3</sup>	21.45	geranial <sup>1,2,3</sup>
7.37	<i>trans</i> -ocimeno <sup>1,2,3</sup>	21.88	$\delta$ -cadineno
7.69	$\gamma$ -terpineno <sup>1,2,3</sup>	21.88	$\gamma$ -cadineno
7.77		22.18	acetato de geranilo <sup>1,2,3</sup>
8.26	<i>p</i> -cimeno <sup>1,2,3</sup>	22.28	<i>trans</i> - $\alpha$ -bisaboleno
8.58	terpinoleno <sup>1,2,3</sup>	22.40	citronelol <sup>1,2,3</sup>
8.68	octanal <sup>1,2,3</sup>	22.74	perialdehído <sup>3</sup>
9.9	metilheptenona <sup>1,2,3</sup>	22.90	nerol <sup>1,2,3</sup>
11.48	nonanal <sup>1,2,3</sup>	23.08	<i>cis</i> -carveol <sup>3</sup>
13.34	acetato de octilo <sup>1,2</sup>	23.38	geraniol <sup>1,2,3</sup>
13.98	citronelal <sup>1,2,3</sup>	23.97	<i>trans</i> -carveol <sup>3</sup>
14.56	decanal <sup>1,3</sup>	24.68	<i>cariofileno óxido</i>
16.04	linalol <sup>1,2,3</sup>	29.06	nerolidol <sup>3</sup>
16.23	octanol <sup>1,2,3</sup>	32.11	<i>acido C8</i>
16.74	acetato de linalilo <sup>1,2,3</sup>	33.14	<i>eugenol</i> <sup>3</sup>
16.85	<i>acetato de nonilo</i> <sup>3</sup>	34.34	<i>pelargónico</i>
17.24	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2,3</sup>	34.64	<i>acetileugenol</i>
17.36	<i>trans</i> -cariofileno <sup>1,2,3</sup>	39.58	nootkatona
17.73	terpinen-4-ol <sup>1,2,3</sup>		



En los trabajos encontrados de columnas de PEG20M, aparecen juntos acetato de nerilo y bisaboleno (Njoroge *et al.*, 1994), adjudicando un porcentaje de área idéntico a ambos, mientras que los que se encuentran en aceite esencial de limón español son ligeramente superiores para bisaboleno hasta un 0,2-0,3% más.

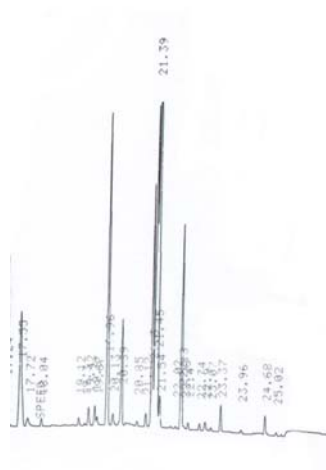
Cartoni *et al.* (1986) encuentran una pobre resolución para bisaboleno y geranial y a continuación separan acetato de nerilo utilizando el siguiente programa: plato inicial de 5min a 60°C y una rampa de 2°C/min hasta el final; en nuestras muestras ha salido geranial siempre en último lugar. En la figura IV.4.2.2, se muestran los picos de acetato de nerilo, bisaboleno y geranial obtenidos en los diferentes programas de desarrollo cromatográfico citados anteriormente.



(A)



(B)



(C)

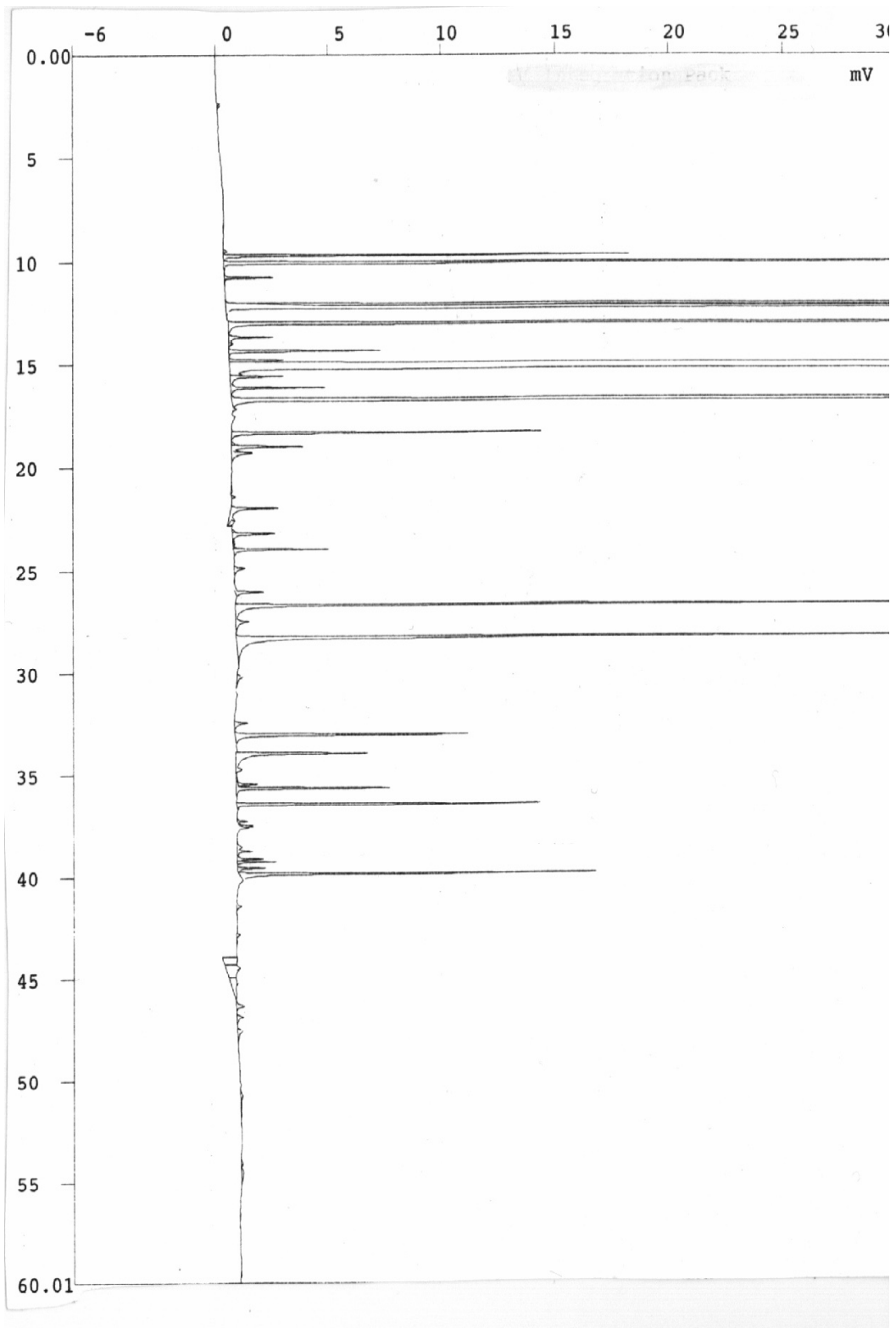
**FIGURA IV.4.2.2- RESOLUCIÓN DE LOS PICOS DE ACETATO DE NERILO, BISABOLENO Y GERANIAL**

#### IV.4.3- Columna HP5

La columna HP5 -ligeramente polar- es la usada con mayor frecuencia para el análisis de aceites esenciales, ya que permite acortar ligeramente los tiempos de análisis frente a la totalmente apolar de OV-101, aunque en el presente trabajo, la resolución encontrada en esta última sea mejor que en la HP-5 en algunos picos como el p-cimeno y triciclono que se separan en OV-101 y no siempre en HP-5 y similares -en bibliografía no se recoge ningún cromatograma en el que aparezca separado (Chamblee *et al.*, 1991, Di Giacomo y Mincione, 1994), salvo el utilizado para determinación de volátiles de zumo de naranja por Jordán (1999) que separa con el siguiente programa de temperatura y tiempo: 4min de plato inicial a 60°C, una primera rampa de 1°C/min hasta 64°C, de ahí a 155°C un gradiente de 2,5°C/min y otro a 8°C/min hasta 210°C manteniéndolos durante 4min, y que se ha utilizado así mismo en el presente trabajo junto con otros programas.

La columna HP5 mejora respecto a la OV-101 en la separación de octanal/mirceno, y geraniol/acetato de linalilo. La elución de alcanfor en HP5, se realiza antes de la de *trans*-óxido de limoneno, y en OV101 después del mismo.

A continuación se muestra un cromatograma en HP5 (fig. IV.4.3.1) seguido de la tabla correspondiente al orden de elución. Las referencias numéricas son:<sup>1</sup>Chamblee *et al.* (1991);<sup>2</sup>Di Giacomo *et al.* (1994);<sup>3</sup>Sebastiani *et al.* (1983);<sup>4</sup>Anónimo Supelco (1983).



**FIGURA IV.4.3.1- PERFIL CROMATOGRÁFICO DE UN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN HP5**

**TABLA IV.4.3.1- ORDEN DE ELUCIÓN EN UNA COLUMNA HP-5**

**CONDICIONES:60°C-4MIN-1°C/MIN-64°C-2'5°C/MIN-160°C-8°C/MIN-210°C**

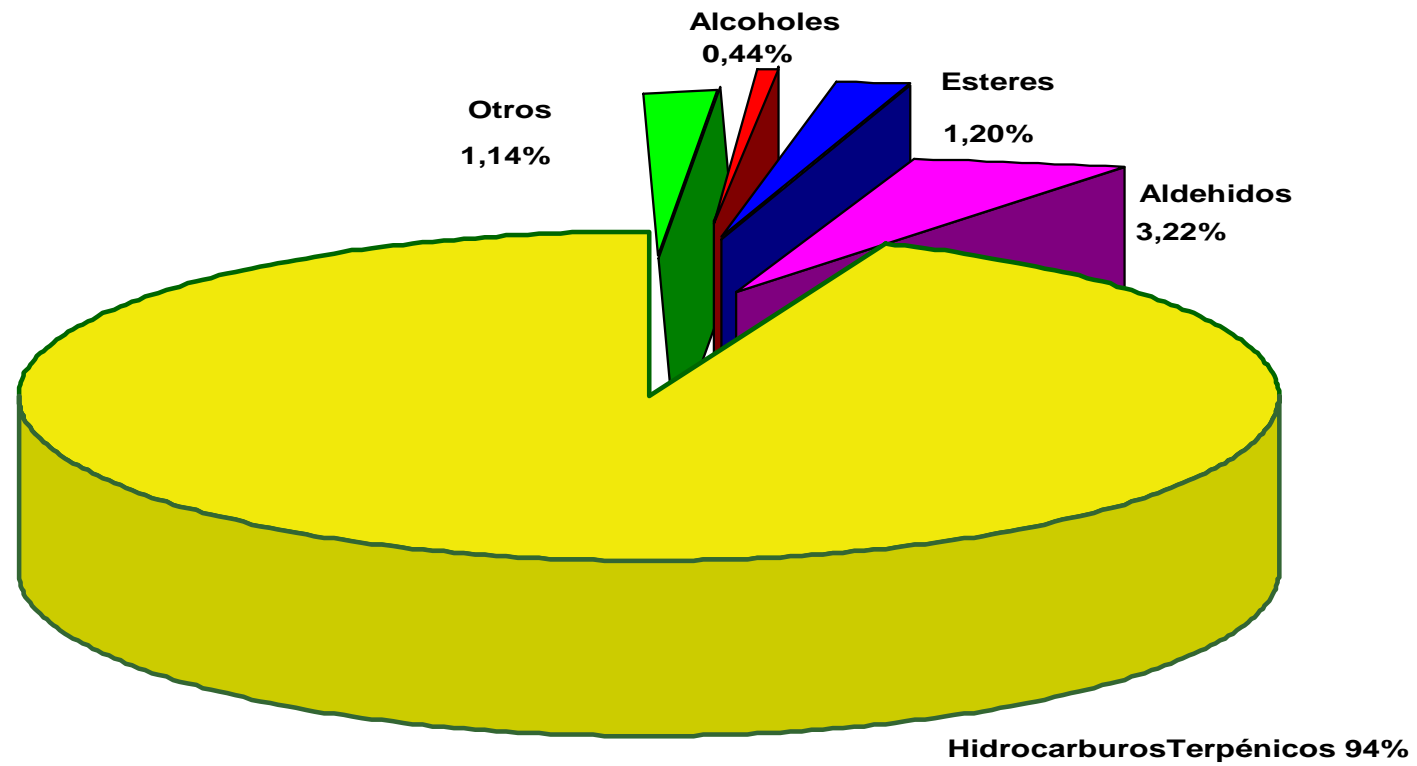
<b>Tr</b>	<b>Componente</b>	<b>Tr</b>	<b>Componente</b>
	triciclono <sup>2</sup>	24.09	neral <sup>1,2,4</sup>
9.98	$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2,4</sup>	24.30	piperitona <sup>1,2</sup> / <i>carvona</i> <sup>4</sup>
10.29	$\alpha$ -pineno <sup>1,2,4</sup>	24.67	geraniol <sup>1,2,4</sup>
10.86	canfeno <sup>1,2,4</sup>	25.22	acetato de linalilo
11.44	metilheptenona <sup>4</sup>	25.53	geranial <sup>1,2,4</sup>
11.79	sabineno <sup>1,2,4</sup>	25.78	perialdehído <sup>1,2</sup>
12.04	$\beta$ -pineno <sup>1,2,4</sup>	25.99	acetato de bornilo <sup>2</sup>
12.37	mirceno <sup>1,2,4</sup>	27.22	undecanal <sup>1,2</sup>
12.83	octanal <sup>1,2,4</sup>	27.37	acetato de nonilo
13.02	$\alpha$ -felandreno <sup>1,2,4</sup>	28.03	<i>geranoato de metilo</i> <sup>1,2</sup>
13.27	$\Delta$ 3-careno <sup>2</sup>		<i>acetato de terpenilo</i>
13.55	$\alpha$ -terpineno <sup>1,2,4</sup>	29.42	acetato de citronelilo <sup>1,2,4</sup>
14.44	p-cimeno <sup>1,2,4</sup>	29.97	acetato de nerilo <sup>1,2,4</sup>
14.44	limoneno <sup>1,2,4</sup>	30.63	<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>
14.44	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2,4</sup>	30.88	acetato de geranilo <sup>1,2,4</sup>
14.44	cineol-1,8 <sup>1,2,4</sup>	31.59	dodecanal <sup>1,2,4</sup>
14.86	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	32.04	acetato de decilo <sup>1,2</sup>
15.55	$\gamma$ -terpineno <sup>1,2,4</sup>	32.45	
15.82	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	32.75	$\beta$ -cariofileno <sup>1,2,4</sup>
	octanol <sup>4</sup>	33.40	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2,4</sup>
16.78	terpinoleno <sup>1,2,4</sup>	34.27	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2,4</sup>
	<i>cis</i> -sabineno-hidrato <sup>2</sup>	34.53	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>1,2</sup>
17.21	linalol <sup>1,2,4</sup>	34.53	<i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>2</sup>
17.41	nonanal <sup>1,2,4</sup>	35.37	$\gamma$ -muroleno <sup>2</sup>
18.29	<i>cis</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	35.64	germacreno D <sup>2</sup>
19.23	alcanfor <sup>1,2</sup>	36.07	valenceno <sup>2</sup>
19.54	<i>trans</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>		tridecanal <sup>1</sup>
19.76	citronelal <sup>1,2,4</sup>	36.70	$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2,4</sup>
20.58	borneol <sup>1,2</sup>	38.16	<i><math>\gamma</math>-elemeno</i> <sup>2</sup>
21.05	terpinen-4-ol <sup>1,2,4</sup>		<i>espatulenol</i>
21.68	$\alpha$ -terpineol <sup>1,2,4</sup>		tetradecanal <sup>2</sup>
22.29	decanal <sup>1,2,4</sup>	43.07	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>
22.55	acetato de octilo <sup>1,2,4</sup>	43.60	canferenol <sup>1,2</sup>
23.21	<i>carveol</i>	44.25	$\alpha$ -bisabolol <sup>1,2</sup>
23.43	citronelol <sup>1,2</sup>		nootkatona <sup>2</sup>
23.69	nerol <sup>1,2,4</sup>		

#### **IV.4.4- Análisis cuantitativo de componentes volátiles en aceite esencial de limón**

La fracción volátil está constituida fundamentalmente por hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, además de algunos ésteres, alcoholes y aldehídos alifáticos (Chamblee *et al.*, 1991). El limoneno es el componente mayoritario, aunque no está en una proporción tan elevada como en la naranja, situándose sobre el 60-70%; el  $\beta$ -pineno entre un 9-18%, y el  $\gamma$ -terpineno de 7-11%.

En mucha menor proporción se sitúan los compuestos oxigenados de los que los aldehídos son los más destacables, sobre todo los isómeros geranial y neral, por su elevada contribución al aroma, lo que llama más la atención ya que no son los componentes mayoritarios. Estos, junto con el resto de aldehídos, pueden suponer entre un dos y un seis por ciento del total.

En la Figura IV.4.4.1, se representan los porcentajes correspondientes de componentes agrupados por grupos funcionales. En ella se observa la gran proporción de hidrocarburos terpénicos frente al resto de componentes en su mayoría derivados oxigenados. Entre estos, los de mayor representación son los aldehídos, le siguen en porcentaje los ésteres en su mayoría acetatos y por último en menor proporción los alcoholes. En este apartado se compara los porcentajes de área de cada uno de los componentes representativos de la composición a nivel cuantitativo del aceite esencial de limón determinados en las columnas ensayadas.



**FIGURA IV.4.4.1- PORCENTAJES DE COMPOSICIÓN POR GRUPOS FUNCIONALES EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN**

#### IV.4.4.1- ESTUDIO DE LOS PORCENTAJES OBTENIDOS EN LAS COLUMNAS OV-101 CPWAX-52CB Y HP-5

Los resultados obtenidos en OV-101, CPWax-52CB y HP-5 se muestran en las Tablas IV.4.4.1,.2. y 3, respectivamente. Se observa que los porcentajes de área en OV-101 y HP-5 se asemejan más entre sí que con los obtenidos en CPWax-52CB, incluso tratándose de muestras distintas.

Si comparamos tres muestras, desarrolladas en HP-5 y CPWax-52CB, como se refleja en las Tablas IV.4.4.4, IV.4.4.5 y IV.4.4.6; los componentes mayoritarios son los que mayores diferencias presentan, y así limoneno y  $\beta$ -pineno, presentan mayores porcentajes en HP-5 que en CPWax y no es sólo debido a que con el limoneno pueda eluir algún otro componente como el *cis*-ocimeno o el  $\beta$ -felandreno, ya que la diferencia puede suponer entre un dos a un cuatro por ciento de más. Al geranial le ocurre al contrario, aparece en mayor porcentaje en CPWax que en HP-5, pero al estar en menor proporción no es tan acusada la diferencia.

Las diferencias de concentración encontradas al comparar los resultados obtenidos en dichas columnas son debidas a la diferente capacidad de resolución de las mismas. Como se ha comentado en el apartado anterior, las columnas apolares ofrecen la identificación de un mayor número de componentes, resultado coincidente por lo expresado por Staroscik *et al.* (1982). Sin embargo la comparación de muestras de distintas fechas y distintas campañas nos puede dar valores muy variados, como variados son los factores externos que influyen en la formación del aceite esencial en los frutos y como se observa en las tres primeras tablas.



**TABLA IV.4.4.1- COMPOSICIÓN PORCENTUAL EN COLUMNA  
OV-101**

<b>Componente</b>	<b>%</b>	<b>Componente</b>	<b>%</b>
triciclono <sup>2</sup>	0.0055	<i>carvona</i> <sup>4</sup> / <i>piperitona</i> <sup>1,2</sup>	0.0026
$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2, 4</sup>	0.408	geraniol <sup>1,2, 4</sup>	0.047
$\alpha$ -pineno <sup>1,2, 4</sup>	1.8081	acetato de linalilo <sup>2</sup>	0.0054
canfeno <sup>1,2, 4</sup>	0.0579	geranial <sup>1,2, 4</sup>	0.9785
metilheptenona <sup>4</sup>		perialdehído <sup>1,2</sup>	
+sabineno <sup>1,2, 4</sup>	2.1632	acetato de bornilo <sup>2</sup>	0.004
$\beta$ -pineno <sup>1,2, 4</sup>	12.994	undecanal <sup>1,2, 4</sup>	0.0313
octanal <sup>1, 2, 3, 4</sup>		<i>acetato de nonilo</i> <sup>2, 4</sup>	0.0058
+mirceno <sup>1,2, 4</sup>	1.5275	<i>geranoato de metilo</i> <sup>1,2</sup>	0.0058
$\alpha$ -felandreno <sup>1,2, 4</sup>	0.042	<i>acetato de terpenilo</i>	0.0027
$\Delta^3$ -careno <sup>4</sup>		acetato de citronelilo <sup>1,2, 4</sup>	0.0625
$\alpha$ -terpineno <sup>1,2, 4</sup>	0.2158	acetato de nerilo <sup>1,2, 4</sup>	0.5842
p-cimeno <sup>1,2, 4</sup>	0.224	<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>	0.0057
limoneno <sup>1,2, 4</sup>		acetato de geranilo <sup>1,2, 4</sup>	0.5537
+cineol-1,8 <sup>1,2, 4</sup>		dodecanal <sup>1,2, 4</sup>	0.0222
+ <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	62.99	acetato de decilo <sup>1,2</sup>	0.0189
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	0.106	<i>antranilato de etilo</i>	0.0364
$\gamma$ -terpineno <sup>1,2, 4</sup>	10.874	$\beta$ -cariofileno <sup>1,2, 4</sup>	0.2881
<i>trans</i> -sabineno-hidrato <sup>12</sup>		<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2, 4</sup>	0.5365
octanol <sup>1,4</sup>	0.0367	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2</sup>	0.0683
terpinoleno <sup>1,2, 4</sup>	0.475	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>2</sup>	
<i>cis</i> -sabineno-hidrato <sup>1,2</sup>		+ <i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>1,2</sup>	0.027
linalol <sup>1,2, 4</sup>		$\gamma$ -muroleno <sup>2</sup>	0.0113
+nonanal <sup>1,2, 4</sup>	0.196	germacreno D <sup>2</sup>	0.0376
<i>cis</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>		valenceno <sup>2</sup>	0.0883
<i>trans</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	0.0066	tridecanal	0.0711
alcanfor <sup>1,2</sup>	tr	$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2, 4</sup>	0.8079
citronelal <sup>1,2</sup>	0.1529	<i><math>\gamma</math>-elemeno</i>	0.0175
borneol <sup>1,2</sup>	0.0041	<i>espatulenol</i>	0.0146
terpinen-4-ol <sup>1,2,4</sup>	0.0387	tetradecanal <sup>2</sup>	0.0171
$\alpha$ -terpineol <sup>1,2, 4</sup>	0.1055	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>	0.0394
decanal <sup>1,2, 4</sup>	0.0825	canferenol <sup>1,2</sup>	0.0348
acetato de octilo <sup>2, 4</sup>	0.0074	$\alpha$ -bisabolol <sup>1,2</sup>	0.0363
nerol <sup>1,2, 4</sup>	0.0047	<i>nerolidol</i> <sup>1</sup>	0.0043
citronelol <sup>1,2, 4</sup>	0.0923	<i>nootkatona</i> <sup>2</sup>	0.0253
neral <sup>1,2, 4</sup>	0.573		

**TABLA IV.4.4.2- COMPOSICIÓN PORCENTUAL COLUMNA CP-WAX-52 CB)**

<b>Componente</b>	<b>%</b>	<b>Componente</b>	<b>%</b>
triciclono	tr	undecanal <sup>1,2,3</sup>	0.0243
$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2,3</sup>		<i>nonanol</i> <sup>1</sup>	
+ $\alpha$ -pineno <sup>1,2,3</sup>	2.2602	acetato de citronelilo <sup>1,3</sup>	0.045
canfeno <sup>1,2,3</sup>	0.0576	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2,3</sup>	0.0458
$\beta$ -pineno <sup>1,2,3</sup>	12.7451	neral <sup>1,2,3</sup>	0.459
sabineno <sup>1,2,3</sup>	2.1222	<i>isoborneol</i> <sup>1,2,3</sup>	
$\Delta^3$ -careno <sup>1,2,3</sup>	tr	germacreno D	
mirceno <sup>1,2,3</sup>	1.4913	$\alpha$ -terpineol <sup>1,3</sup>	0.1478
$\alpha$ -felandreno <sup>1,2,3</sup>	0.0462	borneol <sup>1,2,3</sup>	
$\alpha$ -terpineno <sup>1,2,3</sup>	0.1975	dodecanal <sup>1,3</sup>	tr
<i>heptanal</i>		<i>carvona</i> <sup>3</sup>	
cis-ocimeno <sup>1,2,3</sup>		valenceno	0.0484
limoneno <sup>1,2,3</sup>	64.3607	acetato de nerilo <sup>1,2,3</sup>	0.582
$\beta$ -felandreno <sup>1,2,3</sup>		$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2,3</sup>	0.7639
+cineol-1,8 <sup>1,2,3</sup>	0.3098	geranial <sup>1,2,3</sup>	0.7884
<i>trans</i> -ocimeno <sup>1,2,3</sup>	0.0565	$\delta$ -cadineno	
$\gamma$ -terpineno <sup>1,2,3</sup>	10.2405	$\gamma$ -cadineno	
	0.1155	acetato de geranilo <sup>1,2,3</sup>	0.5681
p-cimeno <sup>1,2,3</sup>	0.4828	<i>trans</i> - $\alpha$ -bisaboleno	
terpinoleno <sup>1,2,3</sup>	0.4383	citronelol <sup>1,2,3</sup>	0.0414
octanal <sup>1,2,3</sup>	0.043	perialdehído <sup>3</sup>	
metilheptenona <sup>1,2,3</sup>	tr	nerol <sup>1,2,3</sup>	0.0626
nonanal <sup>1,2,3</sup>	0.0559	<i>cis</i> -carveol <sup>3</sup>	
acetato de octilo <sup>1,2</sup>	0.0285	geraniol <sup>1,2,3</sup>	0.075
citronelal <sup>1,2,3</sup>	0.1009	<i>trans</i> -carveol <sup>3</sup>	
		<i>cariofileno óxido</i>	tr
decanal <sup>1,3</sup>	0.0497	nerolidol <sup>3</sup>	
linalol <sup>1,2,3</sup>	0.0826	<i>acido C8</i>	
octanol <sup>1,2,3</sup>	tr	<i>eugenol</i> <sup>3</sup>	tr
acetato de linalilo <sup>1,2,3</sup>	0.0363	<i>pelargónico</i>	
acetato de nonilo <sup>3</sup>	tr	<i>acetileugenol</i>	tr
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2,3</sup>	0.5007		
<i>trans</i> -cariofileno <sup>1,2,3</sup>	0.2684	nootkatona	0.054
terpinen-4-ol <sup>1,2,3</sup>	0.0288		

**TABLA IV.4.4.3- COMPOSICIÓN PORCENTUAL EN COLUMNA HP-5**

<b>Componente</b>	<b>%</b>	<b>Componente</b>	<b>%</b>
triciclono <sup>2</sup>		neral <sup>1,2,4</sup>	0.55
$\alpha$ -tuyeno <sup>1,2,4</sup>	0.49	<i>piperitona</i> <sup>1,2</sup> / <i>carvona</i> <sup>4</sup>	0.01
$\alpha$ -pineno <sup>1,2,4</sup>	2.15	geraniol <sup>1,2,4</sup>	0.03
canfeno <sup>1,2,4</sup>	0.08	acetato de linalilo	0.01
metilheptenona <sup>4</sup>	tr	geranial <sup>1,2,4</sup>	0.87
sabineno <sup>1,2,4</sup>	1.97	perialdehído <sup>1,2</sup>	0.02
$\beta$ -pineno <sup>1,2,4</sup>	14.69	acetato de bornilo <sup>2</sup>	0.01
mirceno <sup>1,2,4</sup>	1.65	undecanal <sup>1,2</sup>	0.04
octanal <sup>1,2,4</sup>	0.08	acetato de nonilo	tr
$\alpha$ -felandreno <sup>1,2,4</sup>	0.05	<i>geranoato de metilo</i> <sup>1,2</sup> ,	tr
$\Delta^3$ -careno <sup>2</sup>	0.01	<i>acetato de terpenilo</i>	tr
$\alpha$ -terpineno <sup>1,2,4</sup>	0.26	acetato de citronelilo <sup>1,2,4</sup>	0.06
p-cimeno <sup>1,2,4</sup>		acetato de nerilo <sup>1,2,4</sup>	0.67
+limoneno <sup>1,2,4</sup>		<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>	0.01
+ <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2,4</sup>		acetato de geranilo <sup>1,2,4</sup>	0.68
+cineol-1,8 <sup>1,2,4</sup>	58.86	dodecanal <sup>1,2,4</sup>	0.02
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>1,2</sup>	0.10	acetato de decilo <sup>1,2</sup>	0.02
$\gamma$ -terpineno <sup>1,2,4</sup>	11.84		0.04
<i>trans</i> -sabineno-hidrato	0.04	$\beta$ -cariofileno <sup>1,2,4</sup>	0.33
octanol <sup>4</sup>	tr	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno <sup>1,2,4</sup>	0.64
terpinoleno <sup>1,2,4</sup>	0.54	$\alpha$ -humuleno <sup>1,2,4</sup>	0.08
<i>cis</i> -sabineno-hidrato <sup>2</sup>	tr	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>1,2</sup>	0.03
linalol <sup>1,2,4</sup>	0.13	+ <i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>2</sup>	
nonanal <sup>1,2,4</sup>	0.09	$\gamma$ -muroleno <sup>2</sup>	0.02
<i>cis</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	0.01	germacreno D <sup>2</sup>	0.06
alcanfor <sup>1,2</sup>	tr	valenceno <sup>2</sup>	0.08
<i>trans</i> -limoneno-oxido <sup>1,2</sup>	0.01	tridecanal <sup>1</sup>	0.07
citronelal <sup>1,2,4</sup>	0.13	$\beta$ -bisaboleno <sup>1,2,4</sup>	0.95
borneol <sup>1,2</sup>	0.03	<i><math>\gamma</math>-elemeno</i> <sup>2</sup>	0.03
terpinen-4-ol <sup>1,2,4</sup>	0.12	<i>espatulenol</i>	0.01
$\alpha$ -terpineol <sup>1,2,4</sup>	0.23	tetradecanal <sup>2</sup>	0.01
decanal <sup>1,2,4</sup>	0.09	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>	0.04
acetato de octilo <sup>1,2,4</sup>	0.01	canferenol <sup>1,2</sup>	0.04
	0.01	$\alpha$ -bisabolol <sup>1,2</sup>	0.05
citronelol <sup>1,2</sup>	0.10	nootkatona <sup>2</sup>	0.04
nerol <sup>1,2,4</sup>	0.06		

**TABLA IV.4.4.4- COMPARACIÓN DE PORCENTAJES OBTENIDOS EN HP-5 Y CPWAX-52CB. MUESTRA 1.**

Componente	%		Componente	%	
	HP-5	CPWax		HP-5	CPWax
triciclono	0.01	tr	neral <sup>4</sup>	1.03	1.58
$\alpha$ -tuyeno <sup>a</sup>	0.39	1.56	piperitona		
$\alpha$ -pineno <sup>a</sup>	1.74		geraniol		0.05
canfeno	0.05	0.04	acetato de linalilo		0.06
metilheptenona			geranial	1.67	2.78
sabineno	1.62	1.43	perialdehído <sup>c</sup>		
$\beta$ -pineno	10.35	8.30	acetato de bornilo		
mirceno	1.57	1.35	undecanal		0.13
octanal <sup>1</sup>	0.10	0.05	acetato de nonilo		
$\alpha$ -felandreno <sup>1</sup>		0.04	metilgeranoato		
$\Delta^3$ -careno			acetato de terpenilo <sup>5</sup>		
$\alpha$ -terpineno	0.20	0.18	acetato citronelilo <sup>5</sup>	0.04	0.05
p-cimeno	0.11	0.12	acetato de nerilo	0.39	0.75
limoneno <sup>2 b</sup>	67.57	62.24	acetato de geranilo	0.33	0.58
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0.13	0.06	dodecanal	0.02	0.13
$\beta$ -felandreno+cineol <sup>2</sup>	0.12	0.34	acetato de decilo	0.03	
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>2 b</sup>			antranilato de etilo		
$\gamma$ -terpineno	8.84	8.76	$\beta$ -cariofileno	0.22	0.48
t-sabinenohidrato <sup>3</sup>	0.06		tr- $\alpha$ -bergamoteno	0.41	0.80
octanol <sup>3</sup>		tr	$\alpha$ -humuleno	0.04	0.2
terpinoleno	0.39	0.42	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>6</sup>	0.02	
<i>cis</i> -sabineno-hidrato			<i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>6</sup>		
linalol	0.13	0.12	$\gamma$ -muroleno	0.02	
nonanal	0.07		germacreno D	0.02	
<i>cis</i> -limoneno-oxido			<i>cis</i> -carveol	0.07	
<i>trans</i> -limoneno-oxido			valenceno	0.04	0.06
alcanfor			nerolidol		
citronelal	0.1	0.18	tridecanal	0.06	0.12
borneol		tr	$\beta$ -bisaboleno	0.61	1.40
terpinen-4-ol	0.04	0.15	$\gamma$ -elemeno	0.01	
$\alpha$ -terpineol	0.15	0.28	espatulenol		
decanal	0.03	0.09	tetradecanal		
acetato de octilo		0.03	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>	0.02	
nerol <sup>c</sup>	0.01	0.08	canferenol	0.03	
citronelol <sup>4</sup>		0.08	$\alpha$ -bisabolol	0.02	
<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>			nootkatona		

(eluyen juntos aquellos compuestos cuyos superíndices coincidan en número columna HP-5 y en letra columna CPWax)

**TABLA IV.4.4.5- COMPARACIÓN DE PORCENTAJES OBTENIDOS EN HP-5 Y CPWAX-52CB MUESTRA 2.**

Componente	%		Componente	%	
	HP-5	CPWax		HP-5	CPWax
triciclono			neral <sup>4</sup>	1.06	1.01
$\alpha$ -tuyeno <sup>a</sup>	0.41		piperitona		
$\alpha$ -pineno <sup>a</sup>	1.77	2.15	geraniol	0.04	0.04
canfeno	0.05	0.05	acetato de linalilo		0.01
metilheptenona		0.01	geranial	1.61	1.83
sabineno	1.61	1.71	perialdehído		0.07
$\beta$ -pineno	10.03	9.74	acetato de bornilo		
mirceno	1.62	1.64	undecanal	0.03	0.03
octanal <sup>1</sup>	0.09	0.04	acetato de nonilo		
$\alpha$ -felandreno <sup>1</sup>		0.05	geranoato de metilo		
$\Delta_3$ -careno			acetato de terpenilo <sup>5</sup>		
$\alpha$ -terpineno	0.2	0.2	acetato citronelilo <sup>5</sup>	0.03	0.04
p-cimeno	0.09	0.10	acetato de nerilo	0.41	0.46
limoneno <sup>2 b</sup>	68.53	66.69	acetato de geranilo	0.37	0.37
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0.12	0.06	dodecanal	0.06	0.06
$\beta$ -felandreno+cineol <sup>2</sup>	0.08	0.37	acetato de decilo		
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>2 b</sup>			antranilato de etilo		
$\gamma$ -terpineno	8.74	8.59	$\beta$ -cariofileno <sup>c</sup>	0.24	0.30
t-sabinenohidrato <sup>3</sup>	0.02		tr- $\alpha$ -bergamoteno	0.45	0.47
octanol <sup>3</sup>		0.02	$\alpha$ -humuleno	0.06	0.05
terpinoleno	0.4	0.39	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>6</sup>	0.02	
<i>cis</i> -sabineno-hidrato			<i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>6</sup>		
linalol	0.12	0.15	$\gamma$ -muroleno		
nonanal	0.05	0.07	germacreno D		
<i>cis</i> -limoneno-oxido					
<i>trans</i> -limoneno-oxido			valenceno	0.04	0.05
alcanfor			nerolidol		0.02
citronelal	0.12	0.12	tridecanal		0.10
borneol	0.01	0.13	$\beta$ -bisaboleno	0.64	0.75
terpinen-4-ol <sup>c</sup>	0.05		$\gamma$ -elemeno	0.02	
$\alpha$ -terpineol	0.15	0.18	espatulenol	0.01	
decanal	0.03	0.05	tetradecanal	0.01	
acetato de octilo	0.01	0.02	2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornano <sup>1,2</sup>	0.03	
nerol	0.04	0.04	canferenol	0.03	
citronelol <sup>4</sup>		0.03	$\alpha$ -bisabolol	0.03	
$\alpha$ -copaeno			nootkatona		

(eluyen juntos aquellos compuestos cuyos superíndices coincidan en número columna HP-5 y en letra columna CPWax)

**TABLA IV.4.4.6- COMPARACIÓN DE PORCENTAJES OBTENIDOS EN HP-5 Y CPWAX-52CB MUESTRA 3.**

Componente	%		Componente	%	
	HP-5	CPWax		HP-5	CPWax
triciclono	0.01	0.01	neral <sup>4</sup>	0.55	0.51
$\alpha$ -tuyeno <sup>a</sup>	0.47	2.35	piperitona		
$\alpha$ -pineno <sup>a</sup>	2.03		geraniol	0.08	0.15
canfeno	0.07	0.06	acetato de linalilo		0.10
metilheptenona			geranial	0.73	0.86
sabineno	1.99	2.10	perialdehído	0.08	
$\beta$ -pineno	13.76	12.87	acetato de bornilo		
mirceno	1.43	1.38	undecanal	0.03	0.02
octanal <sup>1</sup>	0.09	0.04	acetato de nonilo		
$\alpha$ -felandreno <sup>1</sup>		0.04	metilgeranoato		
$\Delta_3$ -careno			acetato de terpenilo <sup>5</sup>		
$\alpha$ -terpineno	0.23	0.22	acetato citronelilo <sup>5</sup>	0.04	0.04
p-cimeno	0.30	0.32	acetato de nerilo	0.58	0.54
limoneno <sup>2 b</sup>	62.35	58.18	acetato de geranilo	0.48	0.53
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0.10	0.05	dodecanal	0.02	0.02
$\beta$ -felandreno+cineol <sup>2</sup>	0.09	0.39	acetato de decilo	0.01	
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno <sup>2 b</sup>			antranilato de etilo	0.04	
$\gamma$ -terpineno	10.52	9.98	$\beta$ -cariofileno <sup>c</sup>	0.27	0.37
t-sabinenohidrato	0.01		tr- $\alpha$ -bergamoteno	0.51	0.52
octanol	0.03	0.04	$\alpha$ -humuleno	0.06	0.04
terpinoleno	0.46	0.47	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno <sup>6</sup>	0.02	
<i>cis</i> -sabineno-hidrato			<i>cis</i> - $\beta$ -santaleno <sup>6</sup>		
linalol	0.10	0.11	$\gamma$ -muroleno	0.01	
nonanal	0.08	0.09	germacreno D	0.03	
<i>cis</i> -limoneno-oxido					
<i>trans</i> -limoneno-oxido	0.01		valenceno	0.04	0.03
alcanfor	0.01		nerolidol		
citronelal	0.09	0.09	tridecanal	0.08	
borneol	0.01		$\beta$ -bisaboleno	0.83	0.72
terpinen-4-ol <sup>c</sup>	0.12		$\gamma$ -elemeno	0.02	
$\alpha$ -terpineol	0.21	0.23	espatulenol	0.01	
decanal	0.07	0.09	tetradecanal	0.02	
acetato de octilo	0.01		2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol <sup>1,2</sup>	0.03	
nerol		0.04	canferenol	0.03	
citronelol <sup>4</sup>		0.02	$\alpha$ -bisabolol	0.03	
$\alpha$ -copaeno	0.03		nootkatona	0.01	

(eluyen juntos aquellos compuestos cuyos superíndices coincidan en número columna HP-5 y en letra columna CPWax)

#### IV.4.4.2- EVOLUCIÓN DE LOS PORCENTAJES DURANTE LA CAMPAÑA DE ELABORACION.

La mayoría de los trabajos presentan los valores de unas muestras aisladas, salvo los de Cotroneo *et al.* (1986), Calvarano *et al.* (1988), que ofrecen las variaciones de los valores de 32 componentes, de noviembre a mayo y octubre a mayo respectivamente. Esto se realiza sobre una sola clase de columna, concretamente la apolar SE-52.

En nuestro trabajo se observa (Figuras IV.4.4.2, IV.4.4.3, IV.4.4.4 y IV.4.4.5.) que entre los hidrocarburos terpénicos existen dos patrones de comportamiento: el de limoneno y el de los componentes que evolucionan al contrario. Entre éstos además del  $\beta$ -pineno, estarían,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -tuyeno,  $\alpha$ -pineno, cariofileno, bergamoteno, bisaboleno y humuleno. Otros hidrocarburos terpénicos poseen comportamientos varios, como  $\alpha$ -terpineno y terpinoleno presentan una evolución similar, e igualmente sucede con mirceno y *trans*- $\beta$ -ocimeno.

Otros, en fin, tienen un comportamiento bastante “plano” bien por que se mantienen en una proporción constante, o bien por que su participación es tan baja que las variaciones son inapreciables para el sistema cromatográfico.

Llama la atención que el sabineno no presente una evolución similar a ningún otro terpeno y aunque, en principio, parece evolucionar al contrario que mirceno, posee valores más altos cuando disminuyen los valores de geranial más neral y *trans*- $\beta$ -ocimeno y, al contrario, disminuye cuando aumentan estos.

En cuanto al resto de aldehídos ninguno parece estar relacionado con la evolución de geranial y neral. Respecto a los alcoholes evolucionan prácticamente todos igual. Citronelol y geraniol se aproximan bastante y terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol siendo su evolución similar a la de los acetatos de geranilo y nerilo. La evolución de las concentraciones de los componentes a lo largo de la campaña 95/96 se presenta en la Tabla IV.4.4.7.

Los valores de limoneno suelen ser más elevados hacia el inicio de la campaña, lo que no significa que no podamos encontrar valores altos de limoneno a mediados o finales de la misma campaña. En este caso el valor más alto es el encontrado en el mes de enero, que se corresponde con el máximo también para canfeno, terpinoleno y  $\alpha$ -terpineno y con el mínimo encontrado para el resto de hidrocarburos terpénicos. Mirceno y  $\beta$ -ocimeno, presentan su máximo en febrero, coincidiendo con el mínimo para sabineno.

El máximo de limoneno coincide así mismo con los máximos de octanal, dodecanal y perillilaldehído y con los mínimos de citronelal y decanal, también con el mínimo encontrado para todos los alcoholes y los ésteres. neral y geranial en cambio presentan su máximo en el mes de febrero y su mínimo en mayo, coincidiendo con el mínimo y el máximo de sabineno respectivamente.



**TABLA IV.4.4. 7- EVOLUCIÓN DE COMPONENTES DURANTE LA CAMPAÑA 1995/1996**

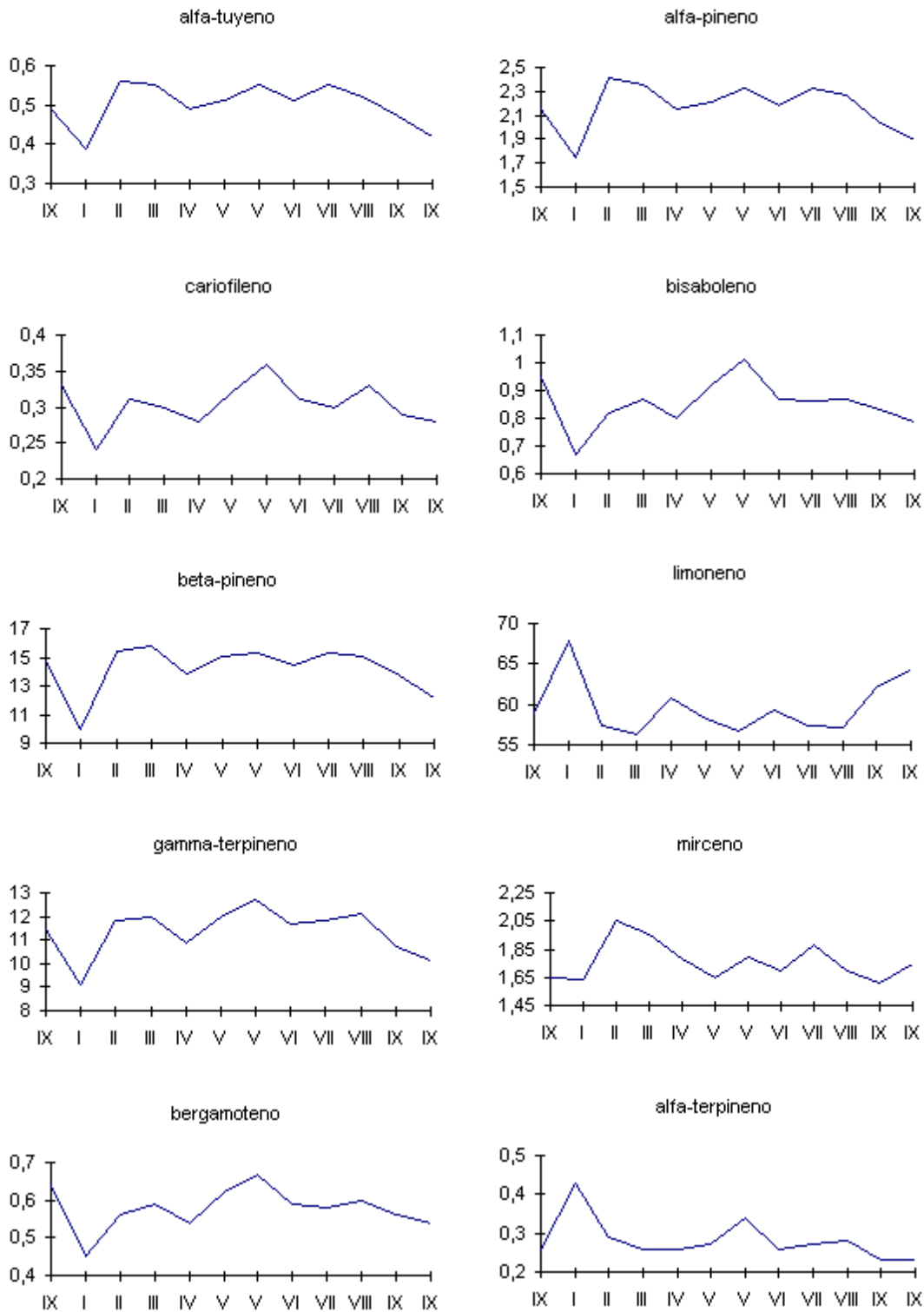
<b>COMPONENTE</b>	<b>IX</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>
$\alpha$ -tuyeno	0,49	0,39	0,56	0,55	0,49	0,51	0,51	0,55	0,52	0,47
$\alpha$ -pineno	2,15	1,75	2,42	2,36	2,15	2,21	2,18	2,32	2,27	2,04
canfeno	0,08	0,17	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08
metilheptenona			0,34	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01		
bineno	1,97	1,42	1,30	1,33	1,84	1,97	1,93	1,53	1,95	1,96
$\beta$ -pineno	14,69	9,95	15,39	15,73	13,85	15,05	14,45	15,36	15,12	13,70
mircenol	1,65	1,64	2,05	1,96	1,78	1,65	1,70	1,88	1,70	1,61
octanal	0,08	0,16	0,09	0,07	0,07	0,09	0,10	0,09	0,11	0,09
$\alpha$ -felandreno	0,05		0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
$\delta$ -3careno	0,01		0,01	0,01		0,01	0,01	0,01		
$\alpha$ -terpineno	0,26	0,43	0,29	0,26	0,26	0,27	0,26	0,27	0,28	0,23
p-cimeno		0,19								
limoneno	58,86	67,96	57,33	56,28	60,85	58,13	59,35	57,40	57,13	62,07
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno+cineol		0,05								
<i>Trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,10	0,11	0,15	0,15	0,14	0,11	0,12	0,15	0,10	0,11
$\gamma$ -terpineno	11,48	9,07	11,83	11,95	10,88	11,99	11,68	11,82	12,09	10,70
<i>Trans</i> -hidrato de sabineno	0,04	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,03
octanol		0,04								
terpinoleno	0,54	0,63	0,54	0,53	0,51	0,54	0,52	0,53	0,54	0,48
<i>cis</i> -hidrato de sabineno										
linalol	0,13	0,10	0,16	0,14	0,14	0,13	0,13	0,14	0,15	0,11
nonanal	0,09	0,09	0,14	0,11	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11	0,09
<i>cis</i> -oxido de limoneno	0,01			0,01		0,01	0,01	0,01		
alcanfor/				0,01		0,01	0,01			

**TABLA IV.4.2.7- CONTINUACIÓN**

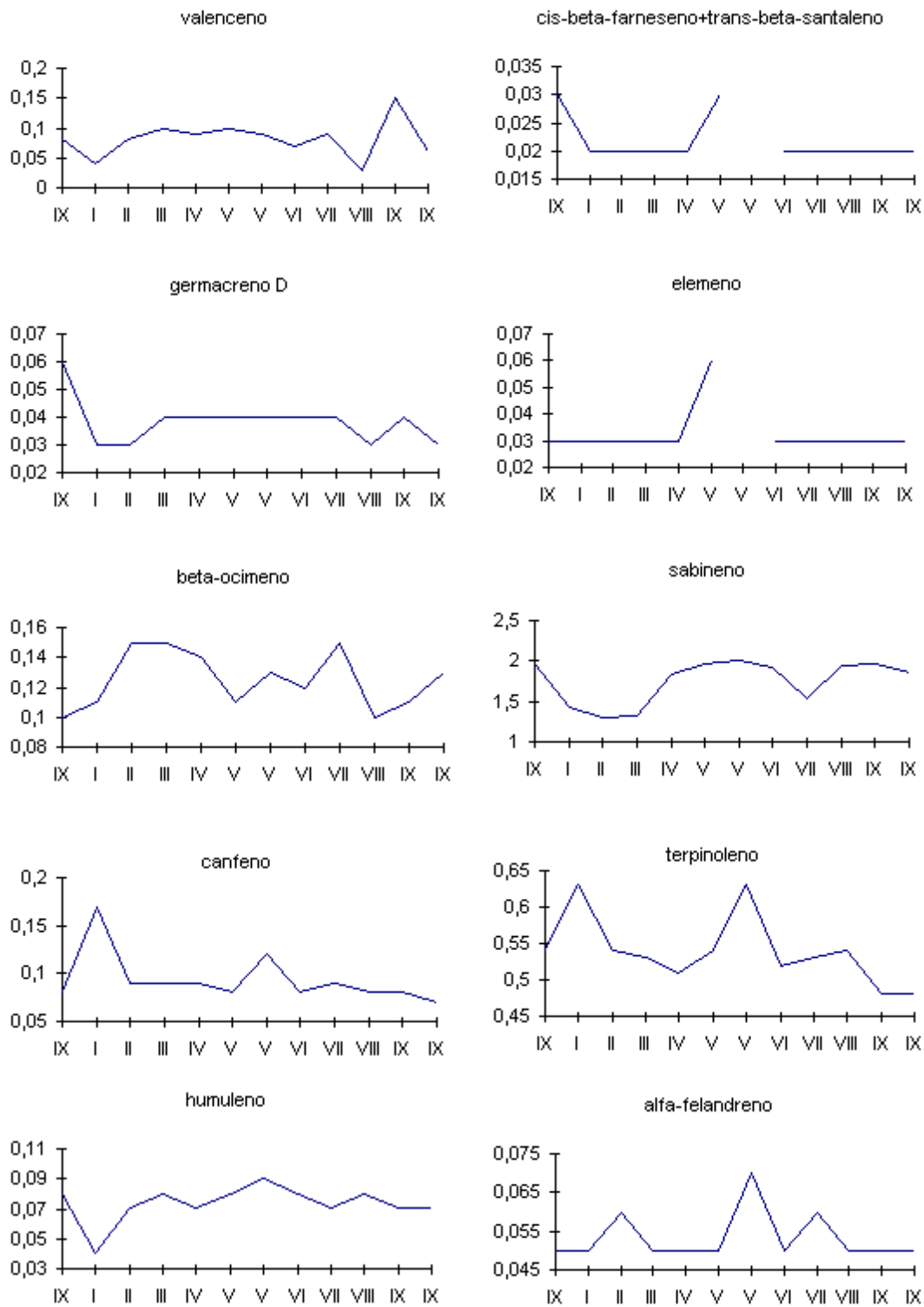
<i>trans</i> -óxido de limoneno	0,01		0,01	0,01		0,01	0,01		0,01	
citronelal	0,13	0,11	0,16	0,14	0,13	0,14	0,13	0,15	0,16	0,16
borneol	0,03	0,02	0,01	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
terpinenol-4	0,12	0,02	0,06	0,10	0,08	0,11	0,12	0,10	0,12	0,02
$\alpha$ -terpineol	0,23	0,10	0,17	0,21	0,20	0,21	0,21	0,22	0,30	0,12
decanal	0,09	0,04	0,05	0,06	0,06	0,09	0,08	0,07	0,09	0,07
acetato de octilo	0,01			0,03		0,01	0,01		0,01	
<i>carveol</i>	0,03				0,02	0,02	0,03	0,02		0,02
citronelol	0,10	0,02	0,05	0,15	0,12	0,09	0,10	0,15	0,11	0,05
nerol	0,06		0,01	0,07	0,05	0,04	0,06	0,05		0,04
neral	0,55	0,89	1,13	0,91	0,87	0,64	0,73	0,95	0,82	0,61
piperitona	0,01		0,01	0,01		0,01	0,01	0,01		
geraniol	0,03	0,02	0,04	0,16	0,13	0,04	0,07	0,16	0,03	0,02
acetato de linalilo	0,01									
geranial	0,87	1,54	1,89	1,44	1,42	1,01	1,16	1,53	1,26	1,04
perillilaldehido	0,02	0,05	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02
acetato de bornilo	0,01		0,01	0,01		0,01	0,01	0,01		0,05
undecanal	0,04	0,02	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,07
<i>acetato nonilo + metil ranoato</i>										0,07
<i>acetato de terpenilo</i>					0,03					
acetato de citronelilo+	0,06	0,04	0,04	0,06	0,04	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07
acetato de nerilo	0,67	0,37	0,50	0,53	0,48	0,59	0,55	0,51	0,82	0,50
<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>	0,01		0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
acetato de geranilo	0,68	0,31	0,49	0,56	0,52	0,67	0,67	0,63	0,82	0,58

**TABLA IV.4.2.7- CONTINUACIÓN**

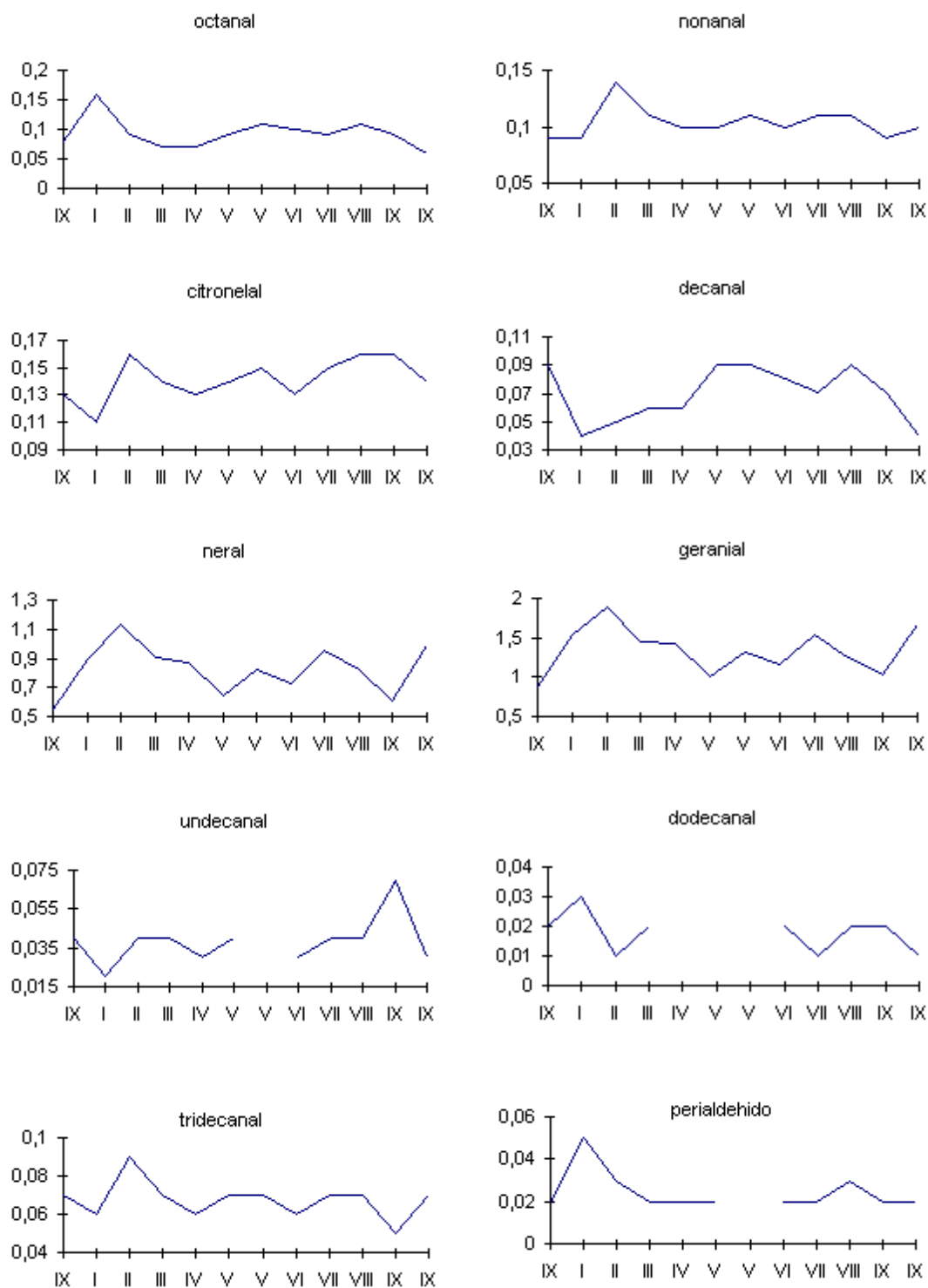
dodecanal	0,02	0,03	0,01	0,02		0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
acetato de decilo+	0,02		0,01	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>antranilato de etilo</i>	0,04		0,04		0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
$\beta$ -cariofileno	0,33	0,24	0,31	0,30	0,28	0,32	0,31	0,30	0,33	0,29
$\alpha$ -bergamoteno	0,64	0,45	0,56	0,59	0,54	0,62	0,59	0,58	0,60	0,56
<i>propionato de nerilo</i>			0,01	0,01						
$\alpha$ -humuleno	0,08	0,04	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07
<i>cis</i> - $\beta$ farneseno + <i>trans</i> - $\beta$ -santaleno	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>propionato de geranilo</i>	0,01		0,01	0,01			0,01	0,01		
$\gamma$ -muroleno	0,02		0,01	0,01		0,02	0,01	0,01		0,01
germacreno D	0,06	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04
valenceno	0,08	0,04	0,08	0,10	0,09	0,10	0,07	0,09	0,03	0,15
<i>tridecanal</i>	0,07	0,06	0,09	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07	0,05
$\beta$ -bisaboleno	0,95	0,67	0,82	0,87	0,80	0,92	0,87	0,86	0,87	0,83
<i>nerolidol</i>	0,01		0,01			0,01	0,01			
$\gamma$ -elemeno	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>tetradecanal</i>	0,01		0,02	0,03		0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
2-3-dimetil norbornanol	0,04	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02
canferenol	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
$\alpha$ -bisabolol	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,11	0,05	0,10	0,04	0,04
<i>espatulenol</i>	0,01		0,01	0,01		0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
nootkatona	0,04	0,04	0,06	0,06	0,06	0,04	0,05	0,06	0,05	0,03



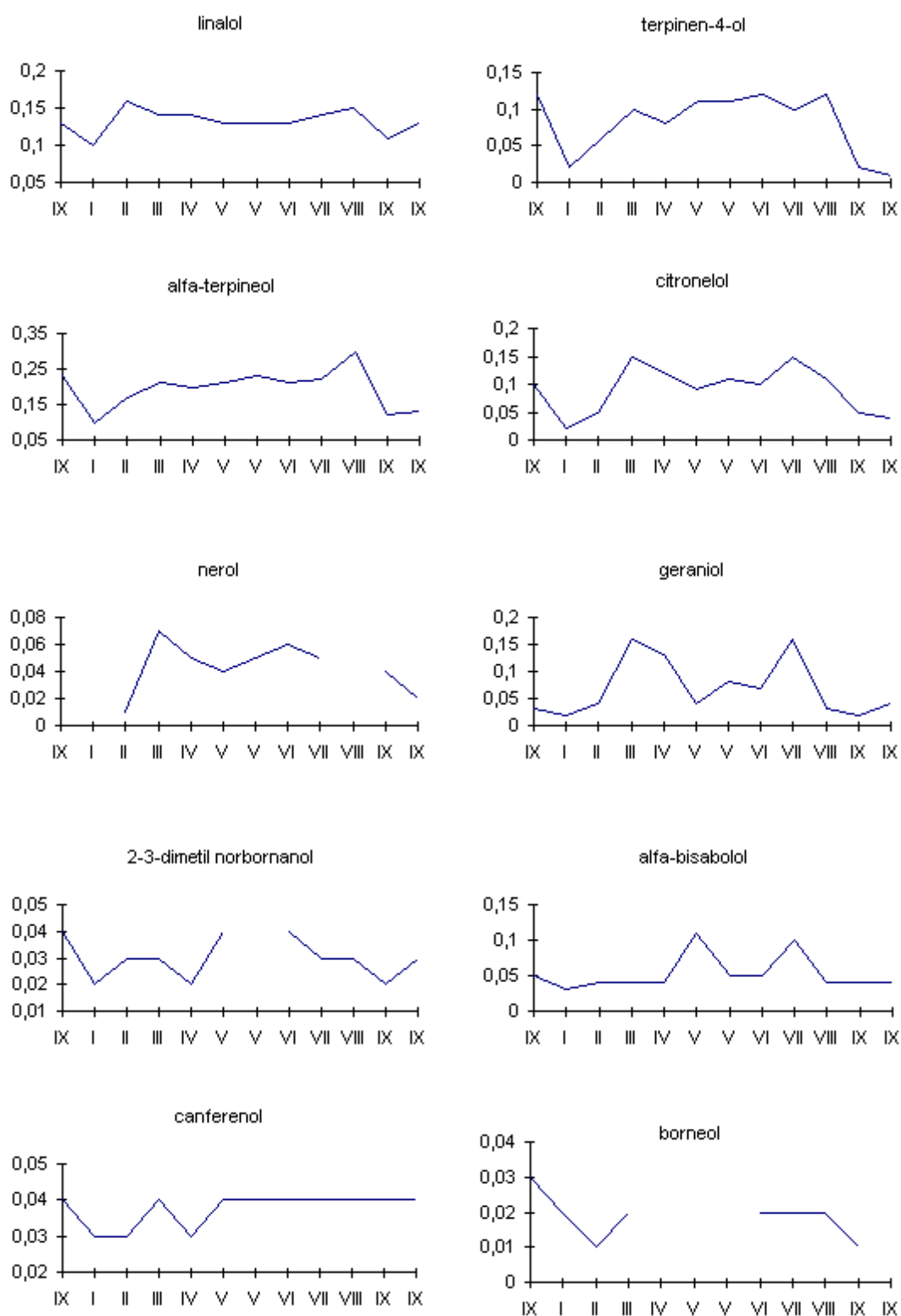
**FIGURA IV.4.4.2- EVOLUCIÓN DE HIDROCARBUROS TERPÉNICOS**



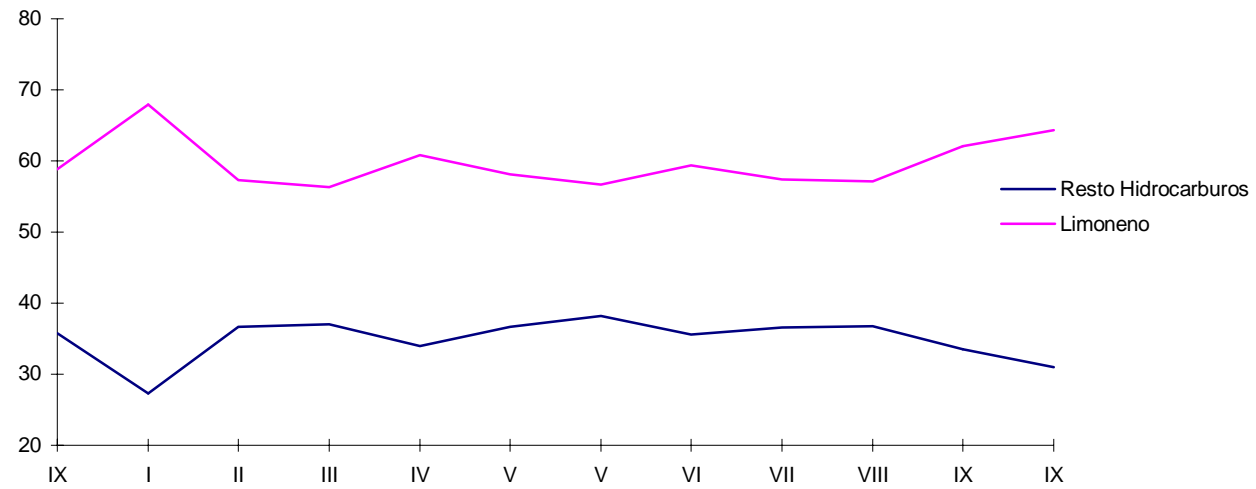
**FIGURA IV.4.4.3- EVOLUCIÓN DE HIDROCARBUROS TERPÉNICOS**



**FIGURA IV.4.4.4 EVOLUCIÓN DE ALDEHÍDOS**



**FIGURA IV.4.4.5- EVOLUCION DE ALCOHOLES**



**FIGURA IV.4.4.6- EVOLUCIÓN DE LIMONENO FRENTE AL RESTO DE HIDROCARBUROS TERPÉNICOS**



#### IV.4.4.3- VALORES LÍMITES

Di Giacomo *et al.* (1994) dan unos valores máximos y mínimos de porcentajes de unos 62 componentes del aceite esencial de limón italiano, entre estos el p-cimeno comprendido entre un mínimo de 0,025 y un máximo de 0,675, que suponemos habrá separado con otro programa distinto al que se expone en el trabajo ya que en el cromatograma presentado el pico del p-cimeno no aparece separado del limoneno y no menciona la utilización de otra columna, como en esta memoria se realiza, en que hemos encontrado valores de este componente comprendidos entre 0,030 y 0,500.

De los trabajos anteriormente citados se pueden obtener los porcentajes máximos y mínimos de una campaña -Cotroneo *et al.* (1986) la de 82/83 y 84 Calvarano *et al.* (1988) de octubre de 1987 a mayo del 88-. Estos porcentajes comparados entre sí nos indican que las distintas campañas producen variaciones los máximos y los mínimos de cada componente. Por ejemplo, para Cotroneo *et al.* (1986) los valores de limoneno más p-cimeno presentan un mínimo de 61,393% y un máximo de 65,920% y Calvarano *et al.* (1988) encuentran también en limón italiano un mínimo de limoneno sin p-cimeno de 64,559 y un máximo de 69,387. Di Giacomo *et al.* (1994) ofrece los porcentajes a lo largo de varias campañas y encuentra para limoneno valores comprendidos entre 59,570 y 71,060.

Probablemente en vistas a la normalización sería conveniente disponer de un banco de datos con los porcentajes de los distintos componentes, pero esto sólo -como se deduce de las variaciones para un mismo compuesto en campañas aisladas- no nos

aseguraría la genuinidad, lo que si es más característico son las proporciones relativas de unos componentes respecto de otros, como puede deducirse a partir de las gráficas de evolución de los componentes

Esto se aprecia, por ejemplo, en el caso de limoneno y  $\beta$ -pineno: si el primero aumenta el segundo disminuye y viceversa. Existen además correlaciones entre las variaciones de porcentajes de unos compuestos respecto de otros que deberán poner de manifiesto la relación filogenética de los mismos junto con la mayor producción de unos u otros dependiendo de la climatología y el tipo de suelo por el que se vean afectados.

Todas estas relaciones entre componentes recogidas en una base de datos si permitirán establecer la relación genuina entre los mismos, teniendo en cuenta asimismo la influencia de otros factores externos sobre la producción que igualmente se han de considerar.

A continuación se recogen en la Tabla IV.4.4.8, los máximos y los mínimos encontrados a lo largo de varias campañas 1993/1999 en aceite esencial de limón producido en la región de Murcia

**TABLA IV.4.4.8- MÁXIMOS Y MÍNIMOS ENCONTRADOS EN LA COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN ENTRE LOS AÑOS 1993 Y 1999**

<b>Componente</b>	<b>% min</b>	<b>% max</b>
triciclono	0,005	0,010
$\alpha$ -tuyeno	0,390	0,560
$\alpha$ -pineno	1,740	2,430
canfeno	0,040	0,170
metil-heptenona	0,003	0,030
sabineno	0,870	2,380
$\Delta^3$ -careno	tr	0,010
$\beta$ -pineno	8,300	15,760
octanal	0,030	0,150
$\beta$ -mirceno	1,140	2,050
$\alpha$ -felandreno	0,016	0,080
<i><math>\beta</math>-felandreno</i>	0,004	0,030
$\alpha$ -terpineno	0,130	0,400
p-cimeno	0,030	0,500
limoneno	56,280	68,800
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	tr	
cineol-1,8	tr	0,029
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,010	0,150
$\gamma$ -terpineno	7,370	12,090
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	tr	0,009
octanol	0,006	0,070
tepinoleno	0,290	0,630
<i>cis</i> -hidrato de sabineno	tr	0,010
linalol	0,070	0,190
nonanal	0,053	0,110

**TABLA IV.4.4.8- CONTINUACIÓN**

<b>Componente</b>	<b>% min</b>	<b>% max</b>
<i>cis</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>trans</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>alcanfor</i>	tr	0,010
citronelal	0,070	0,190
borneol	0,005	0,030
terpinen-4-ol	0,007	0,120
$\alpha$ -terpineol	0,070	0,300
decanal	0,020	0,110
acetato de octilo	0,007	0,040
nerol	0,004	0,090
citronelol	0,004	0,150
neral	0,390	1,580
piperitona	tr	0,010
geraniol	0,005	0,160
acetato de linalilo	0,028	0,120
acetato de nonilo	tr	0,001
geranial	0,670	2,780
perillilaldehído	0,005	0,018
<i>acetato de bornilo</i>	0,004	0,050
undecanal	0,020	0,080
geranoato de metilo	tr	0,070
acetato de citronelilo	0,026	0,090
acetato de nerilo	0,330	0,820
<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>	tr	0,010
acetato de geranilo	0,306	0,820
dodecanal	0,004	0,080
acetato de decilo	0,003	0,019

**TABLA IV.4.4.8- CONTINUACIÓN**

<b>Componente</b>	<b>% min</b>	<b>% max</b>
<i>antranilato de etilo</i>	tr	0,040
$\beta$ -cariofileno	0,160	0,680
bergamoteno	0,330	0,900
$\gamma$ -cadineno	tr	tr
$\alpha$ -humuleno	0,010	0,080
<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	+	+
+ $\beta$ -santaleno	0,020	0,030
$\gamma$ -muroleno	tr	0,004
germacreno D	0,003	0,060
valenceno	0,020	0,150
tridecanal	0,040	0,090
$\beta$ -bisaboleno	0,390	0,950
$\gamma$ -elemeno	0,002	0,060
<i>espatulenol</i>	0,008	0,020
tetradecanal	0,008	0,030
2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol	0,003	0,050
canferenol	0,010	0,400
$\alpha$ -bisabolol	0,010	0,110
<i>cis</i> -carveol	tr	tr
<i>trans</i> -carveol	tr	tr
<i>nerolidol</i>	tr	0,018
nootkatona	0,010	0,060

#### IV.4.4.4- *ESTUDIO DE COMPONENTES VOLÁTILES EN ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO*

Todo lo hasta ahora expuesto permite llevar a cabo la determinación de la composición de la fracción volátil del aceite esencial de limón de forma más o menos detallada. Pero puesto que la característica del aroma no está sólo en la cantidad de producto presente, sino como sucede con cualquier sustancia volátil, en la facilidad de “evaporarse”, por expresarlo de una forma muy gráfica, es decir por su punto de ebullición y la presión de vapor, será interesante el estudio del espacio de cabeza producido y la determinación de los niveles umbrales de olfacción de los distintos componentes.

Además, en el caso de productos como es éste cuyo principal interés es el aromático, hay que tener en cuenta la percepción por parte del consumidor, de ahí el interés de la ciencia por el desarrollo de técnicas que permitan la aproximación más perfecta a la sensibilidad del sentido del olfato, ya que las proporciones en las que aparecen al evaporarse, es decir, en el espacio de cabeza y como son detectados por la pituitaria, no son totalmente coincidentes con la composición porcentual de la muestra, aunque lógicamente también dependen de ellas.

En este trabajo se realizan una serie de determinaciones de la composición de los volátiles presentes en el espacio de cabeza del aceite esencial de limón utilizando dos técnicas basadas en la extracción directa de los gases presentes en la atmósfera adyacente a la fase líquida: A) Microextracción en fase sólida (SPME) empleando Polidimetilxilosano (PDMS) como recubrimiento

polimérico y B) la inyección directa de un volumen del espacio de cabeza de los componentes volátiles en cromatografía gaseosa (Figuras IV.4.4.4.1 y IV.4.4.4.2, respectivamente).

El estudio comparado de los porcentajes obtenidos entre componentes volátiles de un aceite esencial, analizado mediante las técnicas arriba citadas, muestra, corroborando los datos de Jordán (1999), que la utilización de la fibra distorsiona la realidad existente en el espacio de cabeza, ya que en el caso del polímero de polidimetilxilosano de naturaleza apolar, se realiza la aportación de los terpenos al espacio de cabeza, ya que al establecerse el reparto entre el aire existente en el vial y la fibra, esta, va retirando terpenos y desplazando a otros compuestos que con menores presiones de vapor no tienen tanta afinidad por el recubrimiento presente en la fibra.

El porcentaje de limoneno se incrementa ligeramente de 60 a 65%, pero este 5% supone para el resto una gran proporción relativa, así los porcentajes de acetato de geranilo, pasan de 0.68 a 0.16; acetato de nerilo de 0.5 a 0.19; alcoholes como terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol y citronelol, también disminuyen sus porcentajes de 0.12, 0.23 y 0.10 a 0.03, 0.09 y 0.04 respectivamente, de forma que prácticamente todo lo que se detecta en el espacio de cabeza son hidrocarburos terpénicos, es decir, se empobrece el espacio de cabeza en diversidad de componentes.

Ocurre también con los hidrocarburos terpénicos presentes en porcentajes más bajos como son el cariofileno, bergamoteno y bisaboleno, que pasan de valores sobre 0.33, 0.64 y 0.95 a 0.10, 0.13 y 0.09, siendo este último el que disminuye su proporción de forma más espectacular, tal vez por que su presión de vapor sea la

más elevada de los tres. No hay en cambio mucha diferencia en el caso de  $\beta$ -pineno, sabineno mirceno y  $\gamma$ -terpineno.

Cuando se realiza una inyección del contenido en el espacio de cabeza, aparecen -aunque sea en escasas proporciones- algunos componentes volátiles de muy baja presión de vapor como acetaldehído, acetona, valeraldehído, que sólo se observan programando temperaturas inferiores a 60°C, generalmente 40°C.

Pero lo más interesante de esta técnica es que las proporciones relativas de los componentes varían de forma considerable, y pese a que el limoneno sigue siendo mayoritario con porcentajes entre 45 y 55%, se observa que  $\alpha$ -tuyeno y  $\alpha$ -pineno aumentan a 2,5 y 4,9% respectivamente, sabineno pasa a 0,79%, y  $\beta$ -pineno se sitúa sobre el 7%, mirceno 1%, y  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno y p-cimeno 1,2%, 3,7% y 7%, respectivamente.

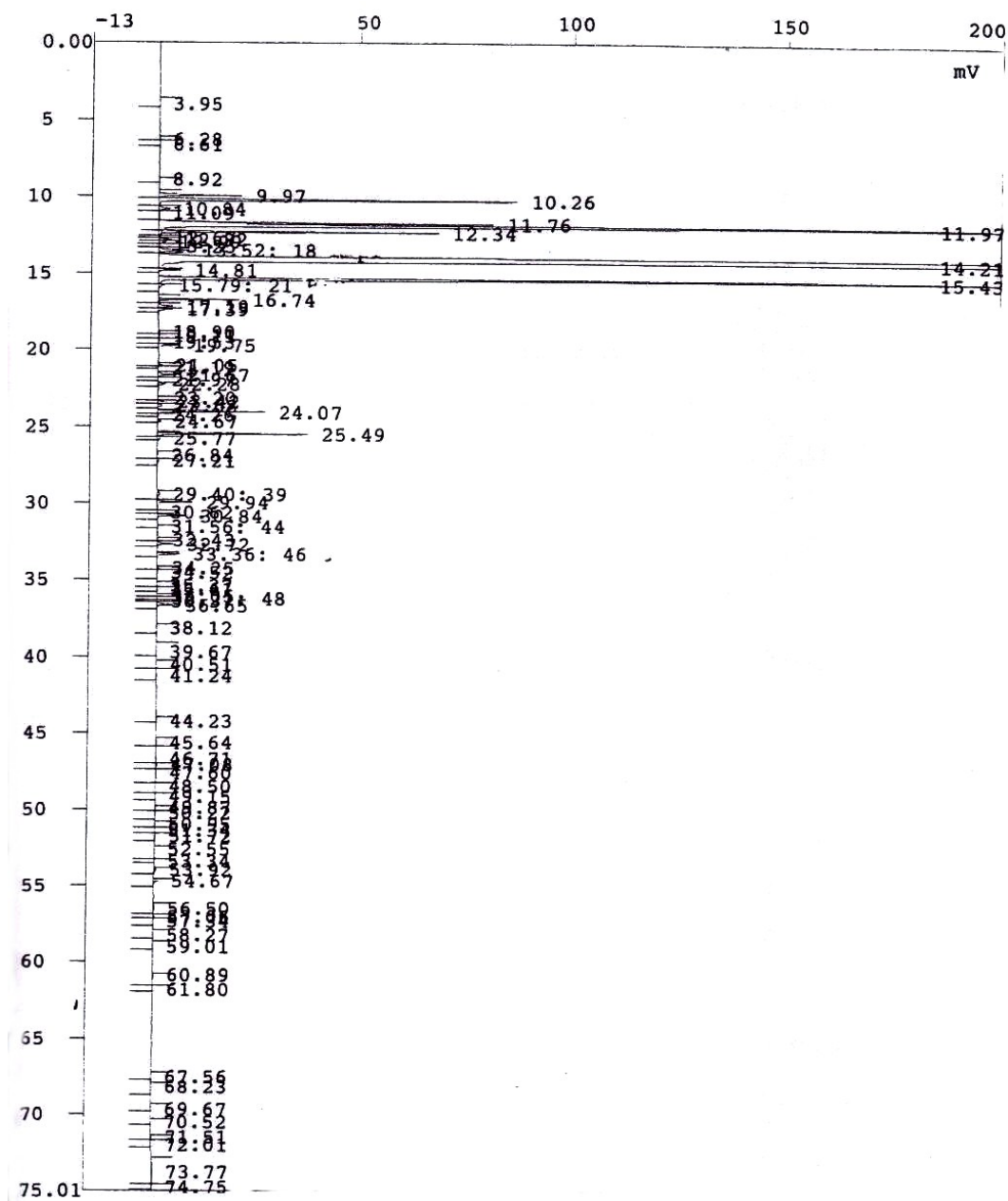
Los aldehídos geranial y neral aparecen en porcentajes de 0,1%, y sus acetatos 0,12% y 0,13% respectivamente. Aunque los porcentajes de los componentes siguen siendo muy bajos, se observa una mayor variedad, por tanto es un espacio de cabeza con mayor riqueza de matices comparado con lo que sucede con la fibra.

Esto nos dice que debido a las diferentes presiones de vapor, no siempre van a prevalecer los aromas de aquellos componentes presentes en mayor porcentaje, sino que influye además de su capacidad de evaporarse, la capacidad de ser detectado por el olfato, es decir sus niveles umbrales de detección y por ello componentes existentes en proporciones menores en la muestra

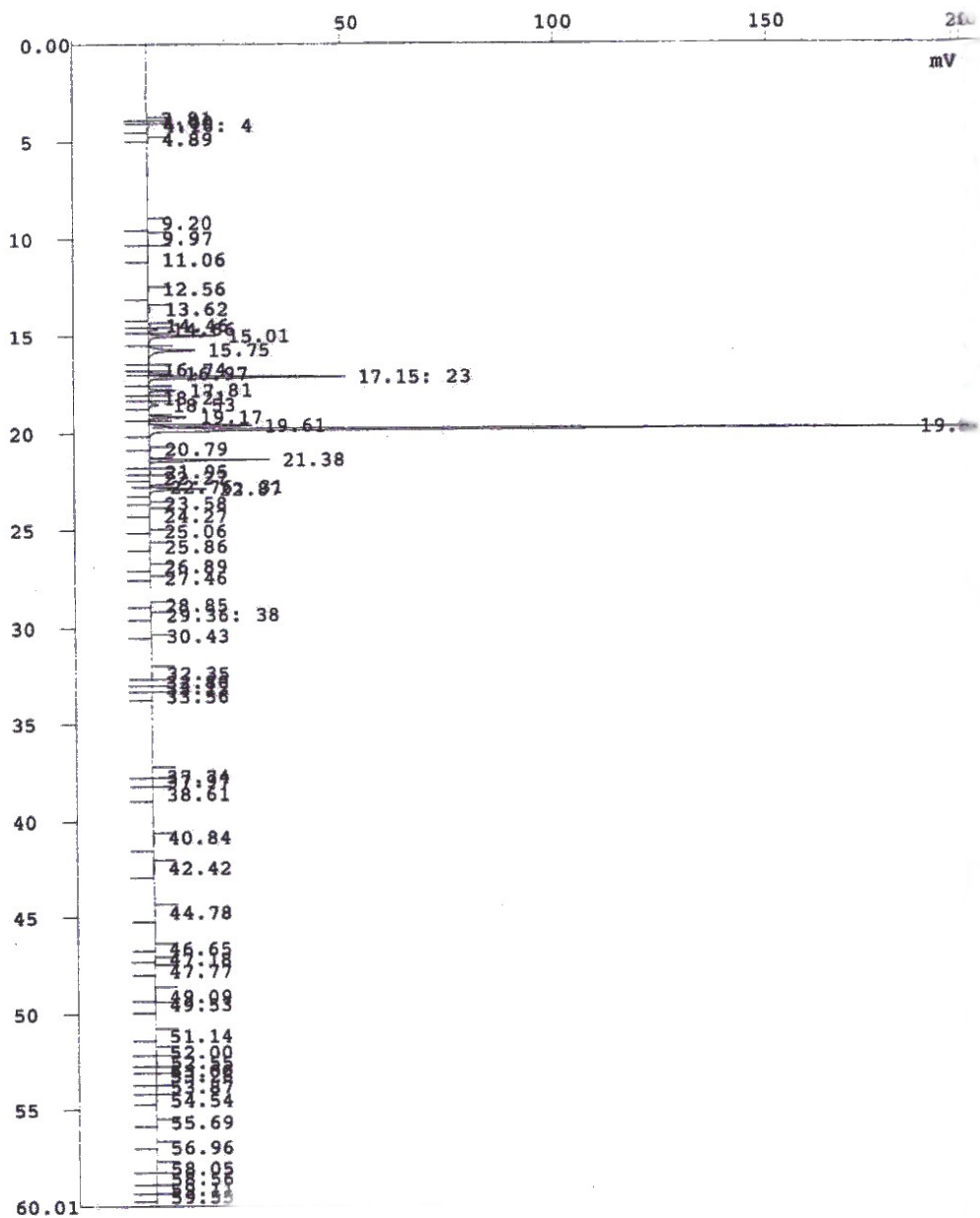


pueden influir más en el aroma de lo que en principio podría esperarse.

Queda por fin proponer la utilización del espacio de cabeza para observar la variación que se produce a lo largo de la campaña, la determinación de los niveles umbrales de detección de los componentes presentes en dicho espacio de cabeza y la colaboración de paneles de expertos, junto con técnicas más sofisticadas como la nariz electrónica, para definir de forma más refinada el perfil aromático del aceite esencial de limón y establecer aromagramas tipo de limoneros de diversas procedencias.



**FIGURA IV.4.4.4.1- PERFIL CROMATOGRÁFICO EN ESPACIO DE CABEZA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE SPME CON PDMS**



**FIGURA IV.4.4.4.2- PERFIL CROMATOGRÁFICO EN ESPACIO DE CABEZA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE INYECCIÓN DIRECTA**

**ANEXO I**



**APORTACIÓN AL PROYECTO DE MONOGRAFÍA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL (*Citrus limon* (Linneo) N.L.  
Burman) OBTENIDO POR EXPRESIÓN.**

**1. Ambito de aplicación:**

Esta norma especifica ciertas características del aceite esencial de limón, de España, obtenido por expresión, en vistas a facilitar la certificación de su calidad.

**2. Referencias:**

I.S.O./R 210:1961- *Aceites Esenciales* .Envasado

I.S.O./R 211:1961- *Aceites Esenciales* .Etiquetado

I.S.O. 212: *Aceites Esenciales* .Toma de muestras.

I.S.O. 279: *Aceites Esenciales*. Determinación de la densidad relativa a 20°.

I.S.O. 280: *Aceites Esenciales*. Determinación del índice de refracción.

I.S.O. 592: *Aceites Esenciales*. Determinación de la rotación óptica

I.S.O. 1279: *Aceites Esenciales*. Determinación del contenido en compuestos carbonílicos. Método de la Hidroxilamina libre.

I.S.O. 4715: *Aceites Esenciales*. Evaluación cuantitativa del residuo de evaporación.

I.S.O. 4735: *Aceites Esenciales de cítricos*. Determinación del valor CD mediante espectrofotometría ultravioleta.

### **3. Definición:**

Aceite esencial de limón de España, obtenido por expresión: es el aceite extraído, sin calentar, mediante tratamiento mecánico, del pericarpio fresco del fruto de *Citrus limon* (Linneo) N.L.Burman, cultivado en España.

### **4. Características:**

#### **4.1- Aspecto:**

Líquido transparente, que puede enturbiarse cuando disminuye la temperatura.

#### **4.2- Color:**

De amarillo pálido a verde amarillento.

CIE L\*a\*b\*-(sólo información)

L\* valores comprendidos entre 31 y 35 ± 0,1

a\* valores comprendidos entre -1,02 y 0,26.

b\* valores comprendidos entre 0,09 y 3,64.

#### **4.3 Olor:**

Característico del pericarpio fresco de limón.

#### **4.4 Densidad relativa d(20/20°C).**

Mínimo: 0,842

Máximo: 0,855

**4.5 Índice de refracción a 20°C:**

Mínimo: 1,472

Máximo: 1,476

**4.6 Rotación óptica a 20°C:**

Comprendida entre +56 y +62°

**4.7 Residuo de evaporación:**

Mínimo: 1,7 %

Máximo: 3,0 %

**4.8 Índice de Carbonilo:**

Mínimo: 1,70

Máximo: 4,07

**4.9 Valor CD:**

Mínimo: 0,332

Máximo: 0,668

Dilución de 0,25g de aceite esencial en 100mL de etanol 95%(v/v).



**4.10 Composición porcentual de componentes individuales de la fracción volátil del aceite esencial mediante cromatografía de gases**

<b>Componente</b>	<b>% min.</b>	<b>% max.</b>
triciclono	0,005	0,010
$\alpha$ -tuyeno	0,390	0,560
$\alpha$ -pineno	1,740	2,430
canfeno	0,040	0,170
metil-heptenona	0,003	0,030
sabineno	0,870	2,380
$\Delta^3$ -careno	tr	0,010
$\beta$ -pineno	8,300	15,760
octanal	0,030	0,150
$\beta$ -mirceno	1,140	2,050
$\alpha$ -felandreno	0,016	0,080
<i><math>\beta</math>-felandreno</i>	0,004	0,030
$\alpha$ -terpineno	0,130	0,400
p-cimeno	0,030	0,500
limoneno	56,280	68,800
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno	tr	
cineol-1,8	tr	0,029
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,010	0,150
$\gamma$ -terpineno	7,370	12,090
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	tr	0,009
octanol	0,006	0,070
tepinoleno	0,290	0,630
<i>cis</i> -hidrato de sabineno	tr	0,010
linalol	0,070	0,190
nonanal	0,053	0,110

#### 4.10 CONTINUACIÓN

Componente	% min.	% max.
<i>cis</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>trans</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>alcanfor</i>	tr	0,010
citronelal	0,070	0,190
borneol	0,005	0,030
terpinen-4-ol	0,007	0,120
$\alpha$ -terpineol	0,070	0,300
decanal	0,020	0,110
acetato de octilo	0,007	0,040
nerol	0,004	0,090
citronelol	0,004	0,150
neral	0,390	1,580
piperitona	tr	0,010
Geraniol	0,005	0,160
acetato de linalilo	0,028	0,120
acetato de nonilo	tr	0,001
geranial	0,670	2,780
perillilaldehído	0,005	0,018
<i>acetato de bornilo</i>	0,004	0,050
undecanal	0,020	0,080
geranoato de metilo	tr	0,070
acetato de citronelilo	0,026	0,090
acetato de nerilo	0,330	0,820
<i><math>\alpha</math>-copaeno</i>	tr	0,010
acetato de geranilo	0,306	0,820
dodecanal	0,004	0,080
acetato de decilo	0,003	0,019

#### 4.10- CONTINUACIÓN

Componente	% min.	% max.
<i>antranilato de etilo</i>	tr	0,040
$\beta$ -cariofileno	0,160	0,680
bergamoteno	0,330	0,900
$\gamma$ -cadineno	tr	tr
$\alpha$ -humuleno	0,010	0,080
<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	+	+
+ $\beta$ -santaleno	0,020	0,030
$\gamma$ -muroleno	tr	0,004
germacreno D	0,003	0,060
valenceno	0,020	0,150
tridecanal	0,040	0,090
$\beta$ -bisaboleno	0,390	0,950
$\gamma$ -elemeno	0,002	0,060
<i>espatulenol</i>	0,008	0,020
tetradecanal	0,008	0,030
2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol	0,003	0,050
canferenol	0,010	0,400
$\alpha$ -bisabolol	0,010	0,110
<i>cis</i> -carveol	tr	tr
<i>trans</i> -carveol	tr	tr
<i>nerolidol</i>	tr	0,018
nootkatona	0,010	0,060

**ANEXO II- INDICES DE RETENCIÓN EN OV-101**



MUESTRA PATRÓN		MUESTRAS COMPARADAS			
Componentes	IK	Componentes	IK		
			1	2	3
ETER					
C9	900				
triciclono	925	triciclono	925	925	
$\alpha$ -tuyeno	929	$\alpha$ -tuyeno	928	928	928
$\alpha$ -pineno	937	$\alpha$ -pineno	936	937	936
canfeno	950	canfeno	949	950	949
metil-heptenona		metil-heptenona			
sabineno	971	sabineno	970	969	970
$\beta$ -pineno	976	$\beta$ -pineno	976	977	975
		aldehídoC8			
$\beta$ -mirceno	985	$\beta$ -mirceno	985	985	985
$\alpha$ -felandreno	996	$\alpha$ -felandreno	997	997	997
$\Delta$ 3-careno	997	$\Delta$ 3-careno			
C10	1000			1005	
$\alpha$ -terpineno	1011	$\alpha$ -terpineno	1010	1010	1009
p-cimeno	1014	p-cimeno	1013	1014	1013
limoneno + <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno +	1028	limoneno + <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno +	1028		1027
		<i><math>\beta</math>-felandreno</i>		1032	1029
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	1042	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	1041	1042	1041
$\gamma$ -terpineno	1054	$\gamma$ -terpineno	1053		1053
octanol	1057	octanol	1056	1056	1056
tepinoleno	1081	tepinoleno	1080	1081	1080
linalol + aldehídoC9	1084	linalol + aldehídoC9	1084	1084	1083
C11	1100				1085
<i>cis</i> -óxido de limoneno	1098	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1099	1099	
<i>trans</i> -óxido limoneno	1116	<i>trans</i> -óxido limoneno			
alcanfor	1121	alcanfor	1120	1120	1120
citronelal	1133	citronelal	1132	1133	1132
		<i>borneol</i>		1143	
terpinen4-ol	1163	terpinen4-ol	1162	1162	1161
$\alpha$ -terpineol	1173	$\alpha$ -terpineol	1172	1172	1172
aldehído C10	1185	aldehído C10	1184	1185	1184
		acetato de octilo		1193	
nerol	1196	nerol	1195	1195	1195
				1198	
C12	1200				
citronelol,	1206	citronelol,	1204	1205	1204
			1208	1209	1208
neral	1214	neral	1213	1214	1213
		<i>piperitona</i>		1225	
geraniol	1236	geraniol	1235	1235	1235
acetato de linalilo	1240	acetato de linalilo		1239	
geranial + perialdehído	1244	geranial + perialdehído	1243	1244	1243
acetato de bornilo		acetato de bornilo	1249	1250	
aldehído C11	1287	aldehído C11	1286	1286	1286
			1293	1293	
<i>geranoato de metilo</i>			1298		
C13	1300			1300	
acetato de citronelilo	1336	acetato de citronelilo	1335	1335	1334
acetato de nerilo	1344	acetato de nerilo	1343	1344	1343

			1358	1358	
acetato de geranilo	1362	acetato de geranilo	1361	1362	1361
			1385	1385	
aldehído C12	1389	aldehído C12	1388	1388	
				1392	
				1396	
acetato de decilo	1399	acetato de decilo	1398	1399	1398
C14	1400				
<i>antranilato de etilo</i>	1409	<i>antranilato de etilo</i>	1408	1408	1407
$\beta$ -cariofileno	1414	$\beta$ -cariofileno	1413	1413	1413
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1432	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1431	1431	1431
				1434	
$\alpha$ -humuleno	1448	$\alpha$ -humuleno	1447	1447	1447
<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	1454	<i>cis</i> - $\beta$ -farneseno	1453	1453	
$\beta$ -santaleno		$\beta$ -santaleno	1470	1470	
germacreno D	1477	germacreno D	1476	1476	1476
			1484	1484	1484
valenceno	1488	valenceno	1487	1487	1486
aldehído C13	1492	aldehído C13	1491	1491	1490
				1494	
$\beta$ -bisaboleno	1500	$\beta$ -bisaboleno	1498	1498	1498
C15(+)				1504	
				1507	
				1511	
				1520	
				1528	
$\gamma$ -elemeno	1532	$\gamma$ -elemeno	1531	1531	1531
espatulenol	1560	espatulenol	1560	1560	
				1564	
				1579	
aldehído C14	1594	aldehído C14	1592	1593	
C16	1600			1598	
			1609	1610	
norbonanol	1636	norbonanol	1635	1636	
canferenol	1650	canferenol	1648	1649	
$\alpha$ -bisabolol	1666	$\alpha$ -bisabolol	1665	1665	1665
				1670	
				1674	
				1691	
C17	1700			1710	
				1735	
			1768	1769	
				1794	
C18	1800		1797	1797	
C19	1900		1897	1897	
nootkatona	1914	nootkatona	1913	1913	1913
c20	2000		1997	1997	
			2243	2243	

## **CONCLUSIONES**





**Primera.-** En la industria transformadora de limón española el aceite esencial sigue constituyendo un elaborado de primordial importancia.

**Segunda.-** La determinación objetiva instrumental del color del aceite esencial de limón, del que no se dispone de antecedentes, son: Luminosidad  $L^*$  entre 31,90 y 35,05; cromaticidad  $a^*$  entre -1,02 y 0,26, y  $b^*$  0,09 y 3,64.

**Tercera.-** Los valores determinados para los parámetros fisicoquímicos en muestras de aceite esencial de limón español concuerdan con los datos recogidos en la bibliografía, correspondientes a campañas anteriores, y no presentan

diferencias destacadas con los valores límites de monografías del aceite esencial de limón de otras procedencias.

**Cuarta.-** La determinación de la densidad del aceite esencial de limón puede realizarse de manera rápida y fiable mediante la aplicación de un densímetro electrónico basado en la variación de la frecuencia de un circuito oscilante.

**Quinta.-** El valor del índice CD del aceite esencial de limón de España, está comprendido entre 0,332 y 0,668, situándose la mayoría de los valores en el rango de 0,39 a 0,56, similar al determinado para aceites de otros orígenes.

Se propone además un sencillo programa en lenguaje BASIC para la valoración de dicho índice, que sustituye al método gráfico en papel semilogarítmico.

**Sexta.-** Mediante la aplicación de tres columnas diferentes (OV-101, HP-5 y CPWax-52CB) se identifican hasta setenta y cuatro constituyentes en el aceite esencial de limón.

**Séptima.-** La columna OV-101 apolar y la columna HP-5 ligeramente polar ofrecen, en general, una mejor resolución de los componentes del aceite esencial de limón, que la columna CPWax-52CB claramente polar. Por el contrario, esta última columna permite acortar el tiempo necesario para un desarrollo cromatográfico. La columna OV-101 permite el aislamiento del p-cimeno, que eluye solapado con limoneno en la columna HP-5; esta fase estacionaria mejora respecto a la OV-101 la separación de octanal/mirceno y geraniol/acetato de linalilo.

En la columna CPWax-52CB no se alcanzan grandes resoluciones entre acetato de nerilo, bisaboleno y geranial, y resuelve el pico de  $\beta$ -felandreno que no se resuelve en las otras dos columnas.

**Octava.-** Respecto a la evolución de los hidrocarburos terpénicos, el limoneno aumenta notablemente hacia el mes de enero, mientras  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -tuyeno,  $\alpha$ -pineno, cariofileno, bergamoteno, bisaboleno y humuleno presentan un mínimo.

Otros hidrocarburos terpénicos muestran evoluciones diversas, como  $\alpha$ -terpineno y terpinoleno que tienen un máximo hacia enero y otro de menor intensidad hacia mayo, e igualmente sucede con mirceno y *trans*- $\beta$ -ocimeno hacia febrero/marzo y julio respectivamente; otros, en fin, no tienen variaciones de importancia, bien por que se mantengan en una proporción constante, o bien por que su participación es tan baja que sus variaciones son prácticamente desestimables.

El máximo de limoneno coincide con valores del inicio del máximo de citral que se produce entre enero-febrero

**Novena.-** El sabineno no presenta correlación con el resto de los hidrocarburos; presenta correlación inversa con la evolución de la suma de citral más *trans*- $\beta$ -ocimeno. La evolución de geranial y neral no se relaciona con la de ninguno de los demás aldehídos.

**Décima.-** Los alcoholes evolucionan prácticamente todos igual, y su evolución es similar a la de los acetatos de geranilo y nerilo, que poseen una correlación elevada con la inversa de la evolución del limoneno.

**Undécima.-** El análisis del aceite esencial de limón por inyección directa del espacio de cabeza pone de manifiesto que la proporción de los componentes que intervienen en el mismo resulta muy diferente respecto al aceite esencial inyectado directamente (p.ej. limoneno 45-55%,  $\beta$ -pineno 7%...); aumentan  $\alpha$ -tuyeno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, terpineno y p-cimeno y disminuyen las proporciones de citral y de ésteres.

**Duodécima.-** La microextracción en fase sólida del espacio de cabeza de aceites esenciales de limón, no resulta especialmente adecuada como determinación cuantitativa, ya que al ser un método de extracción, actúa seleccionando del total del espacio de cabeza determinados componentes por los que presenta mayor o menor afinidad, proporcionando una menor variedad de matices respecto al espacio de cabeza directo.

---

*Los resultados de la presente memoria permiten definir algunas características del aceite esencial de limón producido en España, que se recogen en el Anexo I como una aportación a una futura norma de calidad.*

## **BIBLIOGRAFÍA**



ACREE,T.E.; NISHIDA,R. y FUKAMI,H. 1985. Oidor thresholds of the stereoisomers of methyl jasmonate. J.Agric. Food Chem.26, 187-191.

ALBEROLA,J. e IZQUIERDO,L.J. 1978. The volatile fraction of orange juice. Method for extraction and study of composition. In Flavor of foods and beverages. Chemistry and Technology. Ed. George Charalambous y Gerorge E. Inglett. Academic Press New York.

AENOR. UNE 153. 1984. Aceites esenciales. Determinación de la miscibilidad en etanol.

AENOR. UNE 159. 1984. Aceites esenciales. Determinación del poder rotatorio.

AENOR. UNE 225. 1984. Aceites esenciales. Cromatografía en fase gaseosa. Método general para columnas capilares.

AENOR. PROPUESTA UNE 84-402. 1992. Aceites esenciales. Determinación de la densidad absoluta y la densidad relativa.

AFNOR. NFT 75-112. 1977. Détermination de l'indice de réfraction.

AFNOR. NFT 75-113. 1982. Détermination du pouvoir rotatoire.

ANÓNIMO. 1983. The Supelco Reporter. Chromatography and chemical standards news. Vol. II, N°5.



ASHRAE. 1971. Guide and Data Book. American Society of Heating, Refrigeration and Air Conditioning Engineers, Inc., N.Y.

ATKINS,C.D.; WENZEL,F.W.; FEHLBERG,E. y SLATER,L.E. 1950. New evaporator robotized for high output efficiency. Food Ind. 22, 1521-1523.

ATTAWAY,J.A.; DOUGHERTY,M.H.; WOLFORD,R.W. y EDWARD, G.J. 1966. Techniques for estimating the relative concentrations of flavor constituents in orange essence. Report of the Florida Citrus Commission/University of Florida, Lake Alfred.

ATTAWAY,J.A.; PIERINGER,A.P. y BARABAS,L.J. 1967. The origin of citrus flavor components. III. A study of the percentage of variations in peel and leaf oil terpenes during one season. Phytochemistry 6, 25-32.

AUDICANA,M. y BERNAOLA,G. 1992. Dermatitis de contacto ocupacional por aceite esencial de limón. Hospital de Galdácano. Sección de Alergología. Vizcaya.

BAALIOUAMER,A. y MEKLATI,B.Y. 1980. Analyse qualitative par chromatographie gaz-liquide sur colonnes capillaires de verre de type WCOT des huiles essentielles d'écorce de fruit et de petitgrain du citronnier Eureka' cultivé en Algérie. Fruits. Vol.35,n°9.

BADINGS,H.T.; DE JONG,C. y DOOPER,R.P.M. 1985. Automatic system for rapid analysis of volatile compounds by purge and cold-trapping/capillary gas chromatography. H.R.C. and C.C. 8:755-760.

BAERHEIM,A. y SCHEFFER,J.J.C. 1985. Essential oils and aromatic plants.

BANGS,W.E. y REINECCIUS,G.A. 1990. Characterization of selected materials for Lemon Oil Encapsulation by spray Drying. J. Food Sci. Vol 55, n°5. 1356-1358.

BARTHOLOMEW,E.T. y SINCLAIR,W.B. 1945. Apparatus for the determination of volatile citrus oil. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 28, 339-344.

BARTHOLOMEW,E.T. y SINCLAIR,W.B. 1951. The Lemon Fruit. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.

BELLANATO,J. e HIDALGO,A. 1971. Infrared analysis of essential oils. Heiden & Son. Ltd. London.

BLAIR,J.S.; GODAR,E.M.; MASTERS,J.E. y RIESTER,D.W. 1952. Exploratory experiments to identify chemical reactions causing flavor deterioration during storage of canned orange juice. II. Incompatibility of peel-oil constituents with the acid juice. Food Res. (17): 235-260.

BENNET,H. 1974. Concise Chemical and technical dictionary. 3<sup>rd</sup> Edition. Chemical Publishing Co. New York.

BENINCASA,M.; BUIARELLI,F.; CARTONI,G.P. y COCCIOLI,F. 1990. Chromatographia, 30, 271.

BOCCO,A.; CUVELIER,M.E.; RICHARD,H. y BERSET,C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J.Agric. Food Chem.*46, 2123-2129.

BOCCO,A.; CUVELIER,M.E.; RICHARD,H. y BERSET,C. 1998. Antioxidant activity of phenolic compounds measured by an accelerated test based on citronellal oxidation. *Sci. Aliments.* 18, 13-24.

BOELEN,S,M. y JIMENEZ,R. 1989. The chemical composition of some mediterranean citrus oils. *J. Essent. Oil Res.* 1, 151-159.

BOMBEN,J.L.; KITSON,J.A. y MORGAN,A.I.Jr. 1966. Vacuum stripping of aromas. *Food Technol.* 20, 1219-1222.

BOMBEN,J.L.; GUADAGNI,D.G. y HARRIS,J.G. 1969. Aroma concentration for dehydrated foods. USDA/ Western Utilization Research & Development, Albany, CA.

BOTT,E.W. y SCHÜTLER,P. 1989. Centrifuges, decanters and processing lines for the citrus industry. Technical-Scientific Documentation. (Westfalia).

BOWEN,E.R. 1975. Potential by-products from microbial transformation of d-limonene. Florida State Horticultural Society.

BRADDOCK,R.J. y KESTERSON,J.W. 1976. Quality analysis of aldehydes, esters, alcohols and acids from citrus oils. *J. Food Sci.* 41, 1007-1010.

BRADDOCK,R.J. 1982. Ultrafiltration and Reverse Osmosis recovery of limonene from citrus processing waste streams. J.Food Sci., 47, 946.

BRADDOCK,R.J. 1986. MSDA data summary for limonen and citrus oils. 37<sup>th</sup> Annual Citrus Processors Meeting. CREC/IFAS, Lake Alfred, Fl.

BRADDOCK,R.J.; TEMELLI,F. y CADWALLADER,K.R. 1986. Citrus essential oils. A dossier for material data safety sheets. Food Technol., 40 (11), 114-116.

BUCKHOLZ,L.Jr. y DAUN,H. 1978. Instrumental and sensory characteristics of orange oil oxidation. J.Food Sci. 43, 535-539.

BURKE,J.H. 1967. "The Citrus Industry". Reuther, Webber y Batchelor Eds. University of California:Berkeley, CA, VolI. Chap2.

BUSHMAN,R.C. y HOLBROOCK,F.K. 1978. Apparatus for extracting oil from the rind of whole citrus fruits. U.S. Patent Number 4.070.959. Jan.31.

CALVARANO,I.; FERLAZZO,A. y DI GIACOMO,A. 1979. Sulla composizione cumarinica e furocumarinica dell'essenza di bergamotto. Essenze-Deriv. Agrum. 59, 407.

CALVARANO,I y DI GIACOMO,A. 1984. Chemical composition of terpeneless lemon oil. Essenze Deriv. Agrum. 54, 145-151.

CALVARANO,M. y DI GIACOMO,G. 1984. El “comminuted” (triturado de citrus) un producto discutible. *Essenze Deriv. Agrum.* 54, 200-219.

CALVARANO,M.; CALVARANO,I. y DI GIACOMO,A. 1988. Caratteristiche e composizione dell’ essenza di limone prodotta industrialmente in Italia da frutti “invernali”. *Essenze Deriv. Agrum.* Anno LVIII. Oct-Dic n° 4.

CARMONA,P.; BELLANATO,J. e HIDALGO,A. 1974. Estudio de aceites esenciales de limón. I. Análisis por espectroscopía infrarroja. *A.T.A.* Vol.14, n° 1, marzo.

CARMONA,P.; BELLANATO,J. e HIDALGO,A. 1974. Estudio de aceites esenciales de limón.II. Proceso de envejecimiento. *A.T.A.* vol. 14, n° 3, Sept.

CARTER,B.A. 1993. Lemon and Lime juices. In *Fruit Juice Processing Technology*. Nagy, Chen & Shaw Editors. Ag. Science, Inc. Auburndale, Fl.

CARTONI,G.P.; GORETTI,G.; MONTICELLI,B. y RUSSO,M.V. 1986. Evaluation of capillary gas chromatographic columns in series. Analytical application to lemon oil. *J. Chromatog.* 370, 93-101.

CHAMBLEE,T.; CLARCK,C.Jr.; BREWSTER,G.; RADFORD,T. y IACOBUCCI,G. 1991. Quantitative analysis of the volatile constituents of lemon peel oil. Effects of silica gel chromatography on the composition of its hydrocarbon and oxygenated fractions. *J. Agric. Food Chem.*39, 162-169.

CHALCHAT,J.; GARRY,R.Ph.; MICHET,A. y LECOMTE,E. 1992. Hydroborations of some monoterpenes and sesquiterpenes from essentials oils. *Flavour & Fragrance Journal* Vol.7. 107-110.

CHEN,C. 1982. Citrus evaporator technology. Presentation to American Institute of Chemical Engineering, Orlando, FL.

C.LA.M. Sezione Italiana. 1985. L'innovazione tecnologica e gestionale per la competitività dell' agromicoltura italiana. *Ess. Deriv. Agrum. L*, 165.

CLARK,B. y CHAMBLEE,T. 1992. Acid-catalyzed reaction of citrus oils and other terpene-containing flavors. In *Off-flavors and beverages*. Ed. Charalambous, G. Elsevier Science Pub. New York, NY. pp.229-285.

CLARK,R. y CRONIN,D. 1975. The use of activated charcoal for the concentration and analysis of headspace vapours containing food aroma volatiles. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1615-1624.

COOK,R. 1963. High temperature short time evaporation. *Trans. Citrus Eng. Conf. Florida Sec. ASME*, Lakeland, FL.

COLL,L. 1992. Posibilidades de tratamiento enzimático en la recuperación industrial del aceite esencial de limón. Tesis de Licenciatura. Murcia

COLL,L.; SAURA,D.; RUIZ,M.P.; ROS,J.M.; CÁNOVAS,J.A. y LAENCINA,J. 1995. Viscometric control in the enzymatic extraction of citrus peel oils. *Food Control*. Vol.6, nº3, 143-146.

COMMISSION DE NORMALISATION DU SYNDICAT NATIONAL DES FABRICANTS ET IMPORTATEURS D'HUILES ESSENTIELLES ET PRODUITS AROMATIQUES NATURELS DE GRASSE. 1959. Méthodes d'analyse et constantes analytiques des huiles essentielles. XII ed.

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, AGRICULTURA Y AGUA DE LA REGIÓN DE MURCIA. 1998. Estadística Agraria de Murcia. 1996-1997.

COTRONEO,A.; DUGO,G. y LICANDRO,G. 1983. Sulla genuinità delle essenze agrumarie, Nota IV, Individuazione di aggiunte di citral di origine naturale agli oli essenziali di limone mediante gascromatografia ad alta risoluzione. *Essenze Deriv. Agrum.* 53, 291.

COTRONEO,A.; VERZERA,A.; SALVO,F. y DUGO,G. 1984. Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota VII- Caratteristiche delle essenze di limone "Interdonato". *Essenze Deriv. Agrum.* 1, 49-61.

COTRONEO,A.; VERZERA,A.; ALFA,M. y DUGO,G. 1985. Sulla genuinità delle essenze agrumarie, Nota XI. Osservazioni sulla determinazione della quantità totale di composte carbonilici (citral) negli oli essenziali di limone. *Rivista Soc. Ital. Sci. Aliment.*, 14, 447-452

COTRONEO,A.; DUGO,G.; LICANDRO,G.; RAGONESE,C. y DI GIACOMO,G. 1986. On the genuineness of citrus essential oils. Part. XII. Characteristics of Sicilian lemon oil produced with the FMC extractor. *Flavour and Fragrance Journal*, 1, 125-134.

COTRONEO,A.; VERZERA,A.; LAMONICA,G.; DUGO,G. y LICANDRO,G. 1986. On the genuineness of citrus essential oils. Part.X. Research on the composition of essential oils produced from sicilian lemons using “pelatrice” and “sfumatrice” extractors during the entire 1983/1984 production season. Flavour & Fragrance Journal, 1, 69-86.

COTRONEO,A.; STAGNO D’ALCONTRES,I. y TROZZI,A. 1992. On the genuineness of citrus essential oils. Part XXXIV. Detection of added reconstituted bergamot oil in genuine bergamot essential oil by high resolution gas chromatography with chiral capillary columns. Flavour & Fragrance J. 7, 15.

CROCKER,D. y PROTCHETT,D. 1985. Improved encapsulated citrus oils, modified matrix increases moisture resistance. Food Technol. 32 (1), 36-39.

CULTRERA,R.; BUFFA,A. y TRIFIRÒ,E. 1954. L’analisi spettrofotometrica nella valutazione della qualità delle essenze di agrumi. Conserve Deriv.Agrum. 3, 5.

DAGNINO,M.; BIGLIARDI,D.; BOLZONI,L. y GHERARDI,S. 1984. Residui di antiparassitari nella frutta destinata al consumo diretto e alla trasformazione industriale. Industria Cons. 59, 213.

DETHMERS,A. 1981. Sensory testing guide for panel evaluation of foods and beverages. Food Technol. 35 (11), 50-59.



DICKENSON,C. Centrifuges. 1987. Types of Separator. Filter and Filtration Handbook. The Trade & Technical Press Limited. Surrey. England. Ed.2<sup>nd</sup>. pp. 255-276.

DI GIACOMO,A. 1973. Gli oli essenziali degli agrumi. Riv. It. Ess. Prof. Piante offi. 3, 156.

DI GIACOMO,A. y CALVARANO,M. 1973. L'esame UV delle essenze di limone per il controllo della genuinità. Essenze Deriv. Agrum, 43, 143.

DI GIACOMO,A. 1974. Gli Oli Essenziali degli agrumi. 2<sup>ed.</sup>, Riv.It. E.P.P.O.S., Milano.

DI GIACOMO,A. 1987. Sulla trasformazione industriale degli agrumi. Staz. Sper. Ind. Ess. Der. Agr., Reggio Calabria.

DI GIACOMO,A.; RAPISARDA,P. y SAFINA,G. 1992. L'industria dei derivati agrumari. Staz. Sper. Ind. Ess. Der. Agr., Reggio Calabria.

DI GIACOMO,A. y MINCIONE,B. 1994. Gli olii essenziali agrumari in Italia. Sottoprogetto 4, monografia raisa n°3. Laruffa Editore.

DOUGHERTY,M. 1968. A method for measuring the water soluble volatile constituents of citrus juice and products. Food Technol. 22 (11), 1145.

DROUET,S. 1982. Contribution a l'étude d'une huile essentielle de citron de Côte d'Ivoire et au controle des medicaments aromatisés au citron. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur. Nantes.

DUGO,G.; LICANDRO,G.; COTRONEO,A. y DUGO,G. 1983. Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota I. Caratterizzazione di essenze di limone Siciliane. *Essenze Deriv. Agrum.* 53, 173-217.

DUGO,G.; LICANDRO,G.; COTRONEO,A. y DUGO,G. 1983. Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota II. Individuazione di aggiunta di essenze ottenuti per distillazione alle essenze di limone estrate a freddo. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 53, 218-257.

DUGO,G.; COTRONEO,A.; LICANDRO,G. y DUGO,G. 1983. Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota III. Individuazione di aggiunte di citral ottenuti per sintesi agli olii essenziali di limone mediante gascromatografia ad alta risoluzione. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 53, 258.

DUGO,G.; COTRONEO,A.; LICANDRO,G. y VERZERA,A. 1984. Sulla genuinità delle esenze agrumarie. Nota VIII.- Caratterizzazione di essenze di mandarino. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 54, 62-83.

DUGO,G.; SALVO,F.; SITTA,M. y DI BELLA,G. 1990. Sulla presenza di residui pesticidi organofosforici negli olii essenziali di limone estratti con diverse tecnologie industriali. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 60, 428.

DUGO,G.; FAMÀ,G. y STAGNO D'ALCONTRES,I. 1992. Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota XLII. Determinazione di pesticidi organofosforici con rivelatore a fiamma fotometrica. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 62, 127.

DÜRR,P. y SCHOBINGER,U. 1981. The contribution of the some volatiles to the sensory quality of the apple and orange juice odour. In Flavour '81. 3rd Weurman Symposium. Proceedings of the International Conference, Munich April 28-30. Ed. Peter Schreier. Walter de Gruyter. Berlin. New York.

DÜRR,P.; SCHOBINGER,U. y MALDVOGER,R. 1981. Aroma quality of orange juice after filling and storage in sfof packages and glass bottles. *Lebensm.Verpackung*. 20: 91-93.

EOA: Book of standards and specifications. Essential Oil Ass. Of USA Inc. New York.

FELLERS,P.J. 1980. Problems in sensory evaluation of citrus products. In *Citrus Nutrition & Quality*. Nagy & Attaway Editors. ACS Symp. Series 143. American Chemical Society, Washington, D.C.

FENAROLI,G. 1963. *Sostanze aromatiche naturali*. Hoepli, Milano.

FERNANDEZ DE SIMÓN,B.; PEREZ-ILZARBE,J.; HERNANDEZ,T.; GOMEZ-CORDOBES,C. y ESTRELLA,I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1531-1535.

FLEISHER,A.; BIZA,G.; SECORD,N. y DONO,J. 1987. UltraTtech Citrus concentrates. A new series of deterpenified citrus oils. *Perfum. Flav.*, 12(2)57-61.

FOOD CHEMICAL CODEX. 1981. National Academic Press. Washington, D. C. 3<sup>rd</sup> Ed.

FOOD MACHINERY CORPORATION (FMC). 1979. A process for determining the efficiency of C.P. citrus oils recovery systems. FMC Citrus machinery Division, Lakeland, Fl.

FMC.1980. The FMC oil recovery system. Tech. Bull.

FMC.1980. FMC citrus juice extractor. Selection of extractor settings for optimum juice yield and quality. Tech. Bull., 4 /3/

FMC.1981. The effect of water usage, finisher pressure and enzyme treatments of the rich emulsion, on the aldehyde content of Valencia orange oil. The Citrus Industry Magazine. Aug.

GONZALEZ,J.; JAMIN,E.; REMAUD,G.; MARTIN,I.; MARTIN,G.G. y MARTIN,M.L. 1998. Authentication of lemon juices and concentrates by a combiner multi-isotope approach using Snif-NMR and IRMS. J.Agric. Food Chem 46, 2200-2205.

GORETTI,G.; RUSSO,M.; LIBERTI,A. y BELMUSTO,G. 1986 Valutazione gascromatografica degli olii essenziali mediante campionamento dello spazio di testa. Essenze Deriv. Agrum. 56, 345-358.

GRAUMLICH,T.R.; MARCY,J.E. y ADAMS,J.P. 1986. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. J.Agric. Food Chem. 34, 402 - 405.

GRIERSON,W. y BEN-YEHOSHUA,S. 1986. Storage of citrus fruits. In Fresh citrus fruits. Ed. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, S. AVI: Westport, CT, pp. 479-501.

GRUYTER,W. 1985. Progress in essential oil research. Proceedings of the International Symposium on Essential Oils.

GUENTHER,E. 1949. The essential oils. Vol I. Nostrand Co.N.Y.

GUNTHER,V.H. 1968. Investigations of lemon oils with the help of gas chromatography and infrared spectroscopy. Dtsch.Lebensm. Rundsch. 64, 104-111.

HANNEGUELLE,S.; THIBAUT,J.; NAULET,N. y MARTIN,G. 1992. Authentication of essential oils containing linalool and linalyl acetate by isotopic methods. J. Agric. Food Chem.40,81-87.

HARDING,P.L. 1964. Forecasting quality and pounds-solids in Florida oranges. U.S. Agric.. Mark. Serv. AMS-533.

HENDRICKSON,R. y KESTERSON,J.W. 1965. By-products of Florida citrus. Composition technology and utilization. Flo.Expt. Sta. Bul. 698, 1-76.

HENDRIX,C.M.Jr. 1984. Essence strength and influence. Citrus Central Inc., Orlando, Fl.

HENDRIX,C.M.Jr. y REDD,J.B. 1990. Chemistry and technology of citrus juices and by-products in production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. D.Hicks (Editor). Van Nostrand Reinhold, New York.

HOLBROOCK,F.K. y BUSHMAN,R.C. 1981. Whole fruit peel oil extractor. United States Patent N° 4.257.320. FSTA Abstract 12J1863.

HOUSTON,C.K. y JI,H. 1991. Optimization of the analytical supercritical fluid extraction of cloves via an on-column interface to an ion trap GC/MS system. J.Agric.Food Chem.39,1229- 1233.

HUET,R. 1969. The aroma of citrus juices. Fruits 23, 453-471.

HUET,R. 1981. VIII<sup>e</sup> Congrès international des huiles essentielles Cannes-Grasse, 12-17 octobre 1980. Fruits. Vol 36, 53 - 55.

HUET,R. 1991. Les Huiles Essentielles d'Agrumes. Fruits, 46, 541.

HUNTER,G.L.K. y BROGDEN, W.B.JR. 1965. Analysis of the terpene and sesquiterpene hydrocarbons in some citrus oils. J.Food Sci.30, 383-387.

IFRA (International Fragrance Association). 1991. Code of Practice: Lemon oil cold pressed.

IKEDA,R.M.; STANLEY,W.; VANNIER,S.H y ROLLE,L.A. 1961. Deterioration of lemon oil. Formation of p-cymene from gamma-terpinene. Food Technol. 15, 379-380.

IKEDA,R.M.; ROLLE,L.A.; VANNIER,S.H. y STANLEY,W. 1962 a. Lemon oil composition. Isolation and identification of aldehydes in cold-pressed Lemon oil. J.Agric. Food Chem. 10, 98-102.

INTERCITRUS (Interprofesional Citrícola Española). 1999. Balance de Cosechas y Datos de Comercialización.

ISO 1.242: Huiles essentielles. 1973. Détermination de l'indice d'acide.

ISO 280: Huiles essentielles. 1976. Détermination de l'indice de réfraction.

ISO.4.096: Huiles essentielles. 1978. Evaluation de la teneur en alcools libres par détermination de l'indice d'ester après formylation a froid.

ISO 4.715: Essential oils. 1978. Quantitative evaluation of residue on evaporation.

ISO 709: Huiles essentielles. 1980. Détermination de l'indice d'ester.

ISO 4.735: Huiles essentielles. 1981. Détermination de la valeur CD par analyse spectrophotometrique dans l'ultraviolet.

ISO 279: Essential oils. 1981. Determination of relative density at 20°C.

ISO 592: Huiles essentielles. 1981. Détermination du pouvoir rotatoire.

ISO 855: Essential oils. 1981. Oil of lemon Italy obtained by expression.

ISO 875: Huiles essentielles. 1981. Evaluation de la miscibilité à l'éthanol.

ISO 1.279: Huiles essentielles. 1984. Détermination de l'indice de carbonyle- Méthode au chlorure d'hydroxylammonium.

ISO 7.609: Huiles essentielles. 1985. Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capil-laire. Méthode générale.

ISO 8.432: Huiles essentielles. 1987. Analyse par chromatographie liquide sous pression. Méthode générale.

ISO 8.899: Essential oils. 1991. Oil of lemon petitgrain [ *Citrus limon* (Linnaeus) N.L. Burman].

IWATA,I. y YAMAMOTO,N. 1978. Eiyo to Shokuryo. 31, 389.

JENNINGS,W. y SHIBAMOTO,T. 1980. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glas capillary gas chromatography. Ed. Academic press. Inc. London. Ltd, London. NW1 7DX, (UK).

JOHNSON,J.D. y VORA,J.D. 1983. Natural citrus essence. Food Technol. 37, 92-93.

JONES,H.A. 1968. Essencce - how they developed. Citrus World. 4(9), 18-24.



JORDÁN,MJ. 1999. Constituyentes Aromáticos del zumo de naranja. Efecto del Procesado Industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

KANNER,J. y SHAPIRA,N. 1989. Oxygen and metal-ion dependent nonenzymatic browning of grapefruit juice. In Quality Factors of Fruits and Vegetables (Ed. J.J. Jend). An. Chem. Soc. Sym. Ser. 405: 55-64.

KEENAGHAN,J.B. 1986. Complex flavor analysis with the ion trap detector. Instrumentation Research 2 (1), 60-65.

KEFFORD,J.F.; MCKENZIE,H.A. y THOMPSON,P.C.O. 1959. Effects of oxygen on quality and ascorbic acid retention in canned and frozen orange juices. J. Sci. Food Agric. 10: 51-63.

KEFFORD,J.F. y CHANDLER,B.V. 1970. The chemical constituents of Citrus Fruits. Academic Press, New York.

KEKILIDZE,N.A. y BERADZE,L.V. 1974. Essential oils of fruits of some citrus plants growing in the Georgian SSR. Paper n° 104, Vith International Essential Oil Congress. San Francisco.

KELLY,E.J. y SCHWARZ,H.W. 1955. Role of the evaporator in the production of frozen concentrates. Food Technol.9, 335-340.

KERN,A.B. 1996. Citrus oil flavor derivatives: A Retrospective. International Conference on Aromas and Essential Oils. IFEAT. Israel 13-17 Octubre.

KESTER, J.J. y FENNEMA, O.R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.* 40(12):47-59.

KESTERSON, J.W. y HENDRICKSON, R. 1958. Finding the best lemon for Florida -a report for progress. III. Evaluation of coldpressed Florida lemon oil and lemon bioflavonoids. *Proc. Florida State Hort.Soc.* 71, 132-140.

KESTERSON, J.W.; HENDRICKSON, R. y BRADDOCK, R.J. 1979. Brown oil extractor. *Perfumer & Flavorist.* 4(4), 9.

KESTERSON, J.W.; HENDRICKSON, R. y BRADDOCK, R.J. 1971. Florida Citrus Oil. *Fla.Agric.Exp.Stn. Bull.* 749. December .

KESTERSON, J.W. y BRADDOCK, J. 1976. By Products and Specialty Products of Florida Citrus. *Fla.Agric.Exp.Stn. Bull.* 784

KICHNER, J.G. y MILLER, J.M. 1957. Volatile water-soluble and oil constituents of Valencia orange juice. *J.Agric. Food Chem.* 5, 283-291.

KIMBALL, D.A. 1991. *Citrus Processing: Quality Control and Technology.* Van Nostrand Reinhold, New York.

KIMURA, K.; NISHIMURA, H.; IWATA, I. y MIZUTANI, J. 1983. Deterioration mechanism of lemon flavor. 2. Formation mechanism of Off - Odor substances arising from Citral. *J.Agric.Food Chem.* 31, 801 - 804.

KOKETSU,M.; MAGAIHAES,M.; WILBERG,V. y DONALISO,M.G. 1983. Oleos essenciais de frutos citricos cultivadas no Brazil. Bol. Pesqui EMBRAPA Cent. Technol. Agric. Aliment. (7), 21.

KOK,M.F.; YONG,F.M. y LIM,G. 1987. Rapid extraction method of reproducible analysis of aroma volatiles . J.Agric Food Chem. 35, 779 - 781.

KONDJOYAN y BERDAGUE. 1996. A compilation of Relative Retention Indices for the analysis of aromatic compounds. Laboratoire Flaveur.

KOPELAND,I.J.; MEYDOW,S. y WILMERSDORF,P. 1977. Freeze drying encapsulation of water soluble citrus aroma. J.Food Technol. 12 (1) 65-72.

KÖSTER,E.P. 1990. Study of perception: taste and smell. Perfum.Flavor. 15(Mar/Apr), 1-12.

KURATA,T. y SAKURAI,Y. 1967. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymatic browning reaction. II. Agric. Biol. Chem. 31: 170-177.

LAENCINA,J. 1969. Estudio del aceite esencial de limón. Tesis Doctoral. Murcia .

LAENCINA,J. 1970. El limón Murciano. Premio Hermandad Sindical de Murcia.

LAENCINA,J. y CARPENA,O. 1974. Perspectivas de la transformación industrial del limón español. Rev. Las Ciencias, XXXIX (1), 40-49.

LAENCINA,J.; GUZMÁN,G. y CANO,J. 1979. Coumarins dans l'essence de citron espagnol. Journées Internationales d' Étude. Gropue Pholyphenols. Logroño.

LAENCINA,J.; CALVARANO,M. y MICALI,G. 1980. El aceite esencial de Limón Verna. Ess. Deriv. Agrum., L (4), 311-323.

LAENCINA,J. 1983. Derivados de la transformación industrial del limón y sus aplicaciones. Simposio Alfa Laval de Zumos, Cremogenados y Mermeladas. Murcia.

LAENCINA,J.; GORETTI,G.; MELENDRERAS,F.A. y FLORES,J. 1986. Kaolin PLOT columns in the analysis of citrus lemon essential oils. An. Bromatol., 37, 315-326.

LAENCINA,J.; NÚÑEZ,E.; NÚÑEZ,J.M. y DE GODOS,A. 1988. Evolution of volatile constituents in single and concentrated juices of lemon. En Proceedings of the sixth International Citrus Congress. Tel Aviv, Israel, 6-11 de Marzo.

LAENCINA,J.; JORDÁN,M.J.; MUCCI,B. y ROS,J.M. 1999. Volatile components in orange juice by headspace solid-phase microextraction. Annals of the 22<sup>nd</sup> IFU Symposium. Paris. 15-19 Marzo.

LAWRENCE,B.M. 1985. A review of the world production of essential oils. *Perfum. Flavor.* 10 (5), 1,3-10, 12-16.

LAWRENCE,B.M. 1989. Lemon Oil. *Perfumer & Flavorist.* Vol 14, July-August .

LAWRENCE,B.M. 1992. Progress in essential oils. *Perfumer & Flavorist.* Vol.17, 45-51. Jan-Feb.

LEE,H.S. y NAGY,S. 1988 a). Relationship of sugar degradation to detrimental changes in citrus juice quality. *Food Technol.* 42:91-97.

LEE,H.S. y NAGY,S. 1988 b). Quality changes and non-enzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci.* 53 (1): 168-172 & 180.

LEE,H.S. y NAGY,S. 1990. Formation of 4-vinyl Guaicol in adversely stored orange juice as measured by an improved HPLC method. *J. Food Sci.* 55(1): 162-166.

LEE,H.S. y NAGY,S. 1996. Chemical degradative indicators to monitor the quality of processed and stored citrus products. *American Chemical Society, Chapter 9.*

LIBERTI,A.; CARPENA,O.; LAENCINA,J. y GORETTI,G. 1973. Estudio de las características del aceite esencial de limón español. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia -Valencia.

LIBERTI,A.; GORETTI,G.; LAENCINA,J. y RUSSO,M.V. 1980. Componenti a caratteri acido nell residuo della produzione degli olii di limone. III Congresso della Divisione di Chimica Analitica Italiana. Siena.

LICANDRO,G.; DUGO,G.; LAMONICA,G. y COTRONEO,A. 1984. Sulla genuinità delle essenze agrumarie Nota VI -Caratterizzazione di essenze di limone siciliano Parte II. Ess. Deriv. Agrum., 54, 22-48.

LIZZOTE,P.A. y SHAW,P.E. 1992. Flavor volatiles in Valencia orange and their quantitative changes caused of vacuum infiltration of butanal. Lebensm-wiss. u. Technol. 25: 82-85.

LOCK,O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial.

LODGE,N. y WILKINSON,S.A. 1977. Additional information on the physical and chemical properties of New Zealand lemon peel oil. New Zealand J. of Sci. 20(4), 461-463.

LUND,E.D.; KIRKLAND,C.L. y SHAW,P.E. 1981. Methanol, Ethanol and Acetaldehyde contents of citrus products. J. Agric. Food Chem. 29, 361-366.

MAARSE,H. y VISSCHER,C.A. 1989. Volatile compounds in food qualitative and quantitative data. Volume I. Lemon oil. TNO-CIVO. Food Analysis Institute. The Netherlands.

MARAULJA,M.D. y DOUGHERTY,M.H. 1973. Effect of maturity, variety and processing on Chloramine-T values and total aminoacid content of orange juice. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 88, 339-370.

MARIACA,R. y BOSSET,J.O. 1997. Instrumental analysis of volatiles flavour components in milk and dairy products. Le Lait (77): 13-40.

MARSILI,R.T. 1986. Measurement volatiles and limonene oxidation products in orange juice by capillary GC. LC. GC 4: 359.

MARSILI,R.T. 1997. Techniques for analyzing food aroma. Ed. Ray Marsili. Dean Foods Company Rockford, Illinois. ISBN 0-8247-9788-4.

MASADA,Y. 1973. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. Halsted Press Book. John Wiley & Sons.Inc.

MATTHEWS,R.F. y BRADDOCK,R.J. 1987. Recovery and application of essential oils from oranges. Food Technol. Jan., 57-61.

MAZZA,G. 1987. Identificazione di nuovi composti negli oli agrumari mediante GC/MS. Essenze Deriv. Agrum. 57, 19-33.

McDANIEL,M.; MIRANDA-LÓPEZ,R.; WATSON,B., MICHEALS,N. y LIBBERY,M. 1990. Pinot noir aroma: a sensory gas/chromatographic approach. Flavors and off-Flavors (Ed. G. Charalambous), Elsevier, Amsterdam, p.23.

McDOWELL,L.; MOORE,E. y ATKINS,C. 1948. Method of preparing full-flavored fruit juice concentrate. U.S. Pat.2.453.109 N° 9.

McHALE,D. y SHERIDAN,J.B. 1988. Detection of adulteration of cold-pressed Lemon Oil. Flavour and Fragrance journal. Vol.3, 127-133.

McHALE,D. y SHERIDAN,J.B. 1989. J. Essent. Oil Res. 1, 139.

McHUGH,M. y KRUKONIS,V. 1986. Supercritical fluid extraction. Butterworths, Boston, USA.

McLEOD,A.J.; McLEOD,G. y SUBRAMANIAN,G. 1988. Volatile aroma constituents of orange. Phytochemistry. 20 (7): 2185-2188.

MEDINA,I. y MARTÍNEZ,J.L. 1997. Dealcoholisation of cider by supercritical extraction with carbon dioxide. J. Chem. Tech. Biotechnol. 68: 14-18.

MELENDRERAS,F.A.; LAENCINA,J.; FLORES,J. y GUZMÁN,G. 1985. Aceites esenciales de frutos de variedades de limonero (*Citrus limon* L.Burm.f.). Rev. Agroquim. Technol. Aliment. 25, 133-143.

MELENDRERAS,F.A.; LAENCINA,J.; ORTUÑO,A., y GUZMÁN,G. 1986. Content of essential oil during the growth and development of Verna lemon fruits. An. Edafol. Agrobiol. 45, 797-816.



MELENDRERAS,F.A.; LAENCINA,J.; FLORES,J., y GUZMÁN,G. 1988. Influencia del portainjerto sobre el aceite esencial de frutos de limonero Verna. *Agrochimica*, 30, 311-324.

MELENDRERAS,F.A.; LAENCINA,J.; FLORES,J. y GUZMÁN,G. 1988. Efecto de la madera intermedia sobre el aceite esencial de limón Verna. *Agrochimica*, 32, (2), 1-26.

MINCIONE,B.; DI GIACOMO,A.; LEUZZI,U. y CRISPO,F. 1991. Prime valutazioni sperimentali sull'applicazione delle tecniche di estrazione con fluidi ipercritici all'essenza di bergamotto. C.N.R. RISA. Volterra.

MINCIONE,B.; DI GIACOMO,A.; LEUZZI,U.; CRISPO,F.; POIANA,M. y STAGNO D'ALCONTRES,I. 1992. Estrazione dell'essenza di bergamotto con CO<sub>2</sub> supercritica. *Essenze Deriv.Agrum.* 62, 28.

MIYAKE,Y.; YAMAMOTO,K.; MORIMITSU,Y. y OSAWA,T. 1997. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *J.Agric. Food Chem.*45, 4619-4623.

MIYAKE,Y.; YAMAMOTO,K. y OSAWA,T. 1997. Metabolism of antioxidant in lemon fruit by human intestinal bacteria. *J.Agric. Food Chem* 45, 3738-3742.

MOLEYAR,V. y NARASIMHAM,P. 1987. Detoxification of essential oil components ( Citral and menthol ) by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* . *J.Sci.Food Agric.* 39, 239 - 246.

MORRIS,W. 1970. The American Heritage Dictionary of the English Language. American Heritage Publication Co. & Houghton mifflin Co. Boston, MA.

MOSANDL,A. 1995. Enantioselective capillary gas-chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils. Food Rev. Int. 11 (4): 597-664.

MOSANDL,A. y JUCHELKA,D. 1997. Advances in the authenticity assessment of citrus oils. J. Essential oil Res., 9, 5-12. Jan-Feb.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1972. Analysis of flavor constituents from lemon and lime essence. J. Agric. Food Chem. 20, 1029-1030.

MOSHONAS,M.G, SHAW,P.E. 1984. Direct gas chromatographic analysis of aqueous citrus and other fruit essences. J. Agric. Food Chem. 32, 526-530.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1987 . Quantitative analysis of orange juice flavor volatiles by direct-injection gas chromatography. J. Agric. Food Chem. 35, 161-165.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1989. Flavor evaluation and volatile flavor constituents of stored aseptically packaged orange juice. J. Food Sci. 54 (1): 82-85.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1990. Flavor and compositional comparison of orange essences and essence oil produced in the United States and in Brasil. J. Agric. Food Chem. 38: 799-801.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1992. Comparison of static and dynamic headspace gas chromatography for quantitative determination of volatile orange juice constituents. Lebensm.-Wiss. u-Technol. 25:236-239.

MOSHONAS,M.G.; SHAW,P.E. y BUSLIG,B.S. 1993. Retention of fresh orange juice flavor and aroma in an aqueous distillate from Valencia orange juice. J. Food Quality. 16: 101-108.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1994. Quantitative determination of 46 volatile constituents in fresh, unspasteurized orange juice using dynamic headspace gas chromatography. J. Agric. Food Chem. (July): 1525-1528.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E.. 1995. Fresh orange juice flavor: A quantitative and qualitative determination of the volatile constituents. Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. Ed. G.Charalambous. Elsevier Science B.V.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1997. Flavor and chemical comparison of pasteurized and fresh Valencia orange juices. J. Food Quality. 20: 31-40.

MOSHONAS,M.G. y SHAW,P.E. 1997. Dynamic headspace gas chromatography combined with multivariate analysis to classify fresh and processed orange juices. J. Essent. Oil Res. 9: 133-139.

MOTLAGH,S. y PAWLISZYN,J. 1993. On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography. *Anal. Chem. Acta.* 284: 265-273.

MOULY,P.P.; ARZOUYAN,C.R.; GAYDOU,E.M. y ESTIENNE,J.M. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 42, 70-79.

MOYLER,D.A. y STEPHENS,M.A. 1992. Counter Current deterpenation of cold pressed sweet orange peel oil. *Perfumer & Flavorist*, 17, 37.

MUSSINAN,C.J.; MOOKHERJEE,BD. y MALCOM,G.I. 1979. Isolation and identification of the volatile constituents of fresh lemon juice. 178<sup>th</sup> Meeting of the American Chemical Society, Washington, D. C. 12 Sept.

MUSSINAN,C.J.; MOOKHERJEE,BD. y MALCOM,G.I. 1981. Isolation and identification of the volatile constituents of fresh lemon juice. In *Essential Oils*. Mookherjee, Mussinan (Editors). Allured Publishing Co., Weaton, IL. Pp 199-228.

NAGANUMA,M.; HIROSE,S.; NAKAYAMA,Y.; NAKAJIMA,K. y SOMEYA,T. 1985. A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.* 278, 31-36.

NAGY,S. y RANDALL,V. 1973. Use of Furfural content as an index of storage temperature abuse in commercially processed orange juice. J. Agric. Food Chem. 21: 272-275.

NAIM,M.; STRIEM,B.J.; KANNER,J. y PELEG,H. 1988. Potential of ferulic acid as a precursor to off-flavours in stores orange juices. J. Food Sci. 53 (2): 500-503 & 512.

NAIM,M.; ZEHAVI,U.; NAGY,S. y ROUSSEF,R.L. 1992. Phenolic compounds in food and their effects on health. Vol.1 Ho, C.T., Lee, C.Y., Huang, M.T. Ed. Analitical Chemical Society. pp.180-191.

NAVARRO,F. 1962. Quím. e Ind. 9, 199.

NEUMANN,M. y GARCÍA,N.A. 1992. Kinetics and mechanism of the lighth-induced deterioration of lemon oil. J.Agric.Food Chem.40,957-960.

NISHIDA,R. y ACREE,T.E. 1984. Isolation and characterization of methyl epijasmonate from lemon. J.Agric. Food Chem. 32, 1001-1003.

NISPEROS-CARRIEDO,M.O.; SHAW,P.E. y BALDWIN,E.A. 1990. Changes in volatile flavor components of pineapple orange juice as influenced by the aplication of lipid and composite films. J. Agric. Food Chem. June: 1382-1387.

NJOROGE,S.M.; UKEDA,H.; KUSUNOSE,H. y SAWAMURA,M. 1994. Volatile components of Japanese yuzu and lemon oils. Flavour and Fragrance Journal. Vol.9, 159-166.

NUÑEZ,J.M. 1988. Modificaciones químicas en el limón y derivados durante el procesado el almacenamiento. Tesis Doctoral. CSIC. Murcia.

ODIO,D.C. 1995. Essence recovery system improvements. Gumaco, Inc., Araraquara, São Paulo, Brasil.

ODIO,D.C. y TOPE,W.P. 1989. Gumaco evaporator technology. Araraquara, São Paulo, Brasil.

OOGHE,W.; OOGHE,S.; DETAVERNIER,C. y HUYGHEBAERT,A. 1994. Characterization of orange juice(*C. sinensis*) by flavonone glycosides. J.Agric. Food Chem. 42, 2183-2190.

PADRAYUTTAWAT,A. y TAMURA,H. 1996. A split injection system for the analysis of purge and trap headspace of the volatile components in Citrus Sudachi. J. High Resol. Chrom. 19: 365-369.

PARLIMENT,T.H. 1981. Concentration and fractionation of aromas on reverse -phase adsorbents. J. Agric. Food Chem. 29: 836-841.

PARLIMENT,T.H. 1986. Sample preparation techniques for gas-liquid chromatographic analysis of biologically derived aromas. Biogeneration of aromas pág.34. Ed. Parliment, T.H. and Croteau, R. American Chemical Society, Whashington DC

PARLIMENT,T.H. 1997. Solvent extraction and distillation techniques. In Techniques for analyzing food aroma. pp. 1-26. Edited by Ray Marsili. Dean Foods Company Rockford, Illinois. ISBN 0-8247-9788-4.

PARLIMENT,T.H. y SPENCER,M.D. 1981. Application of simultaneous FID/NPD/FPD detectors in the capillary gas chromatographic analysis of flavors. J. Chrom. Sci. 19:435.

PATTON,S. y JOSEPHSON,D.V. 1957. A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. Food Research. 22:316-318.

PAULSON,D.J.; WILSONS,R.L.; y SPATZ,D.D. 1985. Reverse osmosis and ultrafiltration applied to the processing of fruits juices. In Reverse Osmosis and Ultrafiltration . Ed. S. Sourirajan y T. Matsuura ACS Symposium Series 281, American Chemical Society, Washington, D.C.

PEACOK,V.E. y KUNEMAN,D.W. 1985. Inhibition of the formation of  $\alpha$ -p-dimethylstyrene and p-cymeneol-8 in a carbonated citral-containing beverage system. J.Agric.Food Chem. 33, 330-335.

PELEG,Y. y MANNHEIM,C.M. 1973. Effect of operational variables on citrus aroma recovery using the WURVAC system. I. Model solution. Confructa, 18 (3-4):118-124.

PENNISI,L. y DI GIACOMO,A. 1965. Contributo alla conoscenza delle essenze di limone di alcune cultivar di limone. Riv. It. E.P.P.O.S., 47, 370.

PENTON,Z. 1996. Sample preparation for gas chromatography with solid phase extraction and solid phase microextraction. Draft

in advances in chromatography, volumen 37. Ed. P.R. Brown and E. Grshka, M. Dekker, New York, pp, 205-236.

PEPPARD,T.L. 1999. How chemical Analysis supports flavor creation. Food Technol. Marzo. Vol.53, n°3. 46-51.

PERFETTI,G.A.; JOE,F.LJr.; FAZIO,T. y PAGE,S.W. 1988. Liquid Chromatographic methodology for the characterization of orange juice. J. Assoc. Off Anal. Chem. 71, 469-473.

PHILLIPS,R.J.; WOLSTROMER,R.J. y FREEMAN,R.R. 1981. Dual Channel Analysis of Essential Oils with Fused Silica Capillary Columns. HP. Application Note AN 228-16. Publ.n° 43-5953-1543. (1/81) pp 1-6.

PHILLIPS,R.J. y WOLSTROMER,R.J. 1981. Anthology of Essential Oil Chromatograms. HP. Application Note AN 228-17. Publ.n° 43-5953-1563. (2/81) pp 1-6.

PHILLIPS,R.J. y GRATZFELD-HUSGEN,A. 1984. Sensory evaluation of chromatographic peaks using capillary columns and thermal conductivity detection. Hewlett-Packard Instruments Company Application Note 228-238.

PINDER,A.R. 1960. The Chemistry of the Terpenes. Chapman and Hall.

PINO,J. y DURÁN,M. 1981. Evaluation of aroma deterioration in sweet orange oil on the basis of gas-liquid chromatographic analysis. Proc. Int. Soc. Citriculture. 2: 918-920.



PINO,J.; TAPANES,R.; ROSADO,A. y BALUJA,R. 1981. Quality control of sweet orange juice by gas-liquid chromatography of volatile constituents. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 936-939.

PINO,J. 1982. Correlation between sensory and gas chromatography measurements on orange volatiles. Acta alimentaria. 11:1-9.

PINO,J.; TORRECILLA,R., y ORSI,F. 1986. Correlation between sensory and gas-chromatographic measurements on grapefruit juice volatiles. Nahrung 30: 783-790.

PINO,J.; SÁNCHEZ,M. y RONCAL,E. 1993. Preparation and chemical composition of lemon oil concentrates. Die Nahrung 37, 3, 277-279.

POIANA,M.; CRISPO,F.; LEUZZI,U. y MINCIONE,B. 1992. L'estrazione dell'essenza di bergamotto con fluidi ipercritici. Aspetti tecnologici e rendimenti. C.N.R-RAISA. Volterra.

POIANA,M.; CRISPO,F.; MANZIU,E.; SICARI,V. y MINCIONE,B. 1993. Supercritical carbon dioxide extraction of bergamot oil. Bergaptene content in the extracts. Atti II Congresso. I fluidi supercritici e le loro applicazioni. Ravello.

POORE,H.D. 1932. Analysis and composition of California lemon and orange oils. USDA Tech. Bul. 241.

POTTER,D.W. y PAWLISZYN,J. 1994. Rapid determination of polyaromatic hydrocarbons and pchlorinated biphenyls in water using solid-phase microextraction and GC/MS. Environ. Sci. Technol. 28: 298-303.

PRAGER,M.J. y MISKIEWICZ,M.A. 1982. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis, Identification and Detection of adulteration of Natural and Concentrated Lemon Oils. J.Assoc. Off. Anal. Chem.vol. 65, 166-171.

PRIMO,E. y SALA,J.M., 1975. Esquema de la información obtenida en cinco años de experiencias. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 5(3):359-364.

RADFORD,T.; TAWASHIMA,K.; FRIEDEL,P.; POPE,L. y GIANTURCO,M. 1974. Distribution of volatile compounds between the pulp and serum of some fruit juices. J. Agric. Food Chem. 22(6): 1066-1070.

R.D. 1650/1991. Reglamentación tecnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros productos similares (8-11-91). B.O.E. 278, página 37555 A.7 Disp.28036 (20-11-1991).

REBECK,H. 1990. Processing of citrus juices in production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. D. Hicks (Editor). Van Nostrand Reinhold, New York.

REDD,J.B. 1976. Distillation systems in the citrus industry. Pro. 16<sup>th</sup> Annual Short Course for the Food Industry. University of Florida, Gainesville.

REDD,J.B.; HENDRIX,Ch.M.Jr. y HENDRIX,D.L. 1986. Quality Control Manual for Citrus Processing Plants, Vol I. Intercit, Inc., Safety Harbor, Fl.

REDD,J.B. y HENDRIX,Ch.M.Jr. 1987. A history of juice enhancement. Intercit Inc., Safety Harbor, Fl.

REDD,J.B. 1988. The volatile flavors of orange juice. Trans. Citrus Eng. Conf., Florida Sec. ASME, Lakeland, Fl.

REDD,J.B.; HENDRIX,Ch.M.Jr. y HENDRIX,D.L. 1992. Quality Control Manual for Citrus Processing Plants, Vol II. Ag. Science, Inc. Auburndale, Fl.

REDD,J.B. y HENDRIX,Ch.M.Jr. 1993. Processing of natural citrus oils and flavors, in Fruit Juice Processing Technology. Nagy, Chen & Shaw (Editors). Ag.Science, Inc.Auburndale, Fl.

REDD,J.B.; SHAW,P.E.; HENDRIX,Ch.M.Jr. y HENDRIX,D.L. 1996. Quality Control Manual for Citrus Processing Plant Vol.III. .Firmenich. Citrus Center, Safety Harbor, Fl. U.S. Citrus and Subtropical products Lab. Winterhaven, Fl.

RETAMAR,J.A. 1986. Essential oils from aromatic species.(On Essential Oils). Edit. J Verghese, pp 123-279, Publ. By Synthite Industrial Chemicals Pte. Ltd., Kolenchery, India.

REVERCHON,E.; DELLA PORTA,G. y TADDEO,R. 1995. Extraction of sage oil by supercritical CO<sub>2</sub>: Influence of some process parameters. J. Supercritical Fluids. (8): 302-308.

RIGANENSIS,M.D. 1955. L'analisi spettrofotometrica nella valutazione della qualità dell'essenza di limone. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 25, 156.

RIJKS,J.; CURVERS,J.; NOY,TH. y CRAMERS,C. 1983. Possibilities and limitations of steam distillation-extraction as a pre-concentration technique for trace analysis of organics by capillary gas chromatography. J. Chrom. 279: 395-407.

RISPOLI,G.; DI GIACOMO,A. y TRACUZZI,M.T. 1965. Riv. Ital. E.P.P.O.S. 47, 118.

ROBARDS,K. y ANTOLOVICH,M. 1995. Methods for assessing the authenticity of orange juice. *Analyst* 120, 1-28.

ROBARDS,K.; LI,X.; ANTOLOVICH,M. y BOYD,S. 1997. Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. J. Sci. Food Agric. 75, 87-101.

RODANO,C. 1930. *Industria e Commercio dei derivati agrumari*. Ed. Ulrico Hoepli. Milano.

ROGERS,J.A. 1963. *Amer. Perf. Cosm.* 78, 17.

ROUSELL,R.L.; NAGY,S.; NAIM,M. y ZEHAIC,U. 1992. Off-flavor development in citrus juice products. In Off-flavors in foods and beverages. Ed. G. Charalambous. Elsevier Sci. Pub., Amsterdam.

SAFINA,G. 1971. Los derivados de los cítricos. Ed. Nacional Financiera, S.A. Mexico, D.F.

SAFINA,G. 1984. I derivati Agrumari. Staz.Sper.Ind.Conserve. Parma.

SALE,J.W. 1953. Analysis of lemon oils. J.Ass.Off.Agric.Chemists, 36, 1188.

SATTAR,A.; MAHMUD,S. y KHAN,S.A. 1986. Part.I. Composition of the monoterpenes of the peel oils of oranges, kinnows and lemons. Pakistan J. Sci. Indust. Res., 29, 196-198.

SAURI,E.; NADAL,I. e IZQUIERDO,L. 1988. Aislamiento de los constituyentes volátiles del zumo de naranja por extracción con disolvente y por arrastre con nitrógeno. Estudio cuantitativo con zumos modelo. Rev. Agroquim. Tecnol. Alimentos.28(3):370-378.

SCHIEBERLE,P. y GROSCH,W. 1988. Identification of potent flavor compounds formed in an aqueous lemon oil / citric acid emulsion. J.Agric. Food Chem.36, 797-800.

SCHULTZ,W.C. y RANDALL,J.M. 1970. Liquid carbon dioxide for selective aroma extraction. Food Technol.24: 1282-1287.

SCHULTZ,T.H.; FLATH,R.A. y MON,T.R.J. 1971. Analysis of orange volatiles with vapor sampling. J. Agric. Food Chem. (19) 1060-1065.

SCOTT,W.C.; KEW,T.J. y VELDHUIS,M.D. 1965. Composition of orange juice could. J.Food Sci. 30, 833-837.

SEBASTIANI,E.; DUGO,G. y COTRONEO,A. 1983. Sulla genuinita delle essenze agrumarie. Nota. Ess. Deriv. Agrum. 53, 501-513.

SENDRA,J.M.; NAVARRO,J.L. e IZQUIERDO,L. 1988.

C18 solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. J.Chromatogr.Sci.26, 443-448.

SERGI,G.; CALAPAY,R. y BRUNO,E. 1968. Indagine sulle sofisticazioni delle essenze di limone. Ann. Fac. Econ. Comm. Univ. Messina, 6, 101.

SHAW,P.E. 1977. Essential Oils. Aqueous Essences. Citrus Science and Technology, Vol.I. Nagy, Shaw & Veldhuis (Editors). AVI Publishing Co., Westport, CT.

SHAW,P.E. 1979. Review of Quantitative Analyses of Citrus Essential Oils. J.Agric. Food Chem., vol.27, n°2, 246-257.

SHAW,P.E.; REDD,J.B.; HENDRIX,Ch.M.Jr. y HENDRIX,D.L. 1996. Volatile components important to citrus flavors. "Quality

control manual for citrus processing plants". Volume III. Agscience, Inc. Florida.

SHIBAMOTO,T.; MIHARA,S.; NISHIMURA,O.; KAMIYA,Y.; AITOKU,A. y HAYASHI,J. 1980. Flavor volatiles formed by heated milk. En: The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages. 241-265. Academic Press. New York, USA.

SHU,C.K.; WALDRAT,J.P y TAYLOR,W.I. 1975. Improved method for bergapten determination by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 106, 271.

SINCLAIR,W.B. 1984. The Lemon. Univ. of Calif. Press, Oakland.

SLATER,C.A. 1963. Citrus Essential Oils. III. Evaluation of Sicilian Natural Lemon Oil. J.Sci. Food Agric., 14, 58.

SRINIVAS,S.R. 1986. Atlas of Essential Oils. Published by author, Bronx, New York.

STANLEY,W.L.; LINDWALL,R.C. y VANNIER,S.H. 1958. Specific quantitative colorimetric method of analysis for citral in lemon oil. Agric. and Food Chem. 6(11), 858-860.

STANLEY,W.L.; IKEDA,R.M.; VANNIER,S.H. y ROLLE, L.A. 1961. Determination of the relative concentration of the major aldehydes in lemon, orange and grapefruit oils by gas chromatography. J.Food Sci. 26(1), 43-48.

STANLEY,W.L. 1972. J. of A.O.A.C., 44, 263.

STAROSCIK,J.A. y WILSON,A.A. 1982. Quantitative analysis of cold-pressed lemon oil by glass capillary gas chromatography. J.Agric. Food Chem.30, 507-509.

STAROSCIK,J.A. y WILSON,A.A. 1982. Seasonal and regional variation in the quantitative composition of cold-pressed lemon oil from California and Arizona. J.Agric.Food Chem.30,835-837.

STEFFEN,A. y PAWLISZYN,J. 1996. Analysis of flavor volatiles using head space solid- phase microextraction. J.Agric. Food Chem.44, 2187-2193.

SUGIYAMA,K. y SAITO,M. 1988. Simple microscale supercritical fluid extraction system and its application to GC/MS of lemon peel oil. J. Chromatog. 442, 121-131.

SWISHER,H.E. y SWISHER,L.H.1980. Lemon and Lime juices in Fruit and Vegetable juice Processing Technology, 3<sup>rd</sup> Edition. Nelson & Tressler (Editors). AVI Publishing Co., Westport, CT.

TASTEMAKER. 1994. Products data sheets for natural orange and lemon aromas. Tastemaker. Lakeland, Fl.

TATEO,F. y GATTI,N. 1981. Impiego della spettrometria di massa per il controllo di qualità delle essenze diterpenate solubili di limone prodotte con resine adsorbenti stiroliche. La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione, n° 5, 295-303.



TATEO,F. 1981. Use of synthetic polymeric adsorbents for processing and recovering essential citrus fruit oils.(Flavour'81). Edit. P. Schreier, pp671-682, Walter de Gruyter, Berlin.

TATEO,F. y SARTI,S. 1983. Produzione di solubili diterpenate aromatizzanti da olio essenziale di arancia e valutazione del grado di diterpenazione. Ind. Bevande, 66, 262-265.

TATEO,F. y CUNIAL,P. 1986. Valutazione del significato dei gascromatogrammi HS per la caratterizzazione delle solubili aromatizzanti da olio essenziale di limone. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 77, 316-326.

TATUM,J.H.; SHAW,P.E., y BERRY,R.E. 1969. Degradation products from ascorbic acid. J. Agric. Food Chem. 17: 38-40.

TATUM,J.M.; NAGY,S., y BERRY,R.E. 1975. Degradation products formed in canned single-strength orange juice during storage. J. Food Sci. 40: 707-709.

TEMELLI,F. 1987. Supercritical carbon dioxide extraction of terpenes from coldpressed Valencia orange oil. Abstr. Univ. Florida.

TERANISHI,R. y BUTTERY,R.G. 1962. Intern. Fed. Fruit Juice producers symp. Volatile Fruit Flavours. Bern. 257.

TRESS,R. y JENNINGS,W.G., 1972. Production of volatile compounds in the ripening banana. J. Agric. Food Chem. (20) 189-192.

USFDA. 1982. Code of Federal Regulations, Title 27, Section 18.52. Fruit flavor concentrate regulations. United States Food and Drug Administration, Washington, D.C.

USFDA. 1988. Code of Federal Regulations, Title 21, Section 146.146. Frozen concentrated orange juice. United States Food and Drug Administration, Washington, D.C.

USFDA. 1994. Code of Federal Regulations, Title 21, Section 146.146.& 146.153. Frozen concentrated orange juice for manufacturing, Rev. April. United States Food and Drug Administration, Washington, D.C.

USP XX. 1980. Lemon Oil. p.1233-1234.

VENOLIA,W. y PEAK,S. 1976. Lemon juice particulates. Some effects of juice processing.. J.Agric. Food Chem.24, n°4.

VERGHESE,J. 1982. Terpene Chemistry. Synthite Industrial Chemicals Private Limited, Kolenchery, Kerala.

VERZERA,A.; COTRONEO,A.; DUGO,G. y SALVO,F. 1987. On the genuineness of citrus essential oils. Part.XV. Detection of added orange oil terpenes in lemon essential oils. Flav. Frag. J. 2, 13-16.

VIEGAS,F.C.P. 1990. La Industrialización de los productos Cítricos. Jornadas de Industrialización de cítricos. Consejería de Agricultura. Murcia

WAMPLER,T.P. 1997. Analysis of food volatlies using headspace-gas chromatography techniques. In Techniques for analyzing food aroma. pp. 27-58. Edited by Ray Marsili. Dean Foods Company Rockford, Illinois. ISBN 0-8247-9788-4.

WESBSTER,A.M. 1967. Webster's Seventh New Collegiate Dictionary. G.&c. Merriam Co. Springfield, MA.

WELCH,S.B. y REDD,J.B. 1985. Redd essence recovery systems. Intercit, Inc., Safety Harbor, FL.

WELCH,S.B. 1989. A. The TASTE Evaporator. Trans. Citrus Eng. Conf., Florida. Sec.ASME, Lakeland, FL.

WELCH,S.B. 1989. B. Aroma and essence recovery systems. In Citrus Processing in the `90s. R.F. Matthews (Editor). University of Florida/ IFT, Gainesville, Fl.

WIDMER,W.W. 1991. Improvements in the quantitation of limonin in citrus juice by reversed-phase HPLC. J.Agric. Food Chem. 39, 1472-1476.

WILSON,Ch.W.III. y SHAW,P.E. 1984. Quantitation of individual and total aldehydes in citrus cold-pressed oils by fused silica capillary gas chromatography. J.Agric. Food Chem.32, 399-401.

WOLFORD,R.; ATTAWAY,J.; ALBERDING,G. y ATKINS,C. 1963. Analysis of the flavor and aroma constituents of Florida orange juices by gas chromatogrphy. J. Food Sci. 28: 320-328.

YAMAUCHI,Y. y SAITO,M. 1990. Fractionation of lemon peel oil by semipreparative supercritical fluid chromatography. J.Chromatog. 505, 237-246.

YOKOHAMA,F.; LEVI,L.; LAUGHTON,P.M. y STANLEY,W.L. 1961. Determination of citral in citrus extracts and citrus oils by conventional and modern chemical methods and analysis. J.A.O.A.C. 44(3), 535-541.

YOKOHAMA,H.; GOLD,S.; DE BENEDICT,C. y CARTER,B. 1986. Bioregulation of essential oils of Lemon. Food Technol. 40,(11) 111-113.

YOUNG,R.H. 1986. Fresh fruit cultivars in Fresh Citrus Fruits. Wardowski, Nagy & Grierson (Editors). AVI Publishing Co. Westport, CT.

ZIEGLER,H. y SPITELLER,G. 1992. Coumarins and Psoralens from Sicilian Lemon Oil. Flavour and Fragrance Journal. Vol.7, 129-139.

## **ABREVIATURAS**



---

<b>Abs.</b>	Absorbancia
<b>AENOR</b>	Asociación Española de Normalización
<b>AFNOR</b>	Asotiation Française de Normalisation
<b>°C</b>	grado Celsius
<b>C.L.A.M.</b>	Commite de Lieson d'Agromiculture Mediterranéen
<b>CMAAARM</b>	Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua de la Región de Murcia
<b>Carbowax</b>	® Union Carbide Corp.
<b>cm<sup>3</sup></b>	centímetros cúbicos
<b>FCC</b>	Food Chemical Codex
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	gramo
<b>GC</b>	Gas Chromatography
<b>GLC</b>	Gas Liquid Chromatography
<b>Ha</b>	Hectáreas
<b>HP</b>	® Hewlett Packard
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography
<b>ISO</b>	International Standard Organization
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mrads</b>	miliradianes
<b>N</b>	Normal
<b>nm</b>	nanómetro
<b>OV</b>	® Ohio Valley
<b>pp</b>	página
<b>ppb</b>	partes por billón
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>ppt</b>	partes por trillón
<b>Tm</b>	Toneladas métricas
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>WCOT</b>	wall coated open tubular

---

**RESUMEN / SUMMARY**





En esta memoria además de las determinaciones habituales de características físico-químicas del aceite esencial de limón, se introducen las de color mediante el colorímetro digital, y de densidad, mediante densímetro electrónico. El estudio gascromatográfico para determinar el orden de elución característico, se realiza en columnas capilares de sílice fundida: OV-101 apolar, CPWax-52-CB muy polar y HP-5 ligeramente polar. Comparando los resultados, se logra la identificación de setenta y cuatro componentes, ya que son complementarias en cuanto a separación de algunos de ellos. Así mismo, se determinan las condiciones cromatográficas que mejoran la resolución.

Observando las evoluciones de los distintos componentes del aceite esencial durante la campaña de elaboración, se deducen relaciones entre constituyentes mayoritarios y minoritarios. Se fijan los valores máximos y mínimos encontrados para los distintos componentes y los porcentajes por grupos funcionales para el aceite esencial de limón español.

La importancia tecnológica y económica que tiene la determinación de las normas de calidad de un producto como el aceite esencial de limón, justifica el interés de la presente memoria de Tesis doctoral. Será preciso que los organismos internacionales determinen, junto con las normativas comunes de técnicas analíticas hasta ahora recogidas, unas bases de datos, que permitirán conocer la influencia de los distintos factores externos sobre las campañas anuales y, en concreto, las relaciones entre distintos componentes. Por último se aportan los valores para colaborar en la elaboración de la norma de calidad para aceite esencial de limón obtenido en España.

In this work, we determine the common parameters of the physical and chemical properties of the essential oil of lemon, as well as it is introduced the colour determination by a digital colorimeter and the density by an electrical densitometer, in addition to this we studied the characteristic elution order in different polarity silica fused capillary columns (Ov-101 nonpolar, CPWax-52-CB polar and HP-5 slightly polar) by gas chromatography. Due to the columns complementarity it was possible to identify seventy-four components.

The chromatographic conditions, which give us the best resolution are indicated. The changes of the different compounds in lemon oil during one whole year are observed. Relationships between majority and minority components are deduced for Spanish essential lemon oil. The maximum and minimum compound values and functional groups standard percentages are also determined.

The technological and economical importance of the quality norms determination of such a product as essential lemon oil justifies the interest of the present PhD memory. To establish such norms it will be able that the international organisations, together with the nowadays used analytical techniques, to determine a data base that will allow us to know the influence of the different external factors on the yearly crops, as well as, the relative changes of the different constituents. Finally we proposed some values to work jointly in a quality norm for the essential lemon oil grown in Spain.