

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



**Composició de los aceites esenciales
de la corteza de diferentes variedades
de *Citrus medica* L. Influencia del
grado de maduración**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

ALUMNO: FERNANDO GALLART MARTINEZ

TUTORES:

Juan A. Llorens-Molina (UPV)

Oscar Olivares-Fuster (Todolí Citrus Fundació)

Curso académico: 2020-2021

CONVOCATORIA 6º MAYO 2021

VALENCIA, ABRIL 2021

RESUMEN

TÍTULO: Composición de los aceites esenciales de la corteza de diferentes variedades de *Citrus medica* L. Influencia del grado de maduración.

La gran mayoría de cítricos comerciales conocidos se originaron a partir de cuatro especies ancestrales: el Pummelo (*Citrus maxima* Merr.), el mandarino (*C. reticulata* Blanco), la papeda denominada *C. micrantha* "Wester" y el Cidro (*C. medica* L.). El Cidro es el progenitor de los limones y las limas. Tiene una gran tradición en la medicina y la cocina China, donde es conocido y empleado desde hace miles de años, siendo el primer cítrico que llegó a Europa en el siglo IV a.C. Además de su valor estético (ya fue muy apreciado en los jardines florentinos de los Medici en el siglo XV) sus aceites esenciales son de elevada calidad sensorial, lo que les confiere amplias y crecientes posibilidades en sectores productivos relacionados con la cosmética y la gastronomía. Estos están constituidos por la fracción volátil y semivolátil de los productos del metabolismo secundario y se hallan en distintos órganos de la planta, particularmente en las glándulas de la superficie del epicarpio de los frutos.

Pese a no ser un híbrido y haberse mantenido como especie pura, las distintas variedades de Cidro presentan fenotipos muy diferentes, que se reflejan especialmente en la morfología de los frutos. Esta variabilidad, asociada a factores genéticos, implica a su vez cambios en el metabolismo secundario, que dan lugar a una amplia quimiodiversidad. En este sentido, cabe destacar la presencia de monoterpenos oxigenados que, aun presentándose como compuestos minoritarios, proporcionan a los aceites esenciales las notas específicas de sus aromas.

Dado el elevado interés práctico de dichos aceites en perfumería, gastronomía y como posible alternativa natural a ciertos aditivos alimentarios, es de notable interés el análisis de la composición del aceite esencial de distintas variedades de Cidro, algunas aún poco conocidas y estudiadas. Por otra parte, un factor potencial de variabilidad en dicha composición es el grado de maduración del fruto. Conocer su influencia puede contribuir a lograr una composición óptima desde el punto de vista sensorial.

Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la variabilidad química de los aceites esenciales de distintos cultivares de Cidro, considerando el grado de maduración del fruto. Para ello se ha desarrollado un proceso de extracción a escala de laboratorio que permita reproducir con la máxima fidelidad posible la composición de los aceites esenciales obtenidos industrialmente. Desde el punto de vista cualitativo, la identificación se llevó a cabo por cromatografía de gases y detección por espectroscopía de masas, mientras que para el análisis cuantitativo se utilizó un equipo similar de cromatografía de gases, con el mismo tipo de columna y parámetros de funcionamiento, con detección de ionización de llama. La cuantificación se realizó de modo riguroso, mediante calibración con estándar interno y cálculo de los factores de respuesta para cada uno de los componentes de los aceites esenciales.

PALABRAS CLAVE: *C. medica* L., cidro, aceite esencial, cromatografía de gases, espectrometría de masas

TUTORES:

Juan A. Llorens-Molina (UPV); Oscar Olivares-Fuster (Todolí Citrus Fundació)

ABSTRACT

TITLE: Essential oil composition of the rind of different varieties of *Citrus medica* L. Ripeness degree influence.

The vast majority of known commercial citrus fruits originated from four ancestral species: the Pummelo (*Citrus maxima* Merr.), the mandarin (*C. reticulata* Blanco), the papeda called *C. micrantha* "Wester" and the Citron (*C. medica* L.). The Citron is the ancestor of lemons and limes. It has a great tradition in Chinese medicine and cuisine, where it has been known and used for thousands of years, being the first citrus that arrived into Europe in the 4th century BC. In addition to its aesthetic value (already highly appreciated in the Florentine gardens of the Medici in the 15th century), its essential oils are of high sensory quality, which confers them wide and growing possibilities in productive sectors related to cosmetics and gastronomy. These are constituted by the volatile and semi-volatile fractions of the products in the secondary metabolism and are found in different organs of the plant, particularly in the glands located on the surface of the epicarp of the fruits.

Despite not being a hybrid and having remained as a pure species, the different varieties of Citron show very different phenotypes, which are especially reflected in the morphology of the fruits. This variability, associated with genetic factors, implies at the same time changes in the secondary metabolism, which lead to a wide rise in chemo diversity. Accordingly, it is worth noting that the presence of oxygenated monoterpenes, even appearing themselves as minority compounds, provide the essential oils with specific notes of their aromas.

Regarding the high practical interest of these oils in perfumery, gastronomy and as a possible natural alternative to certain food additives, it is of remarkable interest the analysis of the composition of the essential oil in different Citron varieties, some still little known and studied. Otherwise, a potential factor of variability in such composition is the ripeness degree of the fruit. Knowing its influence can contribute to achieve an optimal composition from the sensory point of view.

This work aims to study the chemical variability of essential oils in different cultivars of Citron, taking in consideration the ripeness degree of the fruit. For this, it is intended to develop an extraction process on a laboratory scale that allows to reproduce the composition of industrially obtained essential oils as accurately as possible. From a qualitative point of view, the identification was carried out by gas chromatography and detection by mass spectroscopy, while for the quantitative analysis a similar gas chromatography equipment was used, with the same type of column and operating parameters, but with flame ionization detection. Quantification was rigorous, by internal standard calibration and calculation of the response factors for each of the essential oil components.

KEY WORDS: *C. medica* L., citron, essential oil, gas chromatography, mass spectrometry

TUTORS: Juan A. Llorens-Molina (UPV); Oscar Olivares-Fuster (Todolí Citrus Fundació)

A mis tutores Dr. Juan Antonio Llorens-Molina y Dr. Óscar Olivares Fuster por su implicación y dedicación. Por su gran ayuda corrigiendo y supervisando. De ambos he aprendido mucho.

A Sandra Vacas González y al CEQA por el tiempo y la ayuda prestada.

A la Fundación Todolí Citrus por su colaboración.

A mi familia, por haberme apoyado siempre en todas mis decisiones.

A los que han estado siempre y a los que ya no pueden.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Origen genómico de los cítricos	1
1.2	Historia de los cítricos	3
1.2.1	En la Antigüedad	3
1.2.2	Edad Media al siglo XX	5
1.2.3	Actualidad	5
1.3	Taxonomía de los cítricos	5
1.4	Morfología del fruto	7
1.5	El Cidro	7
1.5.1	Taxonomía	7
1.5.2	Principales grupos varietales	8
1.5.3	Distribución	9
1.5.4	Usos	9
1.5.5	Importancia económica	10
1.6	Aceites esenciales	10
1.6.1	Definición	10
1.6.2	Usos	10
1.6.3	Propiedades físicas	11
1.6.4	Composición química	11
1.6.4.1	Terpenos	11
1.6.4.1.1	Monoterpenos (C10)	11
1.6.4.1.2	Sesquiterpenos (C15)	12
1.6.4.1.3	Diterpenos	12
1.6.4.2	Otros	13
1.6.5	Aceites esenciales en las plantas	13
1.6.5.1	Funciones	13
1.6.5.2	Localización	13
1.6.5.3	Factores de variabilidad de los aceites esenciales.	14
1.6.6	Métodos de obtención de los aceites esenciales	15
1.6.7	Importancia económica de los aceites esenciales	16
1.6.8	Análisis de los aceites esenciales. Métodos y fundamentos teóricos	17
1.6.8.1	Cromatografía de gases	17
1.6.8.2	Cromatografía de gases MS y FID	18

1.6.8.3	Índices de retención.....	18
2.	Justificación y objetivos.....	20
3.	Materiales y métodos.....	21
3.1	Material vegetal.....	21
3.1.1	Variedades	21
3.2	Metodología.....	21
3.2.1	Materiales	21
3.2.2	Determinación del grado de maduración	22
3.2.3	Metodología del proceso de extracción	22
3.2.4	Análisis GC-FID y GC-MS	25
3.2.4.1	Cuantificación de los compuestos.....	26
3.3	Procesamiento estadístico de datos	28
4.	Resultados y discusión.....	29
4.1	Evaluación colorimétrica	29
4.2	Cálculo de los factores de respuesta experimentales	30
4.3	Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS).....	31
4.4	Cromatografía de gases - Ionización de llama (GC/MS-FID)	31
5.	Conclusiones:	40
6.	Bibliografía.....	41
7.	Anexos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

Figura 1. Propuesta de origen de los cítricos y antiguas rutas de dispersión.

Figura 2. Genealogía de los principales genotipos cítricos.

Figura 3. Origen genético de las principales variedades de lima y limón y subgrupos de cítricos.

Figura 4. Orígenes filogenéticos de las principales especies secundarias de cítricos con los parentales femeninos y masculinos.

Figura 5. Posible área de origen y centro de domesticación de *C. medica*, *C. reticulata* y *C. maxima*.

Figura 6. Símbolos del festival judío de otoño de Sucot.

Figura 7. Distribución geográfica de las áreas de origen de las especies de cítricos asiáticos divididas por la línea de Tanaka.

Figura 8. Sección transversal cítrico.

Figura 9. Corte transversal de corteza de limón.

Figura 10a. Colección de cítricos Medici, Bartolomeo Bimbi 1715.

Figura 10b. Detalle Colección de cítricos.

Figura 11. Brotaciones vegetativas y flores de *C. medica* Poncire (izquierda) y Corsica (derecha).

Figura 12. Estructuras de algunos monoterpenos.

Figura 13. Estructuras de algunos sesquiterpenos.

Figura 14. Óxido de manool.

Figura 15. Estructuras de algunos fenilpropanoides.

Figura 16. Los compuestos orgánicos volátiles.

Figura 17. Micrografías SEM de cortes transversales de corteza de *C. limon* (A, B), *C. bergamia* (C, D) y *C. myrtifolia* (E, F).

Figura 18. Valor de producción de aceites esenciales en la Unión Europea (EU-28) de 2014 a 2018 en miles de euros.

Figura 19. Importación de volumen de aceites esenciales a Europa en 2017 en toneladas, por tipo de aceite.

Figura 20. Esquema de un cromatógrafo gaseoso.

Figura 21. Representación de la similitud entre espectros de masas de monoterpenos: sabineno (a) y β -felandreno (b); y sesquiterpenos: biciclogermacreno (c) y germacreno (d).

Figura 22. El modelo L*A*B de CIELAB color espacio.

Figura 23. *Citrus medica* Aurantiata.

Figura 24. Sección transversal *C. medica* Aurantiata.

Figure 25. Pesado del exocarpo.

Figure 26. Proceso ultrasonidos.

- Figura 27. Agitador orbital.
- Figura 28. Tubos de centrifuga.
- Figura 29. Equipo de centrifugación.
- Figura 30. Fases tras centrifugación.
- Figura 31. Proceso de deshidratado.
- Figura 32. Equipo Rotovapor.
- Figura 33. Aceite esencial obtenido en estado inmaduro.
- Figura 34. Aceite esencial obtenido en estado maduro.
- Figura 35. Diagrama de flujo proceso de extracción.
- Figura 36. Esquema del proceso analítico.
- Figura 37. Comparación *C. medica* var. Bajoura entre estados.
- Figura 38. Comparación *C. medica* var. Mano de Buda entre estados.
- Figura 39. Comparación *C. medica* var. Rugosa entre estados.
- Figura 40. GC-MS Cromatograma *C. medica* var. Amalfi.
- Figura 41. GC-MS Cromatograma *C. limon*.
- Figura 42. Representación esquemática de las vías de la cumarina y la furanocumarina.

Tablas

- Tabla 1. Taxonomía de los cítricos según Swingle (1943).
- Tabla 2. Comparación en la taxonomía de *C. sinensis* según los sistemas Swingle y Tanaka.
- Tabla 3. Ejemplo cálculo de RRF para varios compuestos de diferente naturaleza química.
- Tabla 4. Valores coordenadas Hunter LAB estado inmaduro.
- Tabla 5. Valores coordenadas Hunter LAB estado maduro.
- Tabla 6. Tabla de medias para L, a y b por estado de maduración con intervalos de confianza del 95.0%.
- Tabla 7. Cálculo de factores de respuesta experimentales.
- Tabla 8. Tabla de composición para las 10 variedades de *C. medica* L.
- Tabla 9. Compuestos comunes a todas las variedades para el estado inmaduro según su naturaleza química.
- Tabla 10. Compuestos comunes a todas las variedades para el estado maduro según su naturaleza química.
- Tabla 11. Composición en porcentajes del aceite esencial en las diferentes variedades según naturaleza química para el estado inmaduro.
- Tabla 12. Composición en porcentajes del aceite esencial en las diferentes variedades según naturaleza química para el estado maduro.

1. Introducción

1.1. Origen genómico de los cítricos

El género *Citrus* pertenece a la subfamilia de angiospermas *Aurantioideae* de la familia *Rutaceae*, que está ampliamente distribuido por las zonas templadas del planeta. Hasta no hace mucho tiempo, se consideraba que la zona origen de la mayoría de las especies del género *Citrus* se situaba en la región monzónica que abarca desde el oeste de Pakistán hasta el centro-norte de China, y hacia el sur a través del archipiélago de las Indias Orientales hasta Nueva Guinea y el archipiélago de Bismarck, el noreste de Australia, Nueva Caledonia, Melanesia y las islas de la Polinesia occidental (Swingle y Reece, 1967). De hecho, autores como Tolkowsky ya consideraban las regiones montañosas del sur de China y el noreste de la India como centro de origen de este género (Tolkowsky, 1938).

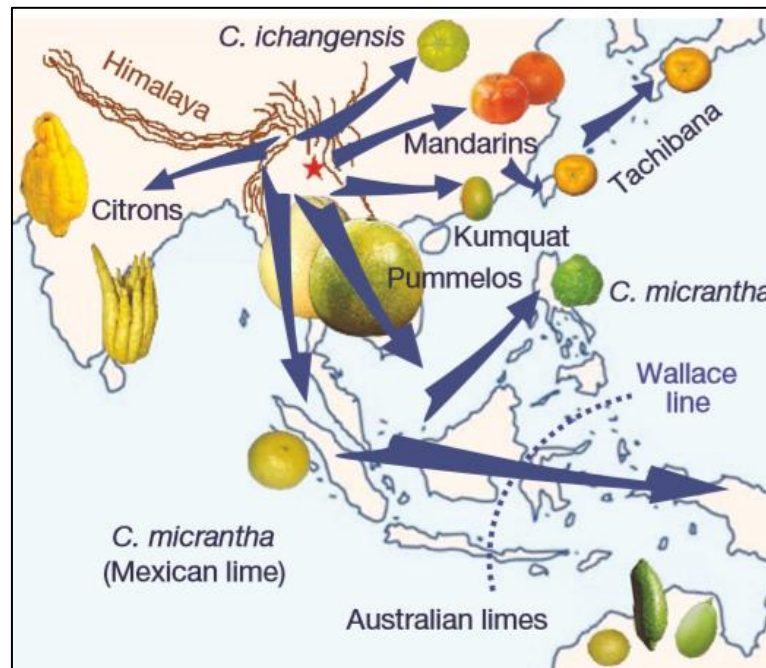


Figura 1. Propuesta de origen de los cítricos y antiguas rutas de dispersión.

Fuente: *Genomics of the origin and evolution of Citrus*. (Wu et al., 2018)

En la actualidad se propone como centro de origen el triángulo formado por el área oriental de Assam al noreste de India, el norte de Myanmar y el noroeste de Yunnan (Talon *et al.*, 2020). La propuesta es compatible con la biogeografía de los cítricos, las relaciones filogenéticas establecidas, el momento inferido de diversificación y la paleogeografía de la región, especialmente la historia geológica de Wallacea y Japón y los hallazgos en la zona (la estrella roja marca la ubicación del fósil de *C. linczangensis*) (figura 1) (Wu *et al.*, 2018).

En la figura 1 podemos ver que las flechas sugieren direcciones de migración plausibles para las especies ancestrales de cítricos y sus híbridos desde las estribaciones del sureste del Himalaya como centro de origen. Una migración propiciada al sufrir un evento de especiación repentina durante el Mioceno tardío. Esta radiación coincidió con una pronunciada transición de las condiciones húmedas del monzón a un clima más seco. Las especies cítricas australianas y Tachibana, la mandarina japonesa nativa; se separaron más tarde de los cítricos continentales durante el Plioceno temprano y el Pleistoceno, respectivamente (Kumar *et al.*, 2009).

El estudio de las especies puras de cítricos, sus híbridos y mezclas, permite rastrear la genealogía y el origen genético de los principales cultivares comerciales de cítricos. Tanto la extensa red de relaciones entre mandarinas y naranja dulce, como la asociación del grado de introgresión de pummelo con rasgos deseables en la fruta sugieren un complejo proceso de domesticación.

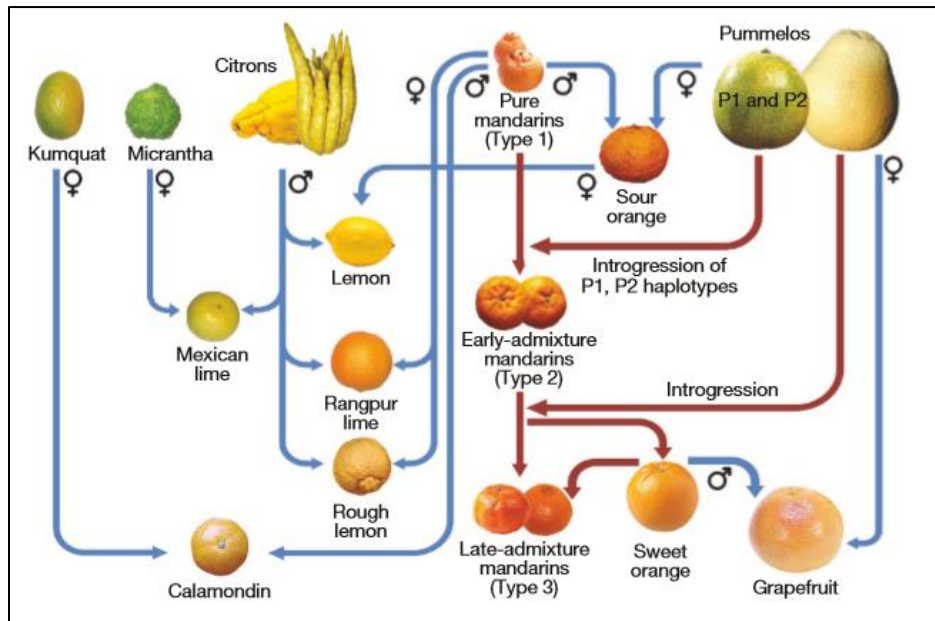


Figura 2. Genealogía de los principales genotipos cítricos. Fuente: *Genomics of the origin and evolution of Citrus* (Wu et al., 2018)

Las cinco especies progenitoras se muestran en la parte superior de la figura 2. Las líneas azules representan cruces simples entre dos genotipos parentales, mientras que las líneas rojas representan procesos más complejos que involucran múltiples individuos, generaciones y / o retrocruces (Wu et al., 2018). Como ya se ha comentado, la gran mayoría de los cítricos comerciales conocidos se originaron a partir de cuatro especies ancestrales: pummelo (*Citrus maxima* Merr.), mandarino (*C. reticulata* Blanco), la papada denominada *C. micrantha* “Wester” y el cidro (*C. medica* L.) (Luro et al., 2017). Es por ello que algunos autores dejan de lado al Kumquat (*C. japonica*) a la hora de explicar la genealogía de estas especies. En las figuras 3 y 4 se puede observar la evolución e hibridación de las diferentes especies de cítricos con las especies ancestrales como punto de partida.

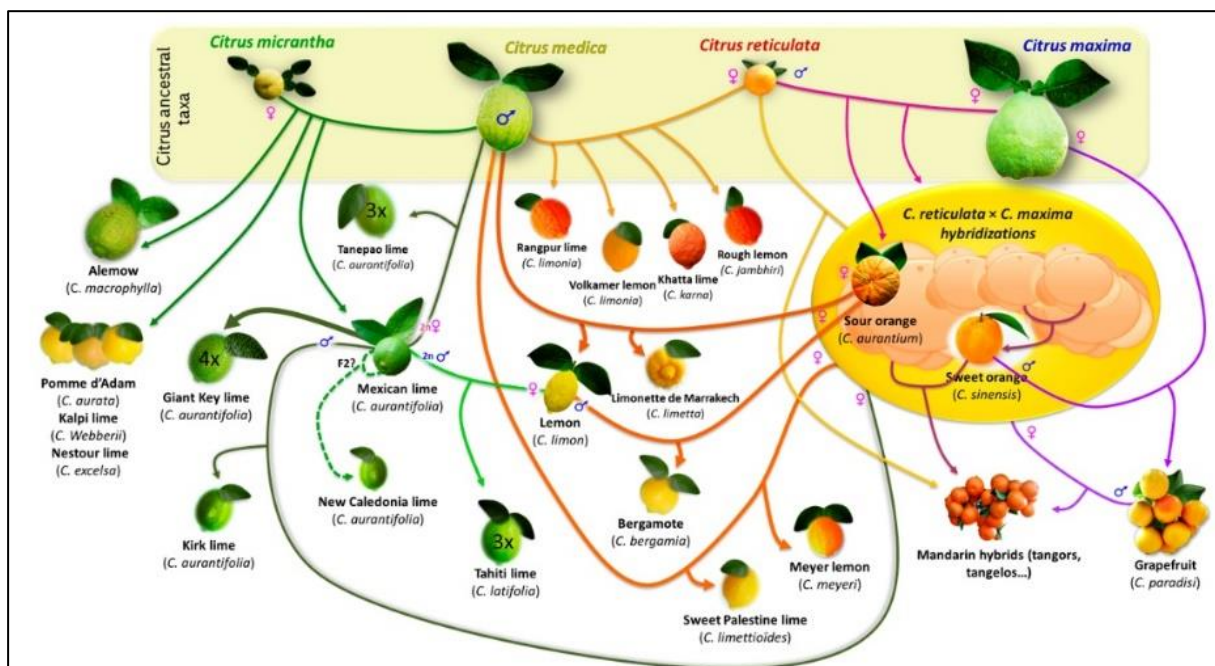


Figura 3. Origen genético de las principales variedades de lima y limón y subgrupos de cítricos. Fuente: AGRUMED: *Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean* (Luro et al. 2017)

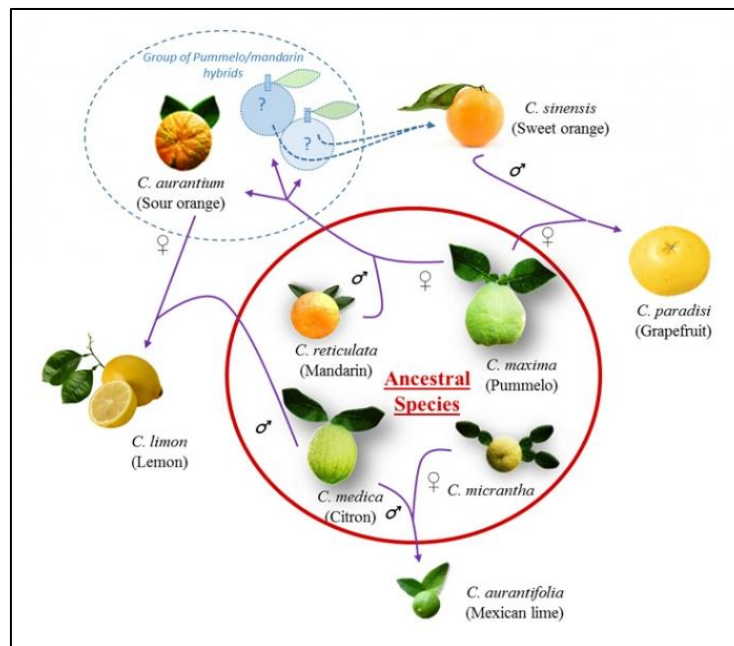


Figura 4. Orígenes filogenéticos de las principales especies secundarias de cítricos con los parentales femeninos y masculinos (las líneas de puntos son una cruz hipotética). Fuente: AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean (Luro et al. 2017)

1.2 Historia de los cítricos

El cultivo de cítricos se originó en tiempos remotos, probablemente hace unos 4000 años en las zonas tropicales y subtropicales del continente asiático y el archipiélago malasio. Más tarde los cítricos fueron exportados a los países del Mediterráneo y consecuentemente propagados al resto de las áreas cítricas. Los cítricos han ejercido desde siempre una fascinación debido a sus hojas perennes, el perfume de sus flores y el sabor de sus frutos. Podemos encontrar ejemplos en los añejos y lujosos jardines italianos donde diferentes especies de este género eran cultivadas por su valor ornamental (Calabrese, 2002).

1.2.1 En la Antigüedad

La cita más antigua que se refiere a los cítricos se encuentra en el libro chino Yu Gong que fue escrito hace 4.000 años y el cual incluso hace referencia a documentos anteriores. En uno de ellos se describe cómo durante el reinado del emperador Da-Yu (siglo XXI a. C.) se realiza el tributo de unas canastas con dos tipos de cítricos: pequeños y grandes, probablemente mandarinas y pummelos. Este uso de los cítricos como ofrenda indica que eran considerados frutos de alto valor (Inglese y Sortino, 2019).

China, donde se conoce a los cítricos por el nombre genérico 'Kan', fue el principal centro de cultivo durante al menos 3 milenios. Ya en el año 304 d.C., especies como *C. medica* eran descritas en libros como 'Nan fang ts'ao mu chuang' por Chi Han. Siglos más tarde en el 1178 d.C. se escribieron trabajos monográficos durante la dinastía Sung. En uno de ellos se describieron 27 variedades de cítricos, así como su propagación y cultivo (Cooper, 1989).

En India los cítricos son conocidos desde tiempos ancestrales, pues forma parte del centro de origen de los mismos. Ya en el 800 a.C. se nombra a los cítricos en sánscrito, dentro de una colección de textos sagrados. Como ya se ha comentado en las zonas de Assam y sur de la cordillera Himalaya, tienen su origen diferentes especies de cítricos, entre ellos los cidros. Otros cítricos como los pummelos y mandarinas fueron seguramente introducidos desde China en el año 1100 d.C. Por otro lado, en Japón, donde de manera genérica se conoce también a los cítricos con el nombre de 'kan', la mandarina Satsuma fue introducida desde China alrededor del año 1500 d.C. (Tolkowski, 1938).

Los cítricos, nativos de las regiones subtropicales y tropicales de Asia, fueron transportados a la región mediterránea donde debido a las condiciones edafoclimáticas, adquirieron una gran importancia y pasaron a formar parte de la dieta mediterránea siendo muy valorados por su sabor y aspecto.

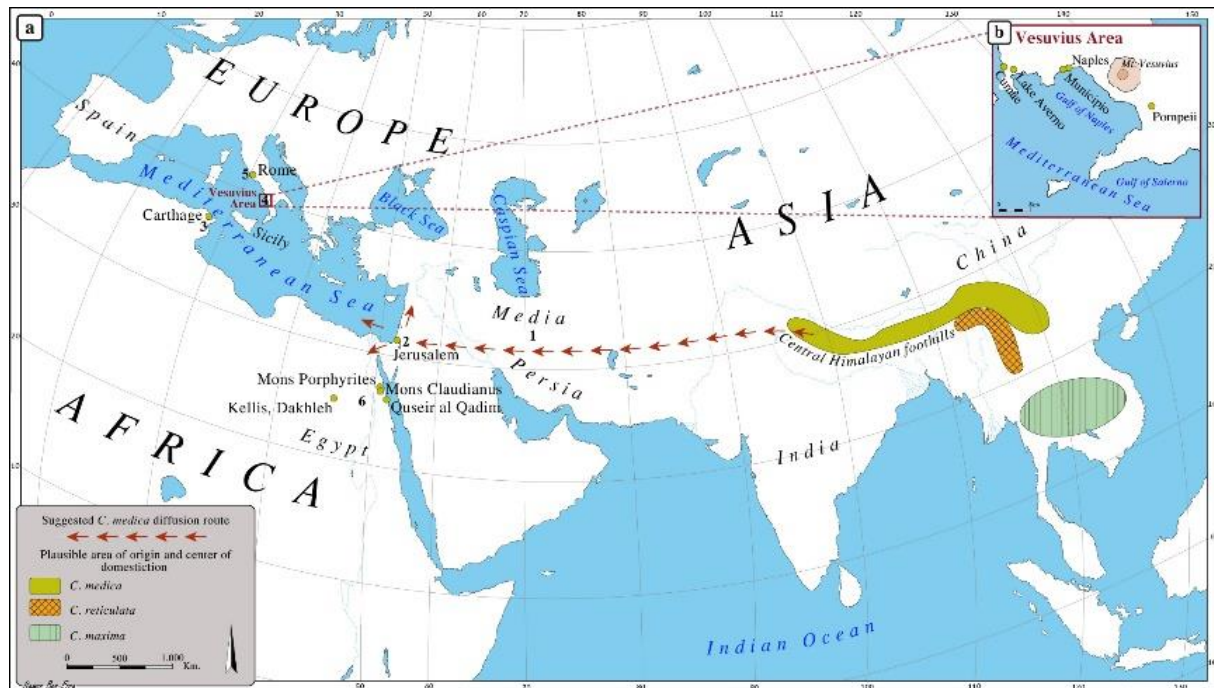


Figura 5. Posible área de origen y centro de domesticación de *C. medica*, *C. reticulata* y *C. maxima*. Fuente: *The Citrus Route Revealed: From Southeast Asia into the Mediterranean* (Langgut, 2017)

La primera especie introducida en la cuenca mediterránea y por tanto en Europa fue el cidro (*C. medica*). Fue transportada por los persas desde la India a Mesopotamia y por los griegos desde Persia tras las Guerras Médicas durante el Imperio aqueménida de Alejandro Magno (356–323 BC) (figura 5). De estos tiempos proviene el nombre de *C. medica* para el cidro. Además, hay evidencias de que esta especie ya era utilizada por los judíos con el nombre de 'Etrog' (Figura 6) durante la Fiesta de los Tabernáculos, tras el éxodo desde Egipto (1450 a.C) (Duarte *et al.*, 2016). El cidro sería posteriormente importado al Mediterráneo alrededor del 300 a.C. y su cultivo introducido en las costas de Calabria, Amalfi y Garda (Italia). Aunque los cítricos aparentemente eran desconocidos en la cuenca mediterránea en la Antigüedad, en la mitología griega es posible encontrar múltiples referencias a las míticas "manzanas doradas", que bien pueden estar basadas en cidros o incluso pummelos (Tolkowski, 1938; Gabriele *et al.*, 2009; Savo *et al.*, 2011).



Figura 6. Símbolos del festival judío de otoño de Sucot. Fuente: Alamy Stock Photo

1.2.2 Edad Media al siglo XX

El resto de cítricos no fue conocido en el Mediterráneo hasta el periodo helenístico (Wilkins y Hill, 2006). Las mandarinas llegaron a Europa alrededor de 1805 tras su importación desde China a Inglaterra, desde donde fueron llevadas a la cuenca mediterránea. Otras especies como el pummelo (*C. maxima*), limas (*C. aurantifolia*) o naranjas amargas (*C. aurantium*) entraron en la cuenca Mediterránea entre los siglos X y XV d.C., resultado de las conquistas islámicas en territorio del Mediterráneo, así como por la toma de territorios por parte de los cruzados en la zona mediterránea de oriente próximo y a su vez como resultado del comercio (Langgut, 2017). Al final de la Edad Media el cultivo de cítricos como el limón, la lima y las naranjas amargas estaba ampliamente desarrollado en Italia y otros países como España, mientras que la naranja dulce alcanzaría mayor popularidad en el siguiente siglo fruto de las expediciones portuguesas. Los naranjos dulces (*C. sinensis*) seguramente llegaron a Europa a principios del s. XVI.

Durante los siguientes siglos se desarrolló en Europa el conocimiento sobre los cítricos con numerosos trabajos, entre ellos *Agricultura de Jardines* de Gregorio de los Ríos en 1592 así como su introducción en el arte por diferentes artistas italianos del Renacimiento. También destacó su uso como remedio contra el escorbuto, siendo obligatorio su reparto a todos los marinos ingleses desde 1795. Se desarrolló durante el siglo XVII su uso en perfumería para crear agua perfumada ('Acqua di Colonia') a partir de aceites extraídos de flores y frutas de la bergamota cultivada en Calabria, utilizada también hoy en día por sus extraordinarias propiedades aromáticas.

A lo largo de este periodo los cítricos se exportaron a zonas de México, Florida o Brasil, fruto de las expediciones llevadas a cabo por Portugal y España, y más tarde llegaron a zonas como California por medio de los misioneros. Mientras, en el Mediterráneo se irían estableciendo las zonas tradicionales de cultivo de cítricos en las zonas climáticamente más favorables de Italia y España.

1.2.3 Actualidad

Hoy en día los cítricos han alcanzado todos los continentes, siendo una de las frutas más populares por su sabor y propiedades. El desarrollo de este cultivo ha configurado los paisajes de muchas regiones del mundo, incluida la cuenca mediterránea. Los cítricos comerciales de la actualidad son resultado de múltiples hibridaciones interespecíficas, introgresiones, procesos de domesticación y selección de mutaciones somáticas ocurridas de manera natural. Las especies más importantes de cítricos desde un punto de vista agronómico y en base a su producción, ya sea para consumo en fresco o transformación en zumo, son las siguientes:

- Naranja dulce [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]
- Mandarino Clementino [*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka]
- Mandarino Satsuma [*Citrus unshiu* Marc.]
- Híbridos interespecíficos (Tangor)
- Pomelo [*Citrus paradisi* Macf.]
- Limonero [*Citrus limon* (L.) Burm.]
- Lima tahiti [*Citrus latifolia* L.]
- Lima mejicana [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.]

1.3 Taxonomía de los cítricos

La gran variedad de especies del género *Citrus* es el resultado de un largo y complejo proceso de domesticación, y esto, junto con la compatibilidad sexual entre especies del género *Citrus* y algunas especies de géneros relacionados, ha dado lugar a una alta variabilidad fenotípica y genética, que ha quedado reflejada a lo largo de la historia de este cultivo en una compleja, y aún no resuelta taxonomía del género *Citrus*. Además, las diferentes mutaciones e hibridaciones naturales, apoyadas por una

apomixis bastante frecuente dentro del género y un alto grado de heterozigosis, han hecho que la taxonomía y la filogenia de los cítricos sean muy complicadas. (Luro et al., 2017).

Tabla 1. Taxonomía de los cítricos según Swingle (1943).

Sistemática Swingle (1943)		
Sección	Nombre botánico	Nombre común
Subgénero <i>Citrus</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Lima
	<i>C. aurantium</i>	Naranja amarga
	<i>C. indica</i>	Naranja silvestre india
	<i>C. limon</i>	Limón
	<i>C. maxima</i>	Pumelo
	<i>C. medica</i>	Cidro
	<i>C. paradisi</i>	Pomelo
	<i>C. reticulata</i>	Mandarina
	<i>C. sinensis</i>	Naranja dulce
	<i>C. tachibana</i>	Naranja tachibana
Subgénero <i>Papeda</i>	<i>C. latipes</i>	Papeda Khasi
	<i>C. hystrix</i>	Lima Kaffir
	<i>C. micrantha</i>	Biasong
	<i>C. celebica</i>	Papeda Celebes
	<i>C. ichangensis</i>	Limón Ichang
	<i>C. macroptera</i>	Papeda de Melanesia

Tabla 2. Comparación en la taxonomía de *C. sinensis* según los sistemas Swingle y Tanaka. Fuente: Recent insights on *Citrus diversity and phylogeny*

Swingle (1943)	Tanaka (1961)
<i>C. sinensis</i>	<i>C. sinensis</i> Osbeck
<i>C. sinensis</i>	<i>C. tankan</i> Tanaka
<i>C. sinensis</i>	<i>C. temple</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. oblonga</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. funadoko</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. iyo</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. sinograndis</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. luteo-turgida</i> Tanaka
<i>C. sinensis</i>	<i>C. ujukitsu</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. tamurana</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. aurea</i> Hort. ex Tan.
<i>C. sinensis</i>	<i>C. shunkokan</i> Hort. ex Tan.

Existen dos sistemas de clasificación ampliamente aceptados para el género *Citrus*: El de Tanaka (1961), con 156 especies y el de Swingle (1943) con 16 especies (Tabla 1). Un ejemplo que muestra la diferencia a la hora de clasificar taxonómicamente entre estos dos sistemas se puede ver en la Tabla 2. Mientras que Swingle reconoció solo una especie de naranja dulce (*C. sinensis*), Tanaka describió 12 especies para este grupo de cítricos. De todas maneras, ambos sistemas se contradicen frecuentemente debido a la ya comentada compatibilidad sexual entre especies y la frecuente aparición de apomixis que avivan esta variabilidad genética.

Para su clasificación Tanaka propuso una línea teórica (Tanaka, 1954) que cruzaba desde el noroeste de la India, sobre Burma, llegaba hasta la provincia de Yunnan en China y hasta el sur de la isla de Hainan (figura 7). Varias especies de cítricos, como los cidros, los limones, las limas, los pummelos y las naranjas amargas y dulces presumiblemente se originaron al sur de esta línea, perteneciendo a la zona indo-malaya. Por otro lado, las mandarinas y otras especies se originaron al norte de ésta, en la zona este-asiática (Nicolosi, 2007).



Figura 7. Distribución geográfica de las áreas de origen de las especies de cítricos asiáticas divididas por la línea de Tanaka. Fuente: AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean (Luro et al., 2017)

1.4 Morfología del fruto

El fruto cítrico es una baya especializada llamada hesperidio (figura 8), que se presenta dividida en varias secciones o segmentos, cada uno de los cuales está envuelto por una membrana. Dichas secciones se originan a partir del desarrollo del ovario formado por un número variable de carpelos unidos alrededor de un eje floral, formando así los lóculos donde crecen los sacos de zumo junto a las semillas. Entre dos lóculos vecinos aparece un tejido llamado septo, que en general se rompe fácilmente y permite la separación de los lóculos o gajos del fruto maduro (Agustí, 2002).

El tamaño y color del fruto varían con la especie y variedad, así como la forma que puede ser oval, piriforme o esférica.

En el pericarpo, que corresponde a los tejidos que envuelven las semillas, se diferencian tres tipos de tejidos (Agustí *et al*, 2003):

- El exocarpo o flavedo, compuesto por la epidermis y la hipodermis. Es la parte más externa del fruto, cuya coloración depende en gran medida de la temperatura a la que se desarrolla. Puede ser liso o rugoso y de un grosor variable. Normalmente no es comestible, aunque en algunas especies sí lo es y se emplea en la elaboración de mermeladas y postres.
- El mesocarpo o albedo, es la parte intermedia, la parte blanca de debajo de la corteza, compuesta por pectina y celulosa. Puede ser o no comestible.
- El endocarpo, que es la parte más interna y está constituida por los lóculos o gajos. Los lóculos contienen las vesículas de zumo, constituidas por un cuerpo de células completamente vacuolizadas y un pedúnculo que las mantiene unidas a la epidermis dorsal de los carpelos y limitadas lateralmente por los septos. Es el tejido habitualmente consumido, ya en fresco o procesado como zumos.

En el exocarpo, y más precisamente en la región inmediatamente debajo de la epidermis de la fruta, se encuentran las glándulas que contienen el aceite esencial (figura 9).

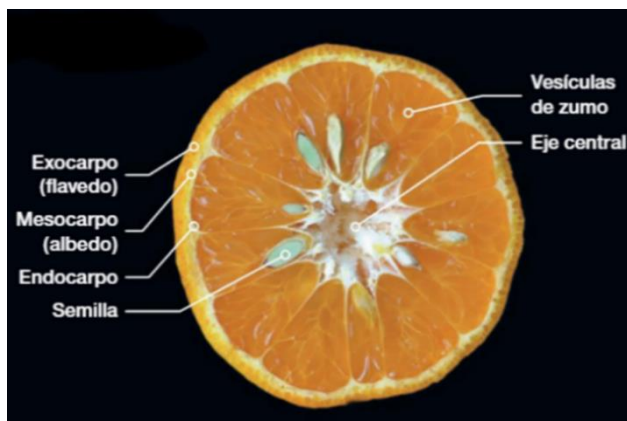


Figura 8. Sección transversal cítrico. Fuente: *Monografías botánicas. Jardín Botánico de la Universitat de València.*
Fuente: Volumen 2: Los cítricos

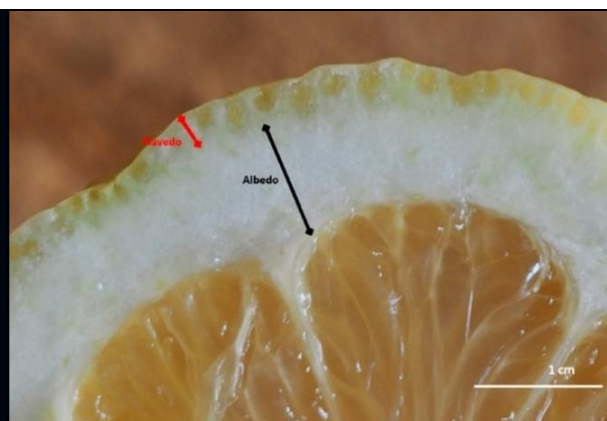


Figura 9. Corte transversal de la corteza de limón. Flavedo y mesocarpo. Las glándulas sebáceas son visibles en el flavedo
Fuente: *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species.* (Caputo *et al.*, 2020)

1.5 El Cidro

1.5.1 Taxonomía

El cidro es una fragante fruta con el nombre botánico de *C. medica*, el mismo en ambos sistemas de clasificación, el de Swingle y el de Tanaka. Es un prominente miembro del género *Citrus*, perteneciente a la familia de las *Rutaceas*, subfamilia *Aurontioideae*. Junto a las otras tres especies básicas del género (pummelo, mandarina y papada) ha contribuido al desarrollo de la inmensa mayoría de cítricos (Barkley *et al.*, 2006).

Investigaciones sobre la diversidad genética del cidro han demostrado que es una especie pura con diversidad intraespecífica relativamente baja, raro en cítricos (Wu *et al.*, 2018). Se han observado en algunos estudios variaciones intraespecíficas más altas en algunos *loci* concretos, pero no en el conjunto del genoma (Ramadugu *et al.*, 2015). Una diversidad intraespecífica tan baja se puede explicar ya sea por aislamiento geográfico durante su evolución temprana y / o su cleistogamia de flores (Zhong *et al.*, 2020).

En su contribución a la gran biodiversidad de los cítricos, el cidro ha actuado siempre como parental masculino, tal como ha sido demostrado en el caso de los limones, limas e incluso variedades tan dispares como el *C. jambhiri* L. o el *C. limonia* Osbeck (Luro *et al.*, 2019; Nicolosi *et al.*, 2000).

A pesar de su relativa homogeneidad genética, las distintas variedades de cidros presentan fenotipos muy diferentes, que se reflejan especialmente en la morfología de los frutos. Esta variabilidad, junto a la derivada de factores genéticos, implica cambios en el metabolismo secundario, pudiendo dar lugar a una amplia quimiodiversidad en la composición de los aceites esenciales.

1.5.2 Principales grupos varietales

La domesticación de los cidros, junto a la selección y propagación de nuevos cultivares e híbridos continuó en Europa como mínimo hasta el siglo XVI. La diversidad de los cidros existentes en Europa puede ser vista en las pinturas del siglo XVIII de Bartolomeo Bimbi (figura 10) al cual se le encargó immortalizar las colecciones de flora y fauna pertenecientes a la familia Medici, que contenían la mayoría de los cultivares cítricos existentes en el Mediterráneo en esa época (Brigand y Nahon, 2016). En la figura 10 podemos ver un detalle de la obra de Bartolomeo Bimbi donde se refleja cómo los diferentes cultivares eran enumerados y clasificados. Hoy en día se han identificado muchas otras variedades: Cottin enumera 193 denominaciones conocidas, incluidos 157 cultivares de *C. medica* y 36 de *C. limonimedica* L., híbridos de Limonero y Cidro (Cottin, 2002).



Figura 10. a. Colección de cítricos Medici, Bartolomeo Bimbi 1715. b. Detalle Colección de cítricos.

No fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando la Familia Tintori en Pescia, Italia, acogió los restos de las colecciones florentinas en lo que es hoy la colección más completa de árboles de cidro.

Los cultivares de cidro se agrupan principalmente en dos tipos (Morton, 1987):

-1) Aquellos con un tono rosado en las nuevas brotaciones vegetativas, botones florales morados y los pétalos teñidos de púrpura (figura 11 izq.), en los que su pulpa es ácida y el recubrimiento interno de la semilla oscuro y chalaza marrón. Ejemplos de este tipo de cultivar son las variedades:

- Diamanti
- Mano de Budha
- Poncire
- Etrog
- Bajoura

-2) Aquellos sin tinte rosado o morado en las nuevas brotaciones vegetativas o flores, la cubierta interna de la semilla incolora y la chalaza amarillo pálido debido a que son incapaces de producir pigmentos flavonoides (figura 11 dcha.), ya sea antocianinas en su hojas y flores o proantocianidinas en sus semillas, y tienen una acidez de pulpa muy baja (Butelli *et al.*, 2019). Entre los cultivares más conocidos está la variedad *Corsica*.

1.5.3 Distribución

Para los cidros las temperaturas inferiores a 10 ° C pueden causar lesiones significativas al árbol y destruir la flor o disminuir la carga de fruta. Por lo tanto, los cidros solo se cultivan comercialmente en lugares donde se pueden garantizar temperaturas cálidas. Los cidros se cultivan ampliamente en China, el sudeste asiático y Corea. Actualmente, los cítricos cultivados para uso religioso se producen en Israel a lo largo de su costa mediterránea (100 ha), también en Italia (10 ha) y Marruecos (15 ha), con una producción menor en Grecia (Klein, 2014). Las plantaciones de fruta procesada se encuentran en Italia (Calabria y Cerdeña), Francia (Córcega) y Grecia (Rodas y Naxos), así como en Puerto Rico y Brasil (Morton, 1987).

1.5.4 Usos

El cidro nunca ha tenido una gran popularidad comercial. Originalmente se empleó en Asia por sus propiedades medicinales y aromáticas. Cuando llegó a Europa su primer uso fue ornamental, posteriormente adquirió importancia por sus fragancias y propiedades medicinales. Hoy en día, en Occidente se estudian estas propiedades en la medicina tradicional, así como sus aplicaciones en el mundo de la cosmética y la gastronomía, actualizando el reflejo de antiguos usos y tradiciones asiáticas.

Las frutas se pueden cosechar cuando están en estado inmaduro y maduro para la producción de *succade* (corteza confitada) en pastelería y repostería. Cuando están maduras se emplean tanto para la producción de aceites esenciales utilizados en cosmética y perfumería, como para saborizantes o en la elaboración de bebidas alcohólicas.

En la industria alimentaria y en gastronomía el cidro es también utilizado para su consumo fresco en cuyo caso se emplea el albedo junto a una pequeña parte de la pulpa o únicamente el albedo, como en el caso del cidro Mano de Buda. También es muy valorado en la industria confitera en países como Inglaterra, Francia y Estados Unidos como ingrediente para tartas, *puddings* y otros dulces (Meena *et al.*, 2011).

En cuanto a su uso en la medicina tradicional, el cultivar "Etrog" era utilizado antaño como remedio contra el escorbuto, problemas pulmonares, intestinales y otros tipos de desórdenes. En la India la piel era utilizada como remedio para la disentería y para combatir la halitosis (Morton, 1987).

El extracto en acetato de etilo de las exfoliaciones de *C. medica* ha exhibido propiedades analgésicas en ratas, y el preparado a partir de su zumo ha resultado también de gran interés al mitigar dolores de migraña en humanos. Por lo tanto, puede ser un candidato como potente agente antiinflamatorio y analgésico (Sood *et al.*, 2009; Jafarpour *et al.*, 2016).

Otros estudios respaldan el uso del aceite esencial de *Citrus medica* como prometedor agente anti-biofilm contra *Listeria monocytogenes*, causante de la listeriosis, una de las infecciones alimentarias más violentas (Gao *et al.*, 2020). Este patógeno es capaz de sobrevivir en muchos entornos hostiles,



Figure 11. Brotações vegetativas y flores de *C. medica* Poncire (izquierda) y *Corsica* (derecha).

Corsica es una variedad incapaz de producir antocianinas.

Fuente: Noemi Controls Production of Flavonoid Pigments and Fruit Acidity and Illustrates the Domestication Routes of Modern Citrus Varieties (Butelli *et al.*, 2019)

como alta salinidad, baja temperatura y bajo pH (Gandhi y Chikindas, 2007). Así mismo, existen proyectos de investigación que estudian las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y contra la enfermedad del Alzheimer de algunos compuestos extraídos de las cidras (Adedeji *et al.*, 2007).

En el terreno de la industria cosmética y perfumería, los aceites esenciales de las flores o los aceites de *petitgrain* de ramas y hojas jóvenes se utilizan en Europa principalmente para perfumería (Venturini *et al.*, 2010), mientras que en zonas del sudeste asiático su uso es principalmente medicinal u ornamental (Morton, 1987).

1.5.5 Importancia económica

Como ya se ha comentado, esta fruta no es valorada por su contenido en zumo y pulpa, sino por su alto contenido en aceites esenciales y cualidades aromáticas, siendo apreciada también por sus aplicaciones medicinales (Kima *et al.*, 2013). Por todo ello, su producción no puede ser comparable con aquellos cítricos producidos para su consumo en fresco o su procesado en zumos industriales.

Aproximadamente 1,6 millones de piezas de frutas se comercializan anualmente, de las cuales cerca del 90% se produce para Israel. Debido a los estándares de calidad extremadamente altos exigidos para las cidras utilizadas en el ritual hebreo de la Fiesta de los Tabernáculos, para los cuales solo se usan piezas que estén libres de cualquier tipo de fisiopatía y posean unas cualidades visuales perfectas en cuanto a color y tamaño, se estima que solo del 10 al 15% de la fruta producida se cosecha realmente para ese mercado especializado. Un pequeño porcentaje de la fruta sobrante se usa para hacer cortezas o rodajas de cidra confitadas, pero la gran mayoría se descarta. La producción mundial de cidro para corteza seca o confitada se estima en 7.000 t anuales. La mayor parte de la producción se divide entre Puerto Rico y la región mediterránea. En la región mediterránea se cultivan menos de 10 ha de cidros para la fabricación de bebidas alcohólicas (Klein, 2014).

1.6 Aceites esenciales

1.6.1 Definición

Los aceites esenciales (AE)¹ son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes de diferente naturaleza química (Alzamora *et al.* 2001; Cerutti y Neumayer, 2004), que están constituidos por sustancias más o menos volátiles, producto final del metabolismo secundario de las plantas. Se obtienen mediante diferentes técnicas a partir de materias primas naturales y se caracterizan, desde el punto de vista sensorial, entre otras cualidades, por su impacto olfativo.

1.6.2 Usos

Los AE han tenido un uso tradicional en la industria cosmética, perfumería y aromaterapia. Actualmente, la tendencia a sustituir productos químicos de síntesis en diversos campos tales como los tratamientos fitosanitarios o la conservación de alimentos, por sus posibles efectos medioambientales, ha dado lugar a un creciente interés por el uso de productos naturales tales como distintos tipos de extractos vegetales y particularmente los AE, siendo estos uno de los productos naturales más importantes derivados de las plantas por sus diversas propiedades biológicas y usos medicinales (Mancini *et al.*, 2014). Los AE se han utilizado en diferentes ámbitos más allá de los citados anteriormente, con una creciente importancia desde el punto de vista farmacológico, así como en la industria agronómica y alimentaria por su amplio espectro de propiedades antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y antifúngicas (Ali *et al.*, 2015). Cabe citar, en este sentido, su aplicación en tratamientos fitosanitarios alternativos, siendo numerosos los estudios que demuestran la posible aplicación de los AE en tratamientos postcosecha como biofilm para conservar alimentos, así como para su uso en tratamientos de fitotoxicidad selectiva en malas hierbas (Fan *et al.*,

¹ Siglas aceite esencial

2014; Ibáñez y Blázquez, 2018; Verdeguer *et al.*, 2020). Estas industrias se benefician por tanto directamente de la investigación sobre los aceites esenciales.

Desde la perspectiva de este trabajo, centrado en los aceites esenciales obtenidos de cidros, es de particular interés su uso en el ámbito gastronómico, ya que al tratarse de fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma, pueden contribuir a la mejora de las cualidades organolépticas de los alimentos. Desde que Claude-Joseph Geoffroy estableció las bases de que lo que se conocería como la Gastronomía molecular al comenzar a mostrar interés por las aplicaciones culinarias de los aceites esenciales, se ha podido apreciar la interacción y la colaboración entre la ciencia / ingeniería y la cocina en técnicas como la microencapsulación (Karimi *et al.*, 2020).

1.6.3 Propiedades físicas

Los AE son líquidos a temperatura ambiente, volátiles y normalmente incoloros. En general, su densidad es inferior a la del agua (los aceites esenciales de clavo o canela constituyen excepciones). Son liposolubles y, por tanto, solubles en los disolventes orgánicos como hexano o diclorometano. Pueden ser arrastrados por corrientes de vapor de agua, siendo muy poco solubles en ella, pero aun así pueden proporcionarle aroma al agua, de ahí que los hidrolatos, fase acuosa subproducto de la obtención de AE por destilación, posea valor comercial (Bruneton, 2001).

1.6.4 Composición química

Cuantitativamente, los contenidos en aceite esencial son muy variables. Pueden encontrarse desde rendimientos del orden del 0.1% (m/m) en hojas frescas de cítricos, hasta de un 6% (m/m) en semillas como las de alcaravea (*Carum carvi* L.), (Sedlakova *et al.*, 2003). Dentro del contenido en aceite esencial se pueden distinguir dos fracciones:

-Fracción volátil, que constituye el 85-99% del total del aceite y contiene principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos junto a sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos y ésteres, tanto alifáticos como aromáticos (compuestos fenólicos, como el timol o el carvacrol, por ejemplo). Asimismo, también puede ser notable la presencia de fenilpropanoides y de diferentes compuestos alifáticos oxigenados tales como el hex-2-enal o el octan-3-ol. Se definen colectivamente como compuestos orgánicos volátiles (Buettner y Schieberle, 2001).

-Fracción no volátil residual con un rango del 1 al 15% del total del aceite que contiene hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, cumarinas, psorales y flavonoides.

Así, los aceites esenciales son mezclas de una elevada quimiodiversidad cuyos compuestos se caracterizan, desde el punto de vista metabólico, por orígenes biosintéticos distintos: la ruta del mevalonato, correspondiente a los terpenoides, y la del ácido shikímico, que da lugar a los fenilpropanoides.

1.6.4.1 Terpenos

Los compuestos principales de los AE, obtenidos mediante cualquier método de extracción, son los terpenoides. Estructuralmente, pueden considerarse constituidos por la unión de moléculas de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) a través de uniones 1,4 cumpliendo la regla de Wallach (monoterpenos regulares) o no (monoterpenos irregulares). Desde el punto de vista de su origen metabólico derivan principalmente de la ruta del mevalonato que conduce a monoterpenos y sesquiterpenos., formados, respectivamente, por dos o tres unidades isoprenicas de 5 carbonos.

1.6.4.1.1 Monoterpenos (C10)

Son las moléculas más abundantes en los AE, pudiéndose encontrar como hidrocarburos o como sus derivados oxigenados (alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas, éteres, ésteres y epóxidos). Habitualmente se trata de monoterpenos regulares y estos pueden ser acíclicos (mirceno, ocimenos), monocíclicos (D-limoneno, γ -terpineno, *p*-cimeno) o bicíclicos (pinenos) (figura 12). Constituyen más

del 90% de muchos aceites esenciales, como es el caso de los obtenidos del exocarpo y las hojas de los cítricos (González *et al.*, 2010).

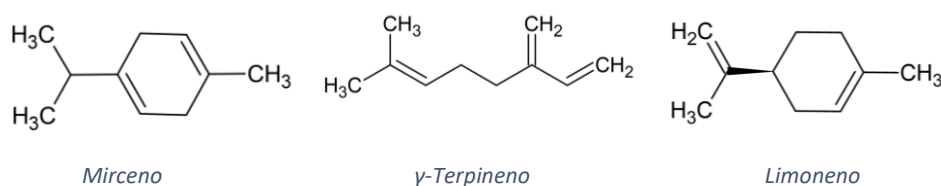


Figura 12. Estructuras de algunos monoterpenos

Como ya hemos indicado anteriormente los monoterpenos presentan muchas veces funciones oxigenadas en su estructura debido a la reactividad de los cationes intermediarios que aparecen en las rutas metabólicas. Así, podemos encontrar monoterpenos con los siguientes grupos funcionales:

- Alcoholes: acíclicos (geraniol, linalol, citronelol), monocíclicos (mentol, terpinen-4-ol), bicíclicos (borneol, fenchol).
- Aldehídos: generalmente acíclicos (geranial, neral, citronelal).
- Cetonas: acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, isomentona, carvona, pulegona), bicíclicas (alcanfor, fenchona).
- Ésteres: acíclicos (acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo) y monocíclicos (acetato de mentilo, acetato de isobornilo). Se considera que tienen un papel fundamental en el aroma de los frutos (óxidos de linalol, óxidos de rosa).
- Fenoles: timol, carvacrol.

1.6.4.1.2 Sesquiterpenos (C15)

Compuestos por tres unidades de isopreno (figura 13):

- Acíclicos (bisaboleno, farneseno)
- Monocíclicos (curcumeno, zingibereno)
- Bicíclicos (guaiazuleno)

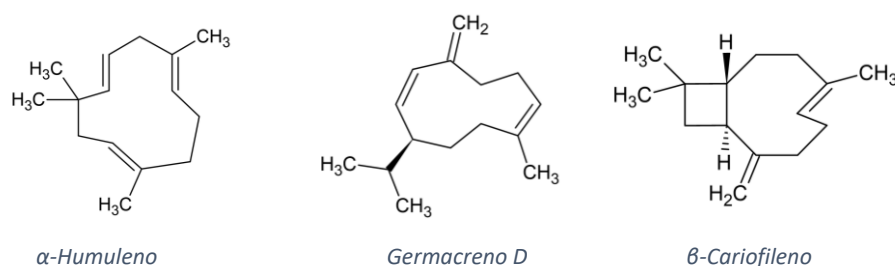


Figura 13. Estructuras de algunos sesquiterpenos

1.6.4.1.3 Diterpenos

Son terpenos con C20, formados por 4 unidades isoprénicas (figura 14).

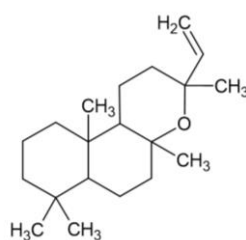


Figura 14. Óxido de manool

1.6.4.2 Otros

Cabe citar, en primer lugar, los fenilpropanoides (figura 15), concretamente, el aldehído cinámico (canela). Desde el punto de vista metabólico son sintetizados a través de la ruta del ácido shikímico. También forman parte de los aceites esenciales compuestos alifáticos como hex-2-enal, octan-3-ol, octan-3-ona, etc.

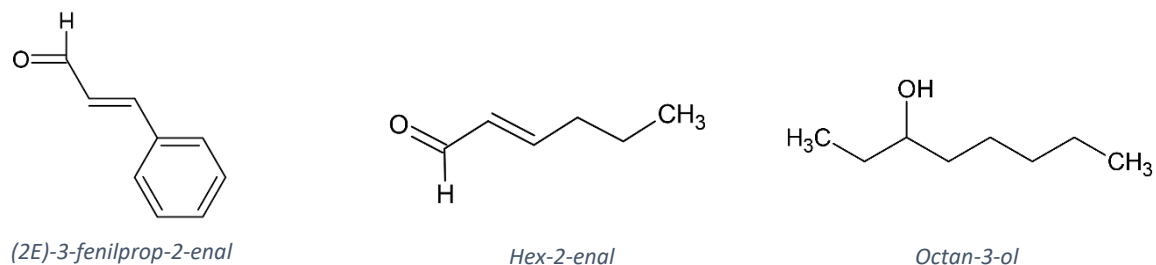


Figura 15. Estructuras de algunos fenilpropanoides

1.6.5 Aceites esenciales en las plantas

1.6.5.1 Funciones

Los AE cumplen una función semioquímica notablemente relevante desde el punto de vista ecológico. Los compuestos volátiles que forman los aceites esenciales a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros) (figura 16) mediante la comunicación, bien entre partes de la planta, bien dentro de sus propias para producir cambios en su comportamiento defensivo por medio de señales provocadas por los compuestos volátiles frente a ataques de diferente naturaleza (Peñuelas, 2004). A veces, ciertos componentes de los AE pueden tener una acción teletóxica sobre la germinación de plantas competidoras, actuar como respuesta a factores ambientales o también para atraer insectos polinizadores, así como a enemigos naturales de las posibles plagas por las que se puedan ver afectadas (Iriti y Faoro, 2009).

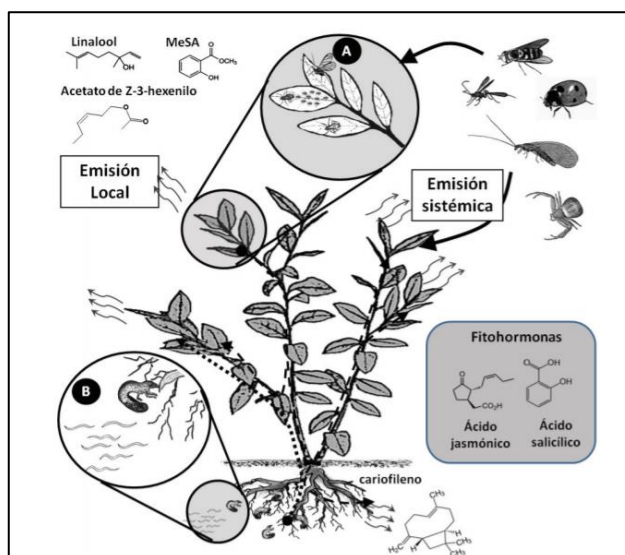


Figura 16. Los compuestos orgánicos volátiles. Fuente: *La Ecología Química de Interacciones Tri-Tróficas* (Rodríguez-Saona, 2012)

Cabe indicar, no obstante que los compuestos volátiles secretados incluyen no solo los compuestos anteriormente citados: mono y sesquiterpenos, etc., característicos de los aceites esenciales, sino también grupos especializados como fitohormonas (etileno, salicilato de metilo (MeSA), ácido jasmónico y otros) (War *et al.*, 2011).

1.6.5.2 Localización

Los AE, se pueden encontrar en todos los órganos vegetales: flores, hojas, raíces, rizomas, corteza, frutos o semillas, pudiendo variar cualitativa y cuantitativamente en cada especie según su localización.

La síntesis y acumulación del aceite esencial generalmente va asociada a la presencia de estructuras histológicas especializadas en determinados tejidos, frecuentemente sobre o próximo a la superficie de la planta donde podemos encontrar (Imagen 21):

- Células con esencia
- Pelos secretores estipitados
- Cavidades secretoras esquizógenas o esquizo-lisígenas
- Canales secretores

1.6.5.3 Factores de variabilidad de los aceites esenciales.

La composición química de los AE no solamente depende del taxón del que se obtienen, sino que muestra una elevada variabilidad como consecuencia de factores ecológicos, ontogenéticos, órgano de la planta del que se obtienen, método de extracción, etc. Estos factores pueden ser:

- De origen botánico: Es evidente que la composición de un aceite esencial dependerá de la especie productora. La denominación botánica y el origen geográfico deben ser especificados para saber con exactitud los componentes mayoritarios del aceite esencial.
- Quimiotipo: Para especies vegetales botánicamente homogéneas y cariológicamente estables se pueden distinguir también diferencias según la raza química predominante, ligadas en muchas ocasiones a orígenes geográficos específicos.
- Ciclo vegetativo (ontogénesis): Para una especie dada, la proporción de los diferentes constituyentes, de su aceite esencial, puede variar de manera importante a lo largo de su desarrollo. Ciertos componentes pueden ser predominantes al comienzo del desarrollo para luego derivar en la acumulación de otros (Llorens-Molina *et al.*, 2020).
- Localización de las células secretoras: Como ya se mencionó, las células que contienen aceites esenciales pueden ubicarse en varias partes de la planta. Se conocen dos tipos diferentes de células de aceite esencial. Las células superficiales, como por ejemplo, los pelos glandulares ubicados en la superficie de la planta, comunes en muchas hierbas como el orégano, la menta, la lavanda, etc., y las células incrustadas en el tejido vegetal, que pueden ser, bien células aisladas que contienen las secreciones (como en cítricos y hojas de eucalipto), o bien formando capas de células que rodean el espacio intercelular (canales o cavidades secretoras) (Liang *et al.*, 2006). Dependiendo de la ubicación de las células encontraremos diferentes perfiles en cuanto a composición dependiendo del órgano de la planta donde se encuentren (Llorens-Molina *et al.*, 2016).
- Factores del entorno: Las condiciones climáticas y la naturaleza del suelo, influyen directamente en la producción de aceite esencial (Luro *et al.*, 2020) dando lugar a diferentes ecotipos. Así mismo, en especies cultivadas, pueden influir las prácticas de cultivo agronómicas: densidad de plantación, intensidad y modalidades de riego, utilización de abonos, etc. Aunque no suelen dar lugar a cambios significativos en la composición de los AE (al menos cualitativamente), pueden controlarse para optimizar su producción (Llorens-Molina *et al.*, 2018).

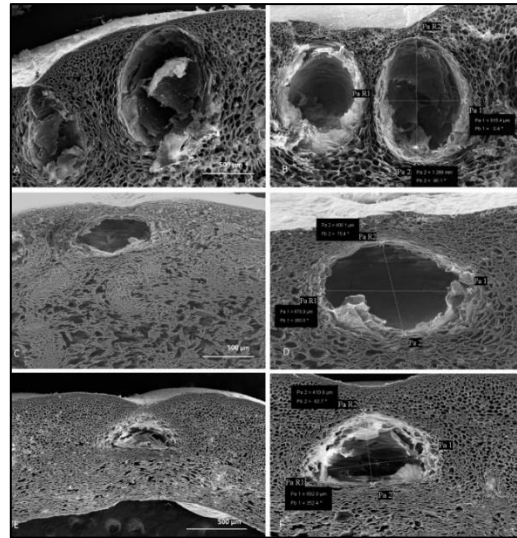


Figura 17: Micrografías SEM de cortes transversales de corteza de *C. limon* (A, B), *C. bergamia* (C, D) y *C. myrtifolia* (E, F). Medidas de las glándulas sebáceas de las tres especies: lemon (B), bergamot (D) and chinotto (F). Fuente: *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species* (Caputo *et al.*, 2020)

- Procedimiento de obtención: La composición del producto comercial puede ser diferente de la contenida en los órganos secretores del vegetal, y los productos obtenidos por hidrodestilación raramente serán idénticos a los resultantes por extracción con disolventes volátiles (Fatemeh *et al.*, 2006; Habibullah y Devi, 2016).

1.6.6 Métodos de obtención de los aceites esenciales

Se utilizan diferentes métodos para aislar los aceites de diversos materiales vegetales. Aunque es relativamente sencillo aislarlos, ya hemos visto que su composición puede variar dependiendo del método de extracción utilizado (Stratakos y Koidis, 2016):

Destilación por arrastre de vapor de agua

La destilación al vapor es el método más popular utilizado para extraer y aislar AE de plantas para su uso como productos naturales. Esto sucede cuando el vapor arrastra los compuestos volátiles del material vegetal, que eventualmente pasan por un proceso de condensación y recolección. A escala industrial, el vapor pasa a través del material vegetal condensando después junto al aceite esencial, separándose éste por su diferencia de densidad y su inmiscibilidad con el agua. A escala de laboratorio se utilizan preferentemente equipos como el Clevenger, en el que el material vegetal se introduce en el agua sometida a ebullición (hidrodestilación).

Recientemente, la hidrodestilación ha sido objeto de importantes modificaciones basadas en el empleo de microondas, que permiten optimizar la extracción del aceite esencial utilizando condiciones menos agresivas que la acción prolongada del agua en ebullición (Yu *et al.*, 2018)

Prensado en frío

Este método también se llama “expresión” o “escarificación” y se usa en particular para las cortezas de los frutos cítricos. Toda la fruta se coloca en un dispositivo que la perfora mecánicamente para romper los sacos de aceite esencial, que se encuentran en la parte inferior de la corteza. El aceite esencial y los pigmentos son dirigidos hacia el área de recolección.

Los dos métodos anteriores son los que tradicionalmente se han utilizada para la obtención de aceites esenciales, cuya definición se halla precisamente vinculada al empleo de estos métodos. No obstante, existen otros métodos que permiten aislar la fracción volátil y semivolátil del material vegetal y que son citados a continuación.

Extracción de dióxido de carbono supercrítico (S-CO₂)

Los AE derivados de la destilación al vapor varían en sus cualidades dependiendo de las temperaturas, presiones y tiempo de aplicación del proceso. El proceso de extracción de CO₂ supercrítico produce aceites de mayor calidad ya que no han sido alterados por la aplicación de elevadas temperaturas con lo cual ninguno de los componentes del aceite se daña por el calor. Un ejemplo lo observamos en la calidad del aceite de bergamota hidrodestilado, que es menor debido a la hidrólisis del acetato de linalilo y la isomerización del linalol (Mondello *et al.*, 1998)

Por lo tanto, la diferencia entre la destilación tradicional y la extracción supercrítica es que, en lugar de agua caliente o vapor, el CO₂ se usa como solvente en este último método. El proceso de extracción supercrítico opera a temperaturas entre 35-40°C, mientras que la destilación de vapor opera a temperaturas entre 60-100°C, dependiendo de la presión de trabajo. Así, con la extracción supercrítica se obtiene una composición química más compleja, ya que contiene una gama más amplia de componentes. Sin embargo, presenta la desventaja de que también se extraen compuestos de masa molecular más elevada, escasamente volátiles, y que no contribuyen al aroma en la misma medida que los más volátiles.

Extracción con disolventes

Este método emplea disolventes para extraer los AE del material vegetal. Es el más adecuado para materiales vegetales que producen bajas cantidades de aceite esencial ya que no requiere de altas temperaturas y por tanto no modifica ninguno de los componentes del aceite. Con este método además de los compuestos volátiles también podemos aislar los compuestos no volátiles. Este método es comúnmente usado en la industria de perfumería y cosmética.

Maceración o *Enfleurage*

Los aceites macerados también se conocen como aceites infundidos. Se crean cuando los aceites portadores se usan como solventes para extraer propiedades terapéuticas del material vegetal. No se usa comúnmente en la actualidad, pero es uno de los métodos más antiguos de extracción de aceites esenciales que implementa el uso de grasas. Al final de este proceso la grasa, vegetal o animal, se funde con los compuestos de fragancia de la planta. Las grasas que se usan son inodoras y sólidas a temperatura ambiente. El proceso de *enfleurage* se puede hacer "caliente" o "frío". Es un método obsoleto sin aplicaciones en la industria.

1.6.7 Importancia económica de los aceites esenciales

Como hemos visto, los aceites esenciales son altamente usados en la industria cosmética y perfumería, en la industria de bebidas gaseosas y alcohólicas, y en la alimentaria en general. Ha habido un aumento en la producción de medicamentos, tónicos y cuidados corporales a base de aceites esenciales de plantas. Además, los productos de aromaterapia están ganando popularidad en Europa por sus ya comentadas propiedades reconstituyentes consideradas beneficiosas para la salud.

En la figura 18 podemos ver el valor de la producción de AE en la Unión Europea (EU-28) de 2014 a 2018. En 2018 aproximadamente mil millones de euros, según estimaciones de la Comisión Europea.

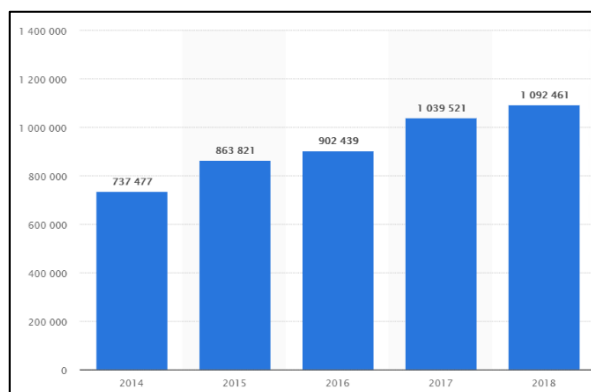


Figura 18. Valor de producción de aceites esenciales en la Unión Europea (EU-28) de 2014 a 2018 en miles de euros. Fuente: www.Statista.com (2020)

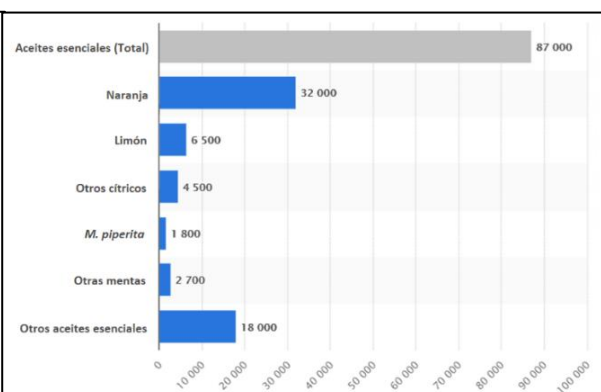


Figura 19. Importación de volumen de aceites esenciales a Europa en 2017 en toneladas, por tipo de aceite. Fuente: www.Statista.com (2020)

Como podemos observar en la figura 19 el volumen de importación de AE a países europeos en 2017 varía según el tipo de aceite. Ese año se importaron a Europa aproximadamente 87.000 toneladas de AE. La naranja fue la especie más popular, con 32.000 toneladas importadas, siendo Brasil el país que más aporta a la producción de este aceite con más del 60% de la producción mundial (Marketwatch, 2020)

La demanda global del mercado de AE se estimó en 247,08 miles de toneladas en 2020 y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta del 7,5% de 2020 a 2027. Existe la expectativa que el mercado se vea impulsado por la creciente demanda de las principales industrias finales, como alimentos y bebidas, cuidado personal y cosméticos, y aromaterapia. Asimismo, se prevé que varios posibles beneficios para la salud relacionados con los aceites esenciales impulsarán su demanda en aplicaciones farmacéuticas y médicas (Grandview research, 2020).

1.6.8 Análisis de los aceites esenciales. Métodos y fundamentos teóricos

El análisis de la composición de un AE, normalmente de elevada complejidad, se caracteriza por la dificultad a la hora de separar, identificar y cuantificar los diferentes compuestos, muchos de ellos con estructuras moleculares muy similares.

1.6.8.1 Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases, los compuestos a analizar se vaporizan y eluyen mediante la fase gaseosa móvil, el gas portador, a través de la columna. Los analitos se separan en función de sus presiones de vapor relativas y afinidades por la fase estacionaria. En general, la fracción volátil de un aceite esencial se analiza por cromatografía de gases (GC), mientras que la no volátil por cromatografía líquida (LC).

Como podemos observar en la figura 20, a la salida de la columna cromatográfica, los analitos emergen separados en el tiempo. Los analitos son luego detectados y se registra una señal generando un cromatograma (figura 20), que es un gráfico de señal *versus* tiempo, e idealmente con picos que presentan una forma de curva de distribución gaussiana (Ettre y Hinshaw, 1993). El detector convierte esta interacción en una señal electrónica que se envía al sistema de datos. La magnitud de la señal se traza en función del tiempo (desde el momento de la inyección), este tiempo de retención puede estar relacionado con la identidad del soluto ya que es el tiempo que tarda en salir un determinado analito de la columna. Algunos detectores responden a cualquier soluto que se eluye en la columna, mientras que otros responden solo a solutos con estructuras, grupos funcionales o átomos específicos; se denominan detectores selectivos. La información contenida en el cromatograma se puede utilizar para el análisis cualitativo y cuantitativo según los detectores usados.

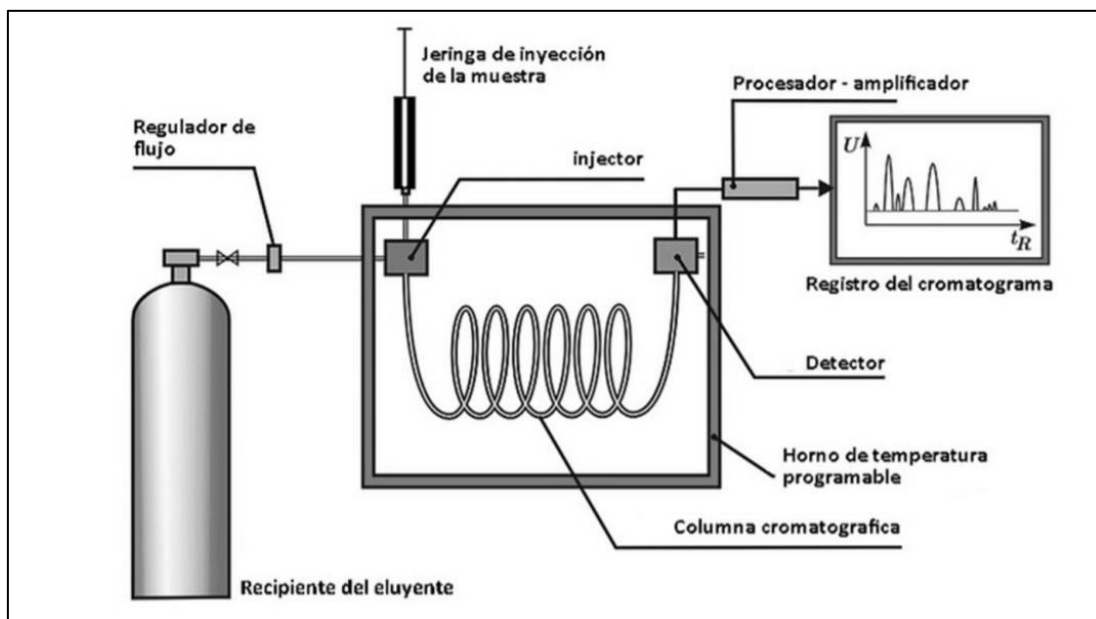


Figura 20. Esquema de un cromatógrafo de gases. Fuente: Aula Virtual

1.6.8.2 Cromatografía de gases MS y FID

En la cromatografía de gases con detector por espectroscopia de masas, una vez que los componentes abandonan la columna de GC, son ionizados utilizando fuentes de ionización química o electrónica, que dan lugar a la fragmentación de la molécula de modo que los iones producidos se separan en función de su diferente relación masa/carga. El método de identificación más frecuente y simple en GC-MS consiste en la comparación de los espectros de masas desconocidos adquiridos con los contenidos en una biblioteca de MS de referencia (Vekey, 2001).

Sin embargo, los esteroisómeros, cuando se analizan por medio de GC-MS, pueden identificarse incorrectamente; un inconveniente que a menudo se observa en el análisis de aceites esenciales. La composición de los aceites esenciales está representada principalmente por terpenos, que generan espectros de masas muy similares (figura 21); por lo tanto, un factor de coincidencia favorable no es suficiente para la identificación y la asignación de picos se convierte en una tarea difícil. Para aumentar la confiabilidad de los resultados analíticos y abordar la determinación cualitativa de composiciones de muestras complejas por GC-MS, los índices de retención constituyen una herramienta efectiva (Zellner *et al.*, 2010).

El uso de índices de retención junto con la información estructural proporcionada por GC-MS está ampliamente aceptado, y se usa habitualmente para confirmar la identidad de los compuestos (también, junto a la inyección de patrones puros de referencia). Además, cuando se incorporan a las bibliotecas de MS los índices de retención se pueden aplicar como un filtro, lo que acorta la rutina de búsqueda de resultados coincidentes y mejora la credibilidad de la identificación de MS (Costa *et al.*, 2007).

Otro tipo de detector es el detector de ionización de llama (FID) comúnmente utilizado en cromatografía de gases. Durante su funcionamiento, el gas portador que sale de la columna se mezcla con hidrógeno y los compuestos eluidos se queman con una llama en un ambiente rico en oxígeno. Estos iones son detectados por un electrodo colector que se coloca sobre la llama. La magnitud de la corriente que generan estos iones está relacionada con la masa de carbono que llega al detector, por lo cual las áreas relativas de los picos, expresadas como porcentajes del área total, son habitualmente aceptadas como una aproximación cuantitativa útil a la composición del aceite esencial.

1.6.8.3 Índices de retención

Teniendo en cuenta que los componentes del aceite esencial, como los terpenos y sus derivados oxigenados, frecuentemente presentan puntos de ebullición similares, estos se eluyen en un rango de tiempo de retención estrecho en una columna no polar. Para superar esta limitación, el método analítico puede modificarse aplicando un programa de temperatura que permita ampliar el rango de elución del aceite o usando una fase estacionaria polar o semipolar, ya que los compuestos oxigenados quedan más retenidos que los hidrocarburos.

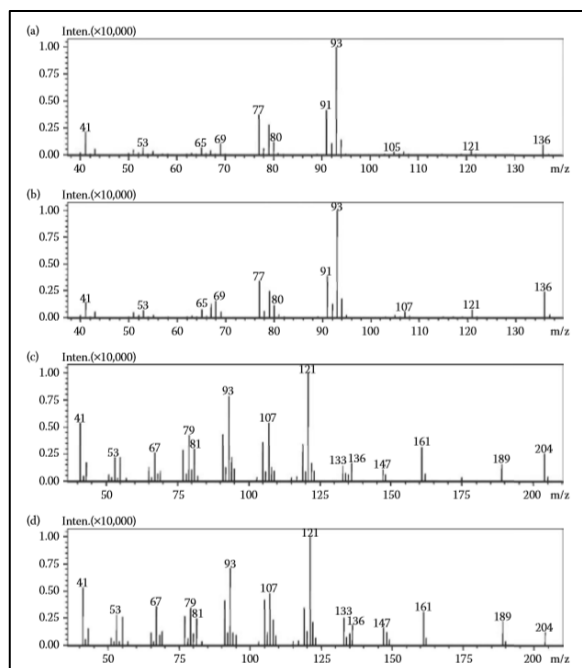


Figura 21. Representación de la similitud entre espectros de masas de monoterpenos: sabineno (a) y β -felandreno (b); y sesquiterpenos: biclogermacreno (c) y germacreno (d). Fuente: *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Zellner *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta los análisis por cromatografía de gases que utilizan un detector de ionización de llama (FID), un detector de conductividad térmica (TCD) u otros detectores que no proporcionan información estructural de las moléculas analizadas y los datos de los tiempos de retención, se utilizan los denominados “índices de retención” como criterio principal para la asignación de picos. El sistema de índice de retención se basa en el hecho de que se hace referencia a cada analito en términos de su posición entre los datos comparativos de retención de dos compuestos de referencia. Normalmente se utilizan n-alcenos para esto. De esta manera el cálculo del índice se basa en una interpolación lineal o logarítmica de los valores de los tiempos de retención de cada compuesto en relación con los tiempos de retención de los compuestos de referencia (serie de los n-alcenos). En el primer caso, nos referimos a los índices de retención lineal (Van den Dool y Kratz, 1963) ecuación basada en el trabajo desarrollado por Kováts (Kováts, 1958), estos son aplicados cuando las condiciones no son isotérmicas (programa de temperatura). Los valores calculados usando este enfoque se denominan comúnmente en la literatura como Índice de Retención Lineal (LRI) (Ettre, 2003). Los calculados mediante interpolación logarítmica -Índices de Kováts (1958)- se utilizan cuando la elución se desarrolla en condiciones isotermas.

2. Justificación y objetivos

Dado el elevado interés práctico de los aceites esenciales en perfumería, cosmética, medicina, gastronomía y como posible alternativa natural a ciertos aditivos para la industria alimentaria, y la tradición medicinal y terapéutica de los cidros, es de notable interés el análisis de la composición del aceite esencial de variedades de cidros, algunas aún poco conocidas y estudiadas. Por otra parte, un factor potencial de variabilidad en dicha composición es el grado de maduración del fruto. Conocer su influencia puede contribuir a lograr una composición óptima desde el punto de vista sensorial e industrial

Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la variabilidad química de los aceites esenciales de distintos cultivares de cidro, considerando el grado de maduración del fruto. Para ello se pretende desarrollar un proceso de extracción a escala de laboratorio que permita reproducir con la máxima fidelidad posible la composición de los aceites esenciales obtenidos industrialmente. Concretamente se pretende:

1. Cuantificar de manera rigurosa los compuestos del aceite esencial según variedad. Para ello se seguirán las normas recientemente propuestas por IOFI (International Organization of the Flavor Industry) utilizando factores de respuesta relativos al octanoato de metilo como estándar interno frente a la cuantificación aproximada tradicional basada en la normalización de las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos por FID².
2. Estudiar la variación en la composición del aceite esencial entre variedades y entre el estado inmaduro y maduro del fruto de cada variedad.

² Flame ionization detector (Detector de ionización de llama)

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Los frutos de las diferentes variedades de *C. medica* fueron recogidos en dos estadios diferentes de madurez: El primero en noviembre en estado inmaduro y el segundo en febrero con la fruta ya en estado maduro. Los frutos proceden de variedades de cidro injertadas en patrones de *C. macrophylla* Wester.

Los árboles se mantienen en un sistema fundamentado en las bases de Agricultura Integrada, sin el empleo de insecticidas ni fungicidas químicos, además de estar sobre una cobertura natural, sin la aplicación de herbicidas. Asimismo, solo se realizan podas suaves para dejar que los árboles se expresen según su genética con el objetivo de observar diferencias y poder caracterizarlos mejor.

3.1.1 Variedades

En este trabajo analizaremos el aceite esencial de 10 variedades diferentes de cidro:

C. medica Amalfi

C. medica Etrog

C. medica Aurantiata

C. medica Pane

C. medica Bajoura

C. medica Piretto

C. medica Corsica

C. medica Rugosa

C. medica Maxima

C. medica Sarcodactylis "Mano de Buda"

El material vegetal usado fue cedido por Todolí Citrus Fundació. (<https://todolicitrus.org/>)

3.2 Metodología

3.2.1 Materiales

- Agitador orbital Rotabit J.P. SELECTA®.
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Colorímetro - Chroma meter, CR 400/410, Konica-Minolta
- Diclorometano CH₂Cl₂ para análisis deresiduos po GC, estabilizado con aproximadamente 50ppm de amileno. Scharlau
- Equipo de centrifugación - DIGICEN 20R Orto-Alresa
- Equipo Rotovapor Laborotta4001-Heidolph
- Equipo ultrasonidos Elma- S 30 Elmasonic
- Reactivos Sigma-Aldrich:
 - Octanoato de metilo 99%
 - Limoneno 98%
 - γ-terpineno 97%
 - β-cariofileno 95%
 - Citral 96%
- Hexano – Scharlau
- Malla filtro de acero inoxidable AISI 304 de 40 mesh
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo
- Sulfato de sodio Na₂SO₄ anhidrido par análisis. Merck KGaA
- Vasos de precipitados

3.2.2 Determinación del grado de maduración

Con el objetivo de medir de manera objetiva el color de las piezas de fruta recolectadas, y así de manera indirecta el grado de madurez, se usó un colorímetro utilizando coordenadas Hunter Lab que determina el color de un objeto dentro del espacio de color y muestra los valores para cada coordenada L^* , a^* , y b^* (figura 22). El colorímetro nos indica para cada coordenada el promedio de tres repeticiones realizadas automáticamente en cada medición. Este es un método usual para la determinación de color en frutas, especialmente cítricos. (Di Rauso Simeone *et al.*, 2019)

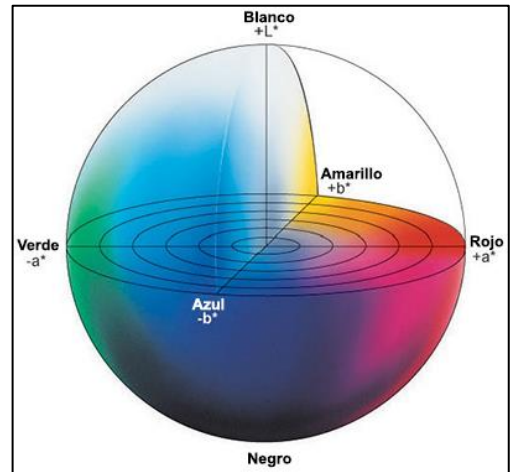


Figura 22. El modelo L^*A^*B de CIELAB color espacio. Fuente: HunterLab, Reston, VA

3.2.3 Metodología del proceso de extracción

Tras la medición de color se procedió a la extracción del aceite esencial. Se realizó una extracción con solventes debido a las características ya mencionadas, en concreto el diclorometano, proceso ya experimentado con anterioridad (Llorens-Molina *et al.*, 2017). A esta metodología se introdujo la variación del uso de ultrasonidos para mejorar la eficacia del proceso (Esclapez *et al.*, 2011). En todas las variedades y estados de maduración el proceso de extracción fue el mismo.

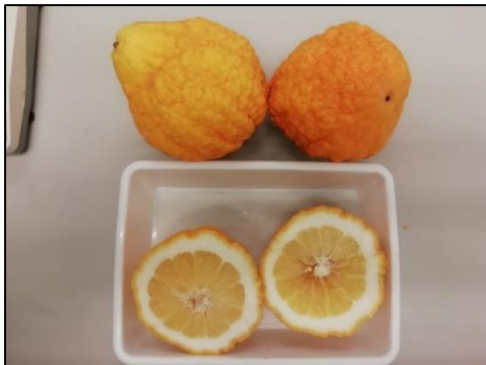


Figura 23. *Citrus medica Aurantiata*



Figura 24. Sección transversal *C. medica Aurantiata*

En primer lugar, se separó el exocarpo o flavedo de cada pieza y se pesó para luego poder obtener los rendimientos (figura 24). Una vez pesado el material vegetal se introdujo en tandas en una salmuera, ya que la adición de sales a medios acuosos provoca una reducción de la solubilidad de los analitos en



Figure 25. Pesado del exocarpo

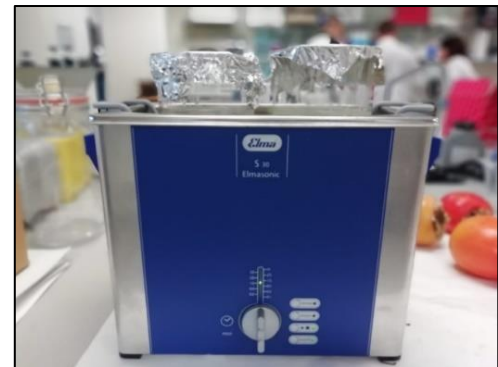


Figure 26. Proceso ultrasonidos

el medio en cuestión, favoreciendo así el proceso de extracción y propiciando la compactación de las pectinas en la interfase durante la posterior centrifugación (figura 29) (Cabredo-Pinillos *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2020). La mezcla se trituró con la intención de romper todas las glándulas de aceite esencial posibles y propiciar su disgregación para luego ser sometida a la acción de ultrasonidos con el objetivo

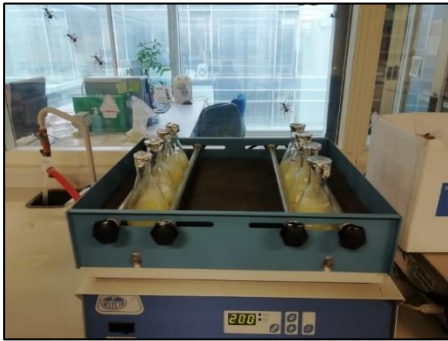


Figura 27. Agitador orbital

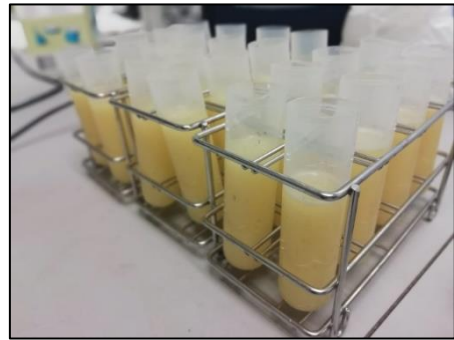


Figura 28. Tubos de centrifugación



Figura 29. Equipo de centrifugación

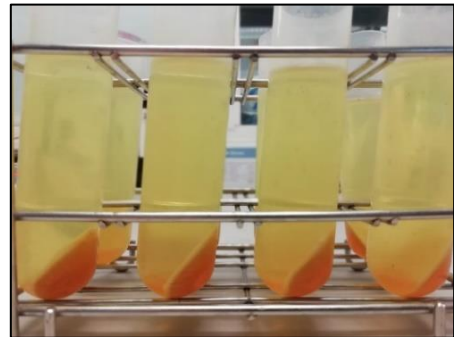


Figura 30. Fases tras centrifugación

de mejorar la eficiencia del proceso, el cual fue llevado a cabo a T ambiente (figura 26) (Habibullah *et al.*, 2016; Belhachat *et al.*, 2018; Mabayo *et al.*, 2018).

Una vez realizado el tratamiento por ultrasonidos, se procedió al filtrado de las muestras con el objetivo de eliminar todos los sólidos mediante el uso de una malla filtro de acero inoxidable AISI 304 de 40 mesh³. La emulsión resultante se distribuyó en matraces Erlenmeyer en cantidades de 25 ml a los cuales se les añadió 2 ml de diclorometano. Los matraces se agitaron durante 5 minutos también a T ambiente mediante un agitador orbital y de vaivén (figura 27). Tras el proceso de homogenización el contenido de los matraces se vertió en tubos

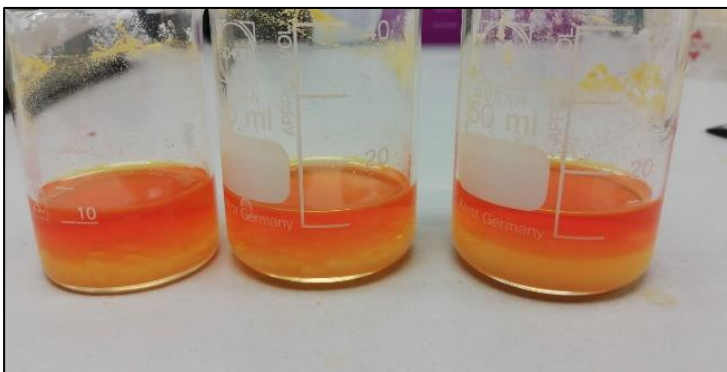


Figura 31. Proceso de deshidratado



Figura 32. Equipo Rotovapor

³ Parámetro comúnmente utilizado para evaluar la capacidad de retención de una tela metálica definido como el número de orificios por pulgada lineal.

de centrifuga para su centrifugación con el objetivo de favorecer la separación entre fases (figura 32). Todas las centrifugaciones se realizaron con las mismas condiciones 10 minutos - 12000 rpm - $T = 4^{\circ}\text{C}$ (figura 29).

Tras este proceso se pudo observar la ruptura de la emulsión en dos fases debido a la diferencia de densidades. Una fase orgánica con el aceite esencial y el disolvente orgánico, y una fase acuosa con las sales inorgánicas y los compuestos solubles en agua. En nuestro caso el diclorometano fue elegido por sus características de densidad que propiciaban la precipitación de esta fase orgánica al fondo del tubo de centrifuga, lo cual facilitaba su extracción con pipetas Pasteur. Pero especialmente fue elegido por sus características físicas en cuanto a evaporación, ya que tiene un punto de ebullición bajo y por tanto permitía realizar el proceso de separación del disolvente en el rotovapor a baja temperatura (figura 32), evitando así la pérdida de volátiles y los posibles efectos de la descomposición térmica de algunos compuestos, obteniendo así un AE de mayor complejidad y cantidad en cuanto a compuestos volátiles (Piñeiro *et al.*, 2004).

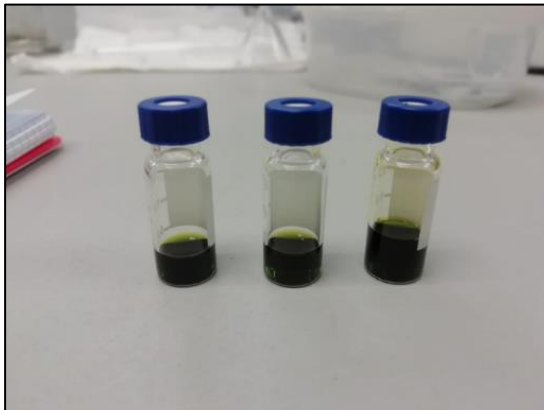


Figura 33. Aceite esencial obtenido en estado inmaduro

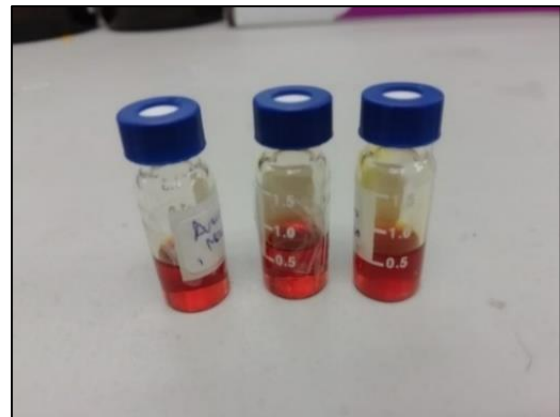


Figura 34. Aceite esencial obtenido en estado maduro

Previamente al proceso de separación del disolvente se deshidrataron las muestras con sulfato de sodio anhidro, ampliamente utilizado como desecante en laboratorios e industria (figura 31). La separación del diclorometano en el rotovapor se desarrolló a temperaturas alrededor de 27°C , finalizando el proceso al llegar a un peso constante de aceite esencial (figuras 33 y 34).

De esa manera el diagrama de flujo del proceso quedaría tal como se presenta en la figura 35. En él se aprecia cómo, tras el proceso de extracción del AE, quedarían 3 residuos de los cuales la fracción sólida puede ser utilizada como subproducto para nutrientes en alimentación animal, comercializados en forma de pellets. Las pectinas que se usan en la industria de alimentos como espesantes, gelificantes, emulsificantes y estabilizantes (Mesbahi *et al.*, 2005). El diclorometano sobrante, subproducto de la separación, puede recuperarse y ser reutilizado.

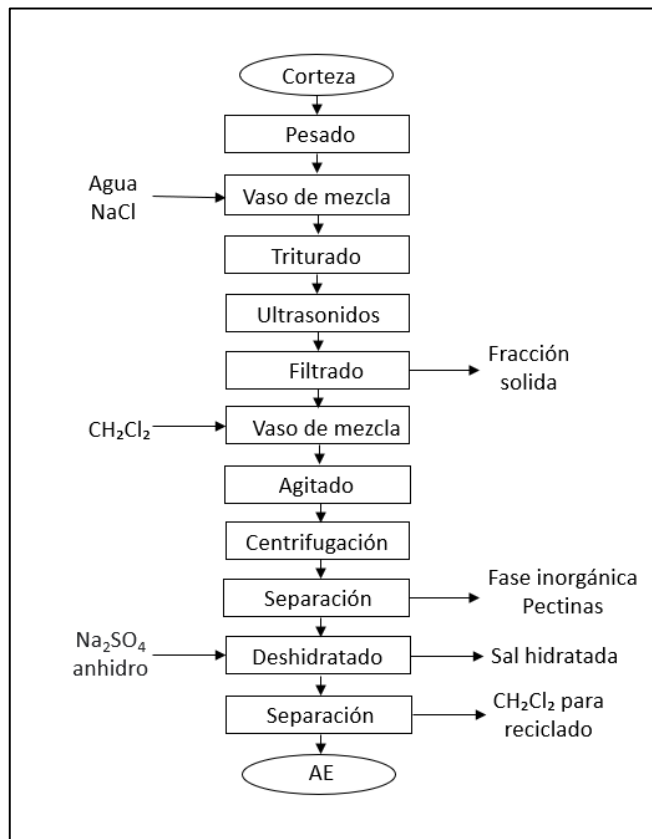


Figura 35. Diagrama de flujo proceso de extracción

3.2.4 Análisis GC-FID y GC-MS

Desde el punto de vista cualitativo, la identificación se llevó a cabo por cromatografía de gases y detección por espectroscopía de masas, mientras que para el análisis cuantitativo se utilizó un equipo similar de cromatografía de gases, con el mismo tipo de columna y parámetros de funcionamiento, con detección de ionización de llama. La cuantificación se realizó de modo riguroso, mediante calibración con estándar interno y aplicación de los factores de respuesta para cada uno de los componentes de los aceites esenciales. Para los compuestos mayoritarios (más del 90% de la composición), los factores de respuesta se obtuvieron experimentalmente, al disponerse de patrones puros (Tardugno *et al.* 2018). Para el resto de compuestos se empleó el método descrito por Cachet *et al.* basado en el empleo de ecuaciones semiempíricas (Cachet *et al.*, 2016).

El análisis de las muestras fue realizado mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y espectrometría de masas (GC-MS). Para el análisis cuantitativo se empleó un cromatógrafo Clarus 500 GC (Perkin-Elmer Inc. Wellesley. PA. EE. UU.) equipado con un detector FID y una columna capilar ZB-5 (30 m × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 μm de espesor de película; (Phenomenex Inc. Torrance. CA. EE. UU.). El volumen de inyección fue de 1 μl. La temperatura del horno de GC se programó de 50°C a 250°C a una velocidad de 3°C min⁻¹. El helio fue el gas portador (1,2 ml min⁻¹). Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 250°C. La composición porcentual del EO se calculó a partir de las áreas de los picos de GC sin factores de corrección mediante el software Total Chrom 6.2 (Perkin-Elmer Inc., Wellesley. PA. EE. UU.).

El análisis por GC-MS se realizó usando un aparato Clarus 500 GC-MS (Perkin-Elmer Inc.) equipado con la misma columna capilar, portador y condiciones operativas descritas anteriormente para el análisis GC-FID. La temperatura de la fuente de ionización se fijó en 200°C y se empleó el modo de impacto electrónico de 70 eV. Los espectros de MS se obtuvieron mediante el modo de barrido de iones totales (TIC) (rango de masas m/z 45-500 uma). Los cromatogramas de iones totales y los espectros de masas se procesaron con el software Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los índices de retención se determinaron mediante la inyección de estándares de n-alcenos C8-C25 (Supelco, Bellefonte, PE, EE. UU.) en las mismas condiciones.

La identificación de los picos se realizó combinando el cálculo de sus índices de retención y el análisis mediante GC-MS. Para ello se llevó a cabo la comparación automática de los espectros de masas de cada pico con los procedentes de la biblioteca de espectros de masas (NIST MS 2.0), mediante las aplicaciones informáticas AMDIS y Turbomass 2.0. Al mismo tiempo, fueron también calculados los índices de retención lineales mediante la expresión:

$$IRL = \left[\frac{t_r(\text{desconocido}) - t_r(n)}{t_r(N) - t_r(n)} \right] \cdot (100 \cdot z) + (100 \cdot n)$$

Donde:

- n es el número de átomos de carbono del n-alceno que eluye antes del pico analizado
- N es el número de átomos de carbono del n-alceno que eluye después del pico analizado
- z es la diferencia del número de átomos de carbono de n-alceno entre el que eluye antes del pico analizado y el de después del pico analizado
- t_{Rx} es el tiempo de retención del pico analizado
- t_{Rn} es el tiempo de retención del n-alceno anterior al pico analizado
- t_{RN} es el tiempo de retención del n-alceno posterior al pico analizado

Los componentes del AE se identificaron mediante la comparación de índices de retención calculados y las coincidencias de alta probabilidad de acuerdo con la búsqueda en la biblioteca informática de espectros de masas (NIST MS 2.0) y los datos disponibles de la literatura (Adams, 2007). La identificación de los compuestos también se confirmó mediante la comparación de su índice de

retención lineal experimental (LRI) con los de los estándares de referencia auténticos (Sigma-Aldrich™): Limoneno, γ -terpineno, β -cariofileno y citral, mezcla de isómeros geométricos: α -citral - trans- (geranial) y β -citral - cis- (neral).

El proceso analítico queda esquematizado en el siguiente diagrama (figura 36):

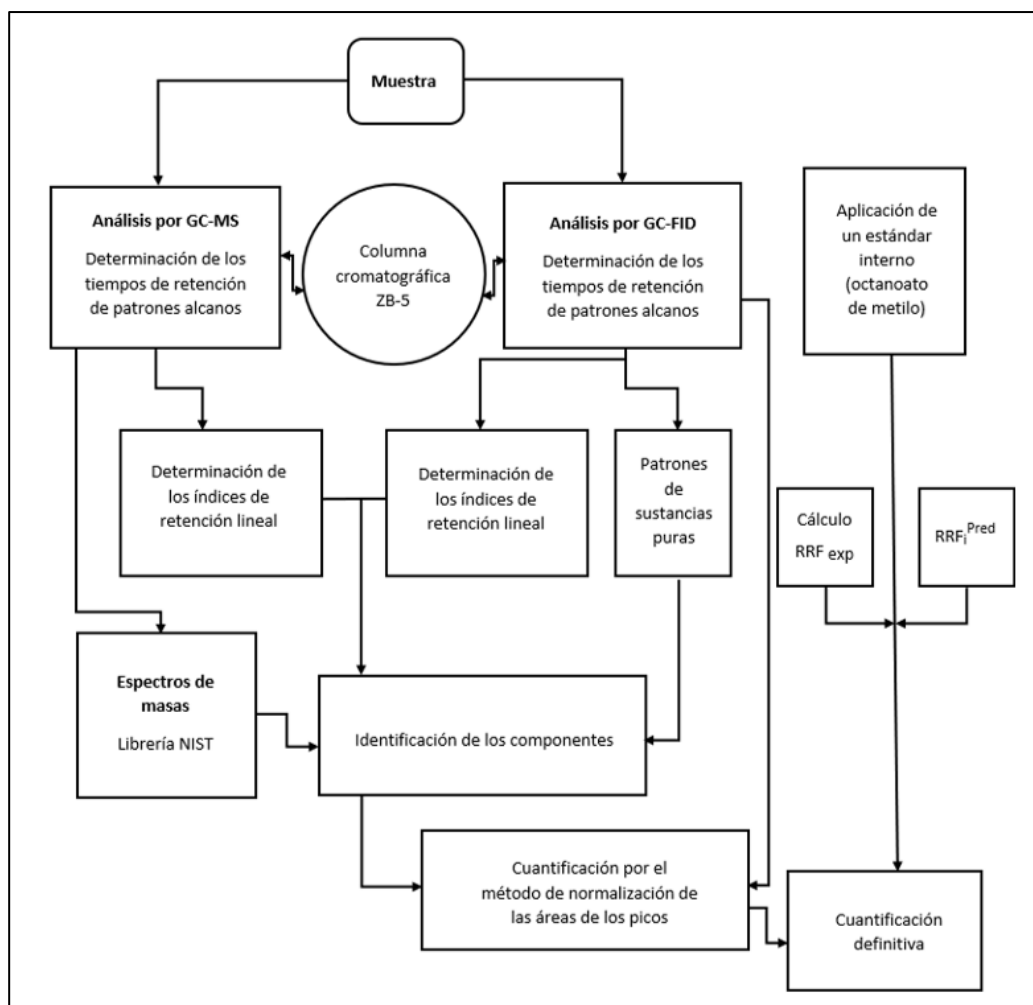


Figura 36. Esquema del proceso analítico

3.2.4.1 Cuantificación de los compuestos

Para determinar la concentración de los compuestos se empleó la cuantificación mediante factor de respuesta. La determinación experimental del factor de respuesta de los compuestos mayoritarios se realizó aplicando el método cromatográfico ya descrito, a tres concentraciones diferentes de los patrones de D-limoneno, γ -terpineno, β -cariofileno y citral junto a una concentración fija de octanoato de metilo (MO) (99 %, Sigma-Aldrich™), de acuerdo con el procedimiento descrito por Tardugno *et al.* (2018), pero añadiendo una repetición más para alcanzar las 3 repeticiones por patrón. De este modo se calculó el factor de respuesta experimental de cada uno de estos compuestos respecto de dicho estándar interno (Cachet *et al.*, 2016).

La cuantificación del resto de compuestos se realizó de acuerdo con las orientaciones propuestas en el Simposio Internacional de Aceites Esenciales (ISEO 2016) por Cachet *et al.* (2016), en el que se aplica a los porcentajes de las áreas de los picos la corrección correspondiente al factor de respuesta de cada compuesto, calculado mediante la aplicación de ecuaciones empíricas basadas en parámetros termodinámicos y en la estructura molecular de cada compuesto. De este modo, los factores de respuesta pueden predecirse a partir de la fórmula molecular de compuestos que contengan los

átomos C, H, O, N, S, F, Cl, Br, I y Si, siempre que la fórmula y el número de anillos bencénicos sea conocido (Cachet et al., 2016).

La predicción por tanto del factor de respuesta del analito (RRF_i^{Pred}) calculado de este modo se basa en la fórmula molecular aplicando la ecuación:

$$RRF_i^{Pred} = 10^3 \cdot \left(\frac{MW_i}{MW_{ISTD}} \right) \cdot (-61,3 + 88,8 \cdot n_C + 18,7 \cdot n_H - 41,3 \cdot n_O + 6,4 \cdot n_N + 64 \cdot n_S - 20,2 \cdot n_F - 23,5 \cdot n_{Cl} + 51,6 \cdot n_{Br} - 1,75 \cdot n_I + 39,9 \cdot n_{Si} + 127 \cdot n_{Benz})^{-1}$$

Donde:

- n_H es el número de átomos de carbono en el compuesto
- n_H es el número de átomos de hidrógeno en el compuesto
- n_O es el número de átomos de oxígeno en el compuesto
- n_N es el número de átomos de nitrógeno en el compuesto
- n_S es el número de átomos de azufre en el compuesto
- n_F es el número de átomos de flúor en el compuesto
- n_{Cl} es el número de átomos de cloro en el compuesto
- n_{Br} es el número de átomos de bromo en el compuesto
- n_I es el número de átomos de yodo en el compuesto
- n_{Si} es el número de átomos de silicio en el compuesto
- n_{Benz} es el número de anillos de benceno
- MW_i es el peso molecular del analito
- MW_{ISTD} es el peso molecular del estándar interno

Tabla 3. Ejemplo cálculo de RRF para varios compuestos de diferente naturaleza química.

Compuesto	Formula	Peso Molecular	C	H	O	N	S	F	Cl	Br	I	Si	N° de anillos de benceno	RRF
Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	136,238	10	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,765
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154,253	10	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,869
Geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	152,237	10	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,887
Acetato de geranilo	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196,29	12	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,957

Esta tabla expresa de a modo de empleo el proceso de cálculo para el RRF_i^{Pred} para algunos componentes de los AE analizados.

Cuantificación

Para la cuantificación de la masa de los compuestos (m_i) que constituyen el aceite esencial se utilizó la expresión:

$$m_i = RRF_i^{Pred} \cdot m_{MO} \cdot \frac{A_i}{A_{MO}}$$

Donde:

- RRF_i^{Pred} es el factor de respuesta calculado anteriormente, mediante uno de los dos métodos.
- m_{MO} es la masa del estándar interno agregada a la muestra
- A_i es el área del pico del compuesto
- A_{MO} es área del pico del estándar interno

Cabe indicar que para los compuestos de fórmula y estructura similar se utilizó el RRF_i^{pred} obtenido de manera experimental ya que sigue siendo la manera más precisa de determinar las masas de los analitos (Cachet *et al.*, 2016).

3.3 Procesamiento estadístico de datos

Se realizó una media de las tres repeticiones para cada variedad en ambos estados de maduración. Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza unidimensional (ANOVA) para cada variedad entre estados inmaduro y maduro. Además, para discriminar entre las medias se empleó el método de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc con valores de significación de $P \leq 0,05$. Los resultados se expresaron en $\% \pm$ error estándar.

4. Resultados y discusión

4.1 Evaluación colorimétrica

Los resultados registrados en ambos puntos temporales se registran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Valores coordenadas Hunter LAB estado inmaduro

Noviembre			
	L	a	b
Amalfi	55,86	-11,98	26,51
Aurantiata	44,89	-7,51	25,13
Bajoura	42,71	-13,71	20,51
Corsica	47,61	-14,34	23,50
Maxima	51,03	-13,37	24,53
Etrog	49,30	-12,79	24,70
Pane	52,24	-10,50	26,22
Piretto	52,71	-12,71	26,71
Rugosa	51,10	-12,27	26,50
Mano de Buda	48,89	-13,30	24,66

Tabla 5. Valores coordenadas Hunter LAB estado maduro

Febrero			
	L	a	b
Amalfi	68,62	-2,23	32,06
Aurantiata	54,55	8,63	33,08
Bajoura	63,02	2,16	36,70
Corsica	61,39	0,85	35,16
Maxima	58,11	-3,82	26,79
Etrog	62,26	-5,47	32,87
Pane	62,41	3,74	36,13
Piretto	63,54	0,01	35,43
Rugosa	57,06	4,11	32,91
Mano de Buda	62,75	2,25	35,71

Como se puede observar, la diferencia en ambas tablas muestra cómo las muestras tomadas en noviembre presentan valores para el parámetro "a" entre -13,71 y -7,51. En la figura 26 se muestra el modelo CIELAB donde se observa como valores negativos para "a" generan colores verdes. En contraposición, podemos ver cómo los valores para febrero cambian y esta vez los valores para "a" se sitúan en torno a 0 y los valores para "b" han aumentado, indicando de esta manera, colores amarillos representativos de estadios maduros. Este método ha permitido clasificar objetivamente las muestras por el color y, consecuentemente, por el grado de maduración, contraste que puede apreciarse en las figuras 37, 38 y 39. En la tabla 6 se muestran los valores medios de cada parámetro para ambos estados de maduración.

Tabla 6. Tabla de medias para L, a y b por estado de maduración con intervalos de confianza del 95.0%

Parámetro	Mes	Media	Error Est.
L	Noviembre	49,634	1,233
	Febrero	61,371	1,233
a	Noviembre	-12,248	1,027
	Febrero	1,023	1,027
b	Noviembre	24,897	0,774
	Febrero	33,684	0,774



Figura 37. Comparación *C. medica* var. *Bajoura* entre estados



Figura 38. Comparación *C. medica* var. *Mano de Buda* entre estados



Figura 39. Comparación *C. medica* var. *Rugoso* entre estados.

4.2 Cálculo de los factores de respuesta experimentales

La tabla 7 muestra el cálculo de los factores de respuesta experimentales mediante el uso de patrones (D-limoneno, γ -terpineno, β -cariofileno y citral) y estándar interno (MO). Para cada patrón se realizaron 3 mediciones y se calculó el promedio de ellas para establecer el RRF_{exp} que fue usado en la cuantificación de los componentes. El RRF se calcula a partir de los valores de las áreas para cada patrón y el estándar interno en el cromatograma FID, y las masas conocidas de patrón y estándar interno como se ha indicado anteriormente.

Tabla 7. Cálculo de factores de respuesta experimentales

	m_i (mg)	pureza	m'_i (mg)	$m(SI)$	A_i	A_{EI}	RRF	RRF_{exp}
Octanoato de metilo (EI)	0,036	0,99	0,03564					
γ -Terpineno	0,0409	0,97	0,039673	0,03564				0,925
1					521233,720	434386,670	0,928	
2					248919,620	205745,520	0,920	
3					708607,310	589538,330	0,926	
D-Limoneno	0,0524	0,95	0,04978	0,03564				0,830
1					578511,860	434386,670	0,836	
2					280331,920	205745,520	0,817	
3					783963,810	589538,330	0,837	
Citral (geranial y neral)	0,0477	0,96	0,045792	0,03564				0,946
1					513653,640	434386,670	0,941	
2					240123,050	205745,520	0,954	
3					696100,030	589538,330	0,943	
β -Cariofileno	0,0427	0,9	0,03843	0,03564				0,853
1					571998,940	434386,670	0,845	
2					272284,990	205745,520	0,841	
3					750950,500	589538,330	0,874	

4.3 Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)

A continuación, se expone un cromatograma de la variedad *Amalfi*. Es un cromatograma característico de *C. medica* obtenido mediante espectrometría de masas con los principales compuestos identificados. En él se indican también los porcentajes de las áreas de los picos a modo de una primera aproximación cuantitativa a la composición de cada aceite esencial.

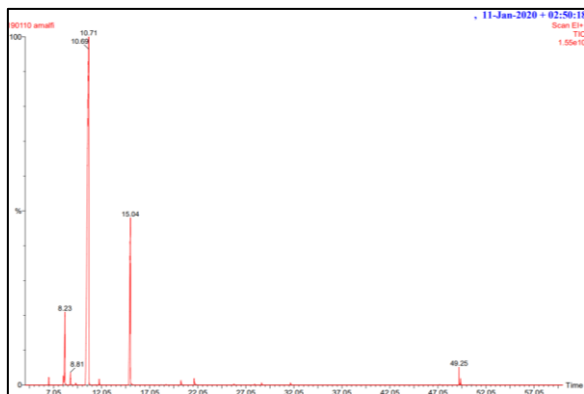


Figura 40. GC-MS Cromatograma *Citrus medica* var. *Amalfi*

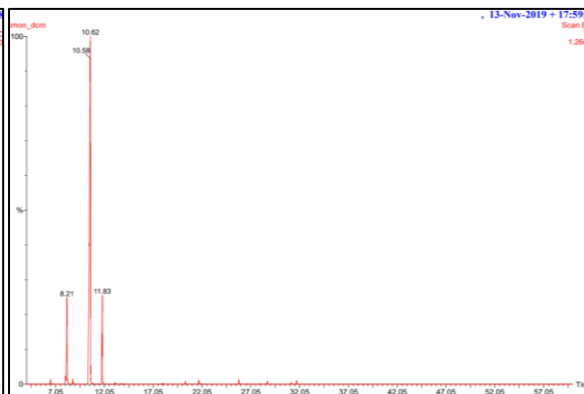


Figura 41. GC-MS Cromatograma *C. limon*

Cada variedad de *C. medica* mostró tener un aceite esencial característico (para una información más detallada consultar el anejo I con el resto de los cromatogramas obtenidos). Los resultados reflejan cómo el aceite esencial de *C. medica* (Figura 40) está formado por una compleja mezcla de diferentes compuestos, aun así, más simple que el de su descendiente el Limón (*C. limon*) donde se aprecian más picos minoritarios (Figura 41), debido a la composición genómica de este último, que es un híbrido entre Naranja amargo y Cidro. El genoma del Cidro es mucho menos variable que el de la mayoría de los cítricos conocidos, de hecho, muestra un grado de homocigosis muy superior a todos ellos, lo que podría redundar en la simplicidad del perfil de su aceite esencial. Pero esta simplicidad no implica una homogeneidad en el patrón de expresión, lo que podría estar justificado por los procesos de selección y domesticación realizados por los humanos a lo largo de centenares de años, que bien podrían estar basados en aspectos morfológicos (consultar el anejo V para información complementaria sobre la morfología de las variedades de cidro estudiadas), pero también en otros, como por ejemplo el aceite esencial propio de cada variedad.

4.4 Cromatografía de gases - Ionización de llama (GC/MS-FID)

Tras la correcta cuantificación de los resultados obtenidos mediante FID, podemos observar en la tabla 8 los compuestos volátiles totales identificados en ambos estados de maduración para las 10 variedades de *C. medica* según su clasificación química. En total se identificaron 47 compuestos en las muestras analizadas. El número de componentes difiere entre las distintas variedades. Monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos y ésteres fueron las clases de compuestos mayormente identificadas. Se pudieron observar diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en las composiciones de aceite esencial.

En la tabla 8 se muestran también los resultados en cuanto a rendimiento en masa del proceso de extracción de aceite esencial obtenido. Los resultados difieren entre variedades y estado de maduración. Se obtuvieron rendimientos desde 0,27% a 1,46%, que coinciden con otros obtenidos por extracción con disolventes (0,8-2%) y con obtenidos mediante hidroddestilación (0,47-3%) (Fekadu *et al.*, 2020). En nuestro estudio las variedades que mostraron mayores rendimientos fueron *Etrog*, *Piretto* y *Mano de Buda*.

Resultados y Discusión

Tabla 8. Continuación

Compuesto	LRI teórico	Maxima				Pana				Piretto				Rugosa				Sarcodactylis "Mano de Buda"													
		LRI	Inmaduro	LRI	Maduro	LRI	Inmaduro	LRI	Maduro	LRI	Inmaduro	LRI	Maduro	LRI	Inmaduro	LRI	Maduro	LRI	Inmaduro	LRI	Maduro										
Hidrocarburos monoterpénos																															
α-Tujeno	924	921	0,22 ± 0,03	ab	921	0,28 ± 0,01	ab	921	0,23 ± 0,01	ab	922	0,28 ± 0,02	ab	922	0,29 ± 0,06	ab	922	0,33 ± 0,00	ab	922	0,17 ± 0,02	ab	922	0,21 ± 0,04	ab	921	0,73 ± 0,06	a	921	1,00 ± 0,01	b
α-Pineno	932	929	0,61 ± 0,08	ab	929	0,80 ± 0,02	ab	929	0,97 ± 0,06	a	930	1,27 ± 0,07	b	929	1,28 ± 0,24	ab	929	1,46 ± 0,02	ab	929	0,52 ± 0,05	ab	929	0,67 ± 0,12	ab	929	1,69 ± 0,13	a	929	2,33 ± 0,02	b
Canfeno	946		-					968	0,86 ± 0,03	a	946	t	b	946	t	ab	946	t	ab	946	-	-	946	-	-	1004	-	-	929	-	-
Sabineno	969	968	0,08 ± 0,01	a	968	0,11 ± 0,01	b		-	-	969	1,40 ± 0,07	b	969	1,41 ± 0,24	ab	969	1,81 ± 0,02	ab	969	0,08 ± 0,01	ab	969	0,11 ± 0,02	ab	968	0,23 ± 0,01	a	968	0,31 ± 0,01	b
β-Pineno	974	974	0,49 ± 0,07	ab	973	0,58 ± 0,01	ab	974	5,31 ± 0,19	a	976	8,65 ± 0,47	b	975	8,46 ± 1,47	ab	975	10,79 ± 0,13	ab	974	0,34 ± 0,03	ab	974	0,42 ± 0,06	ab	974	1,56 ± 0,09	a	974	1,98 ± 0,03	b
Mircene	990	985	0,65 ± 0,09	a	985	1,04 ± 0,03	b	985	0,79 ± 0,03	ab	986	0,89 ± 0,05	ab	986	1,06 ± 0,17	ab	986	1,01 ± 0,01	ab	986	0,82 ± 0,09	ab	986	1,25 ± 0,20	ab	985	1,06 ± 0,06	a	986	1,31 ± 0,03	b
α-Felandreno	1002		-	-	1003	0,06 ± 0,00	b	1000	0,05 ± 0,00	ab	1001	0,07 ± 0,00	ab	1000	0,08 ± 0,01	ab	1004	0,09 ± 0,00	ab	1000	-	-	1004	t	b	1004	t	a	1004	0,06 ± 0,00	b
α-Terpineno	1014		-	-	1014	0,15 ± 0,00	b		-	-	1015	0,13 ± 0,01	b		-	-	1014	0,14 ± 0,00	b		-	-	1014	0,11 ± 0,02	b	1015	t	a	1014	0,46 ± 0,00	b
p-Cimeno	1020	1022	0,06 ± 0,01	ab	1022	t	ab	1022	0,04 ± 0,00	a	1023	0,08 ± 0,01	b	1022	0,07 ± 0,01	ab	1022	0,07 ± 0,00	ab	1022	t	a	1023	0,06 ± 0,01	b	1022	0,15 ± 0,01	a	1022	0,27 ± 0,02	b
D-Limoneno	1024	1029	30,78 ± 4,45	a	1033	47,59 ± 1,17	b	1029	36,51 ± 1,04	ab	1031	39,72 ± 2,08	ab	1029	48,00 ± 7,41	ab	1030	43,76 ± 0,70	ab	1030	42,66 ± 4,97	ab	1032	60,68 ± 9,58	ab	1029	38,21 ± 1,65	ab	1030	40,79 ± 0,82	ab
cis-cimeno	1032	1033	0,10 ± 0,02	a		-	-	1033	0,06 ± 0,00	ab	1034	0,05 ± 0,00	ab	1033	0,07 ± 0,01	a	1031	0,45 ± 0,00	b	1034	t	ab	1034	t	ab	1033	0,56 ± 0,02	a	1034	0,44 ± 0,01	b
trans-β-Ocimeno	1044	1043	0,16 ± 0,02	a	1043	0,06 ± 0,00	b	1043	0,12 ± 0,00	ab	1044	0,11 ± 0,01	ab	1044	0,09 ± 0,01	ab	1044	0,09 ± 0,00	ab	1044	0,06 ± 0,01	ab	1044	0,10 ± 0,01	ab	1044	0,78 ± 0,03	a	1044	0,63 ± 0,02	b
γ-Terpineno	1054	1057	7,90 ± 0,22	ab	1056	9,00 ± 1,22	ab	1056	6,79 ± 0,23	ab	1057	6,80 ± 0,37	ab	1056	7,95 ± 0,04	ab	1056	8,41 ± 0,00	ab	1057	5,09 ± 3,92	ab	1057	6,23 ± 4,30	ab	1057	22,14 ± 0,84	a	1058	27,91 ± 0,64	b
Terpinoleno	1086	1082	t	a	1082	0,34 ± 0,01	b	1082	0,14 ± 0,02	a	1083	0,28 ± 0,02	b	1083	0,11 ± 1,15	a	1083	0,29 ± 0,15	b	1083	0,07 ± 0,02	a	1083	0,24 ± 0,04	b	1083	0,26 ± 0,08	a	1083	1,01 ± 0,02	b
Hidrocarburos oxigenados																															
Linalool	1095	1097	0,26 ± 0,03	a	1097	0,10 ± 0,00	b	1099	9,49 ± 0,48	a	1098	0,14 ± 0,00	b	1098	0,22 ± 0,02	a	1098	0,14 ± 0,00	b	1097	0,06 ± 0,00	a	1098	0,23 ± 0,03	b	1098	0,05 ± 0,00	a	1097	0,08 ± 0,00	b
Terpinen-4-ol	1177	1178	t	a	1178	t	b	1178	0,08 ± 0,08	ab	1178	t	ab	1178	0,06 ± 0,04	ab	1178	0,03 ± 0,00	ab	1178	-	-	1178	-	-	1178	0,05 ± 0,00	a	1178	t	b
α-Terpineol	1186	1193	0,19 ± 0,02	a	1193	0,09 ± 0,00	b	1192	0,14 ± 0,04	ab	1193	0,18 ± 0,01	ab	1193	0,28 ± 0,01	ab	1193	0,24 ± 0,01	ab	1193	0,07 ± 0,00	a	1193	t	b	1193	0,28 ± 0,01	a	1193	0,16 ± 0,00	b
Sesquiterpenos																															
δ-Elemeno	1335	1328	0,11 ± 0,04	a		-	-		-	-		-	-	1328	0,05 ± 0,02	ab		-	1328	0,05 ± 0,02	a		-	-	1328	0,21 ± 0,03	a		-	-	
β-Elemeno	1389	1383	t	ab		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
α-Cedreno	1402		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Cariofileno	1417	1417	0,05 ± 0,01	ab	1417	t	ab	1417	0,15 ± 0,01	ab	1417	0,13 ± 0,01	ab	1417	0,20 ± 0,04	ab	1417	0,20 ± 0,01	ab	1417	t	ab	1417	t	ab	1417	0,07 ± 0,00	a	1417	0,14 ± 0,00	b
trans-α-Bergamoteno	1432	1431	0,15 ± 0,02	a	1431	0,21 ± 0,00	b	1431	0,21 ± 0,08	ab	1431	0,13 ± 0,01	ab	1431	0,14 ± 0,03	ab	1431	0,16 ± 0,00	ab	1431	0,06 ± 0,01	a	1431	0,10 ± 0,01	b	1431	0,10 ± 0,01	a	1431	0,17 ± 0,00	b
Humuleno	1436		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
D-Germacreno	1480		-	-	1478	t	ab	1479	0,29 ± 0,02	a	1479	0,58 ± 0,03	b	1479	0,16 ± 0,08	ab	1478	0,31 ± 0,01	ab	1479	0,14 ± 0,01	ab	1478	0,15 ± 0,02	ab	1479	0,18 ± 0,02	a	1479	0,27 ± 0,00	b
(Z,E)-α-Farneseno	1482		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Biciclogermacreno	1500		-	-		-	-		-	a	1493	0,30 ± 0,02	b	1493	0,14 ± 0,03	ab	1493	0,19 ± 0,00	ab	1493	t	a	1493	0,08 ± 0,01	b	1493	t	a	1493	0,05 ± 0,00	b
β-Bisaboleno	1505	1506	0,22 ± 0,03	a	1505	0,31 ± 0,01	b	1506	0,13 ± 0,06	ab	1505	0,21 ± 0,01	ab	1506	0,22 ± 0,04	ab	1505	0,24 ± 0,01	ab	1506	0,11 ± 0,01	ab	1505	0,17 ± 0,02	ab	1506	0,16 ± 0,01	a	1506	0,27 ± 0,00	b
Aldehidos																															
Nonanal	1100		-	a	1102	0,05 ± 0,00	b	1103	t	a	1103	0,09 ± 0,00	b	1103	0,13 ± 0,02	a	1103	0,18 ± 0,00	b		-	-		-	-		-	-		-	-
Citronelal	1148	1150	t	a	1150	t	b	1150	t	a	1150	t	b	1150	1,25 ± 1,15	ab	1150	0,13 ± 0,00	ab		-	ab	1150	t	ab	1150	0,05 ± 0,00	a	1150	0,13 ± 0,00	b
Decanal	1201		-	-		-	-		-	a	1204	0,05 ± 0,00	b	1204	0,05 ± 0,01	ab	1204	0,06 ± 0,00	ab		-	-		-	-		-	-		-	-
Neral	1254	1237	0,32 ± 0,06	a	1236	-	-	1236	3,92 ± 3,37	ab	1236	0,59 ± 0,03	ab	1236	1,85 ± 0,24	a	1236	1,18 ± 0,03	b	1237	0,19 ± 0,02	a	1236	t	b	1237	0,87 ± 0,19	ab	1236	0,56 ± 0,03	ab
Geranial	1264	1265	0,30 ± 0,05	ab	1265	0,19 ± 0,01	ab	1266	0,52 ± 0,23	ab	1266	0,94 ± 0,05	ab	1266	2,81 ± 0,03	ab	1266	1,95 ± 0,01	ab	1265	0,19 ± 0,02	a	1266	0,07 ± 0,00	b	1266	1,58 ± 0,05	a	1266	0,81 ± 0,02	b
Undecanal	1305	1303	t	ab		-	-		-	ab	1306	t	ab	1307	t	a	1306	t	b	1303	t	ab		-	ab		-	-		-	-
Ésteres																															
Acetato de cis-4-tujanol	1219	1222	0,08 ± 0,01	ab	1222	0,08 ± 0,01	ab	1222	0,23 ± 0,18	ab	1222	0,09 ± 0,01	ab	1222	0,21 ± 0,02	a	1222	0,10 ± 0,01	b	1222	t	a	1223	t	b	1222	0,11 ± 0,05	ab	1225	0,17 ± 0,00	ab
Acetato de linalilo	1254	1248	0,08 ± 0,01	a	1248	0,05 ± 0,00	b	1250	6,80 ± 2,99	ab	1248	0,10 ± 0,01	ab	1248	0,14 ± 0,02	a	1249	0,06 ± 0,00	b	1248	0,05 ± 0,00	a	1248	0,49 ± 0,06	b	1248	0,20 ± 0,01	a	1248	0,14 ± 0,00	b
Acetato de isobornilo	1283		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Acetato de nerilo	1359	1357	0,11 ± 0,02	a	1356	0,34 ± 0,01	b	1356	t	a	1357	0,37 ± 0,02	b	1357	0,63 ± 0,11	a	1357	1,34 ± 0,04	b	1357	0,07 ± 0,01	a	1357	0,21 ± 0,03	b	1357	0,06 ± 0,00	ab	1357	0,06 ± 0,00	ab
Acetato de geranilo	1379	1376	0,06 ± 0,01	a	1376	0,10 ± 0,00	b	1387	0,06 ± 0,05	ab	1376	0,13 ± 0,01	ab	1376	0,14 ± 0,03	a	1376	0,25 ± 0,01	b	1376	t	ab	1376	0,08 ± 0,01	ab	1376	t	a	1376	t	b
Acetato de cedrilo	1767		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-		-	-		-	-		-	-		-	-	
Otros																															
Citropteno*		1976	0,05 ± 0,01	a	1978	t	b	1976	0,09 ± 0,02	ab	1977	0,09 ± 0,01	ab	1977	1,44 ± 0,10	a	1977														

Tras una primera apreciación de los resultados se puede observar cómo la composición global de los aceites esenciales de las diferentes variedades de *C. medica* estudiadas es significativamente similar a las obtenidas por Menichini *et al.* (2011) donde se utilizaron métodos de hidrodestilación y prensado al vacío, empleados de manera convencional en la industria de extracción de aceites esenciales. También se puede apreciar similitud entre las composiciones en otros estudios sobre la composición del aceite esencial de *C. medica* mediante el uso de disolventes por Shiota (1990) y, destilación al vacío y microfiltración por Deng *et al.* (2017). En la tabla 9 podemos ver cómo en estado inmaduro se identificaron 16 compuestos comunes que, aunque con diferencias cuantitativas, estuvieron presentes en todas las variedades estudiadas.

Tabla 9. Compuestos comunes a todas las variedades para el estado inmaduro según su naturaleza química.

		Amalfi	Aurantiata	Bajoura	Corsica	Etrog	Maxima	Pane	Piretto	Rugosa	Mano de Buda
Monoterpenos	α -Tujeno	0,02	0,29	0,45	0,35	0,13	0,22	0,23	0,29	0,17	0,73
	α -Pineno	0,69	0,74	1,06	0,95	0,38	0,61	0,97	1,28	0,52	1,69
	β -Pineno	5,80	0,56	0,91	0,77	0,51	0,49	5,31	8,46	0,34	1,56
	D-Limoneno	50,29	39,29	27,23	50,56	24,08	30,78	36,51	48,00	42,66	38,21
	trans- β -Ocimeno	0,05	0,06	0,64	0,96	0,08	0,16	0,12	0,09	0,06	0,78
	γ -Terpineno	0,15	8,59	13,86	11,11	3,98	7,90	6,79	7,95	5,09	22,14
Alcoholes	Linalool	0,09	0,12	0,02	0,14	18,42	0,26	9,49	0,22	0,06	0,05
	α -Terpineol	0,17	0,10	0,15	0,15	0,06	0,19	0,14	0,28	0,07	0,28
Aldehidos	Neral	0,50	0,31	1,89	2,64	0,48	0,32	3,92	1,85	0,19	0,87
	Geranial	0,76	0,50	2,81	3,43	0,68	0,30	0,52	2,81	0,19	1,58
Ésteres	Acetato de nerilo	0,17	0,01	0,14	0,47	0,17	0,11	0,04	0,63	0,07	0,06
	Geraniol	0,08	0,13	0,12	0,37	0,12	0,06	0,06	0,14	0,04	0,04
Sesquiterpenos	β -Cariofileno	0,11	0,03	0,07	0,10	0,10	0,05	0,15	0,20	0,02	0,07
	trans- α -Bergamoteno	0,16	0,11	0,12	0,11	0,10	0,15	0,21	0,14	0,06	0,10
	β -Bisaboleno	0,25	0,14	0,19	0,19	0,06	0,22	0,13	0,22	0,11	0,16
Coumarinas	Citropteno	0,29	0,77	1,75	0,01	0,12	0,05	0,09	1,44	0,67	1,60

Las diferencias en la composición de los aceites esenciales podrían haber sido causadas por dos factores: genéticos y ambientales. La variedad donde se identificaron menos compuestos en estado inmaduro fue el cidro *Aurantiata* con 26 compuestos, y la que más el *Piretto* con 35. En general los monoterpenos D-Limoneno (24,08-50,56 %) y γ -Terpineno (0,05-13,86 %) fueron los componentes mayoritarios (en porcentaje) a excepción de lo observado en las variedades *Amalfi* y *Piretto* donde el monoterpeno β -Pineno fue el segundo mayoritario con 5,80 % y 8,46 % respectivamente, y en la variedad *Maxima* donde el segundo mayoritario fue el monoterpeno oxigenado linalool con 12,53%. Se pueden encontrar similitudes en cuanto a composición con diferentes estudios donde se analizaban las propiedades del aceite esencial de *C. medica* como agente bactericida para aplicaciones industriales, por ejemplo, como biopreservativo contra el deterioro en vinos con bajo porcentaje alcohólico por Mitropoulou *et al.* (2020) y Wang *et al.* (2020), donde en ambos casos el aceite esencial se extrajo mediante hidrodestilación.

Para el estado maduro (tabla 10) nos encontramos con la misma situación ya que los dos compuestos mayoritarios son D-limoneno (25,17-60,68 %) y el γ -terpineno (0,13-27,91 %). En este estadio también encontramos el monoterpeno β -Pineno como segundo mayoritario y en mayor cantidad respecto al estadio inmaduro en las variedades *Amalfi* y *Piretto*, con 6,81% y 10,79% respectivamente. En la variedad *Maxima* encontramos que el compuesto mayoritario es el éster acetato de linalilo (bergamiol) con un 25,88% y el segundo mayoritario el monoterpeno D-limoneno con un 25,17%.

Tabla 10. Compuestos comunes a todas las variedades para el estado maduro según su naturaleza química.

	Amalfi	Aurantiata	Bajoura	Corsica	Etrog	Maxima	Pane	Piretto	Rugosa	Mano de Buda
Monoterpenos										
α-Tujeno	0,02	0,25	0,66	0,33	0,28	0,13	0,28	0,33	0,21	1,00
α-Pineno	0,79	0,69	1,52	0,84	0,80	0,36	1,27	1,46	0,67	2,33
β-Pineno	6,81	0,52	1,32	0,74	0,58	0,25	8,65	10,79	0,42	1,98
Mirceno	1,11	0,93	1,03	0,81	1,04	0,54	0,89	1,01	1,25	1,31
D-Limoneno	58,05	44,39	34,88	36,35	47,59	25,17	39,72	43,76	60,68	40,79
trans-Ocimeno	0,06	0,06	1,32	1,26	0,06	0,08	0,11	0,09	0,10	0,63
γ-Terpineno	0,13	8,81	17,90	10,24	9,00	3,74	6,80	8,41	6,23	27,91
Terpinoleno	0,01	0,34	0,70	0,36	0,34	0,12	0,28	0,29	0,24	1,01
Alcoholes										
Linalool	0,10	0,05	0,03	0,09	0,10	12,53	0,14	0,14	0,23	0,08
Aldehidos										
Citronelal	0,04	0,05	0,10	0,12	0,03	0,02	0,04	0,13	0,01	0,13
Geraniol	0,88	0,46	2,10	2,11	0,19	0,64	0,94	1,95	0,07	0,81
Ésteres										
Acetato de cis-4-thujanol	0,07	0,06	0,20	0,45	0,08	0,04	0,09	0,10	0,01	0,17
Bergamiol	0,09	0,05	0,21	0,44	0,05	25,88	0,10	0,06	0,49	0,14
Sesquiterpenos										
β-cariofileno	0,13	0,04	0,11	0,08	0,03	0,10	0,13	0,20	0,04	0,14
trans-α-Bergamoteno	0,25	0,19	0,21	0,10	0,21	0,10	0,13	0,16	0,10	0,17
β-Bisaboleno	0,38	0,29	0,30	0,11	0,31	0,16	0,21	0,24	0,17	0,27

En las variedades *Amalfi*, *Bajoura*, *Maxima* y *Mano de Buda* se pudo observar cómo estadísticamente las diferencias entre estado maduro e inmaduro son remarcables. En la variedad *Amalfi* se aprecian en la tabla 8 cambios estadísticamente significativos en los grupos de hidrocarburos monoterpenos, sesquiterpenos y aldehídos. En la variedad *Bajoura* se puede considerar un comportamiento estadísticamente similar junto a una variación también del grupo de los ésteres (tabla 8), comportamiento que también se percibe en la variedad *Maxima*. Sin embargo, la mayor variabilidad se observó en la variedad *Mano de Buda* donde se puede apreciar cómo la gran mayoría de los compuestos muestran una diferencia estadísticamente significativa entre estados maduro e inmaduro.

En general, en cuanto a diferencias entre el aceite esencial de las variedades en estado inmaduro y maduro podemos observar cómo, en cuanto a monoterpenos, hubo un aumento de proporción en casi todas las variedades de estado inmaduro a maduro. Son compuestos interesantes que entre otras utilidades han mostrado potencial como agentes antiinflamatorios (De Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2013). Especialmente en la variedad *Rugosa* es destacable el D-limoneno con un aumento en la media del 18,02%. Aun así, este aumento general del D-limoneno entre estados solo pudo ser estadísticamente probado en las variedades *Amalfi*, *Bajoura* y *Maxima*. Por lo contrario, únicamente en la variedad *Corsica* se detectó una importante disminución en la media de D-limoneno del 14,20% junto a una disminución también del 0,87% de γ-terpineno. Para los otros monoterpenos mayoritarios β-pineno y γ-terpineno se aprecia también en general un aumento de ellos entre estados de maduración, aunque siendo solo estadísticamente significativa en las variedades *Bajoura* y *Mano de Buda* donde en esta última se apreció un aumento del 5,77% (tabla 8). Este tipo de cambios ha sido advertido en otros trabajos sobre cítricos donde se comparaba el aceite esencial entre estados de maduración obtenidos éstos mediante hidrodestilación (Venkateshwarlu y Selvaraj, 2000). Monoterpenos como los pinenos exhiben propiedades fungicidas además de ser utilizados para producir aromas e insecticidas naturales (Rivas da Silva *et al.*, 2012; Koziol *et al.*, 2014). Otro monoterpeno de interés detectado es el mirceno con valores entre 0,51-1,31% que, aunque no mostraron grandes cambios entre estados, sí registraron un aumento en la maduración en variedades como *Aurantiata*, *Bajoura*, *Maxima* y *Mano de Buda*. El mirceno es ampliamente usado en cosméticos, jabones y detergentes y como aditivo en alimentos y bebidas (Koziol *et al.*, 2014). Además, se utiliza como producto intermedio para la producción de alcoholes terpénicos (geraniol, nerol y linalol), que

posteriormente sirven como productos intermedios para la producción de aromatizantes por lo cual es altamente valorado para su uso en cosméticos, jabones y detergentes y como aditivo en alimentos y bebidas. Los monoterpenos, como hemos visto, resultan importantes como agentes aromatizantes en productos farmacéuticos, de confitería y perfumes y poseen propiedades antiinflamatorias y bactericidas.

En los sesquiterpenos la tendencia marca también un aumento, aunque en menor proporción, entre los mayoritarios especialmente en β -bisaboleno (excepto en la variedad *Amalfi*), trans- α -bergamoteno y biciclogermacreno. Este aumento se dio por norma general en las variedades donde en el estado inmaduro ya se detectó la presencia de éstos y, además, pudo ser contrastado estadísticamente en todas las variedades especialmente en las variedades *Amalfi* y *Mano de Buda*. Este comportamiento encontró una excepción en las variedades *Corsica*, en la cual se pudo observar una disminución de casi todos sus sesquiterpenos, y *Piretto*, en la cual los valores prácticamente no variaron. El único sesquiterpeno mayoritario que descendió en todas las variedades hasta prácticamente su desaparición fue el δ -elemeno. Otros como el β -cariofileno, ampliamente extendido en la naturaleza; pudiendo ser encontrado en numerosos aceites esenciales, aumentó al doble su concentración en la variedad *Mano de Buda* mientras que en el resto de variedades se mantuvo en pequeñas proporciones sin prácticamente variación entre estado inmaduro y maduro. Este compuesto ha mostrado interesante bioactividad frente a diferentes enfermedades y también como un posible fármaco preventivo (Machado *et al.*, 2018).

Los aldehídos son compuestos oxigenados organolépticamente importantes que juegan un papel sensorial activo en los aromas de los vinos (Culleré *et al.*, 2007). En este estudio hemos podido ver como a excepción del nonanal y decanal que aumentaron en un rango del 0,01-0,05%, el resto de los aldehídos disminuyeron entre los estados de inmaduro a maduro. Especial relevancia tiene la disminución de neral y geranial, ya que se trata de aldehídos que estaban presentes en todas las variedades en estado inmaduro y disminuyeron considerablemente su proporción en todas ellas, excepto en la variedad *Amalfi* donde se mantuvieron en el mismo rango de concentraciones y, además se observó un aumento del geranial. Esta reducción de neral y geranial ya ha sido observada en otros trabajos donde se comparaba el aceite esencial de lima *Kagzi* entre estados de maduración (Venkateshwarlu y Selvaraj, 2000).

En el grupo de alcoholes encontramos solamente los monoterpenos oxigenados linalool, terpineol y terpinen-4-ol. En este grupo funcional se repite el descenso en cuanto a concentración de inmaduro a maduro en las tres especies químicas. Podemos resaltar especialmente en las variedades *Etrog* y *Pane* una reducción de linalool del 5,90 y 9,35% respectivamente. Esta disminución de monoterpenos alcoholes, en especial del linalool, se ha observado en otros trabajos sobre el aceite esencial de limas *Hetsuka-daidai*, extraído mediante destilación por arrastre de vapor de agua (Hamada *et al.*, 2020). Estos alcoholes monoterpénicos son importantes ya que tienen un elevado poder odorífero, que recuerda a flores, miel y cera, y que conceden el aroma a moscatel a diferentes variedades de uvas (Marais, 1983).

Para el grupo de ésteres las diferencias entre estado inmaduro y maduro no siguen una tendencia específica. En la variedad *Corsica* podemos ver un aumento del 0,45% mientras que en el resto de las variedades en general hay una reducción de éste. En los ésteres acetato de nerilo y acetato de geranilo la tendencia general observada fue un aumento representativo entre estado inmaduro y maduro a excepción de las variedades de *Corsica*, donde decreció levemente y *Etrog*, donde deja de detectarse. En cuanto a los valores de bergamiol (Acetato de linalilo) hay una disminución generalizada de las concentraciones, especialmente en la variedad *Pane* con un 6,70% menos. Solo en dos variedades se observa más concentración: la primera en el *Rugosa* con 0,44% más y con especial relevancia en la variedad *Etrog* con un aumento del 7,30%. Este último aumento está relacionado con la ya comentada disminución en linalool en la variedad *Etrog*, pudiendo verse una relación entre el proceso de maduración y la ratio linalool/acetato de linalilo, el cual es usado como índice de calidad en aceites

esenciales de bergamota (Marzocchi *et al.*, 2019) ya que se ha observado que cuanto menor sea ese índice mejor esencia tiene el aceite (Statti *et al.*, 2004). Este grupo de compuestos en general se consideran agradables al olfato y confieren aromas afrutados y frescos a los vinos jóvenes (Catania y Avagnina, 2007)

Hasta ahora los compuestos encontrados en los aceites esenciales de las diferentes variedades de *C. medica* consisten en una mezcla de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, y sus derivados oxigenados. La fracción menos volátil contiene cumarinas y furocumarinas, que poseen actividad fotosensibilizante produciendo fitofotodermatitis tras entrar en contacto con ellas y producirse una exposición a rayos UV (Verzera *et al.*, 1996; Calka *et al.*, 2005). Además, el consumo de estas puede ser dañino para el ser humano debido a la interacción de las furocumarinas con la actividad de la enzima CYP3A4 (Bailey *et al.*, 2013). Este tipo de metabolitos secundarios generados a partir de la presencia ubicua de la cumarina umbeliferona (7-hidroxycumarina) (Figura 42) están involucrados en la adaptación ambiental y en la defensa de la planta ante patógenos como ya se ha indicado en otros apartados (figura 16) (Bourgaud *et al.*, 2006). En nuestro estudio se ha observado cómo de manera general la presencia de cumarinas y furocumarinas se da en mayor cantidad en estados inmaduros. Las variedades *Bajoura* y *Mano de Buda* fueron las más cuantiosas en cuanto a composición de cumarinas y derivados tanto en estado inmaduro como maduro debido a la presencia dominante de citropteno o limetin (5,7-dimetoxicumarina), en ambos estadios; compuesto que se halló en todas las variedades en estado inmaduro. También se encontraron pequeñas cantidades de dihidrostol (8-isopentil-7-metoxicumarina) en las variedades *Amalfi* y *Aurantiata* donde se percibió un aumento de la concentración entre estado inmaduro y maduro. Puede observarse en la figura 42 cómo estas dos últimas cumarinas proceden ambas directamente de la cumarina umbeliferona.

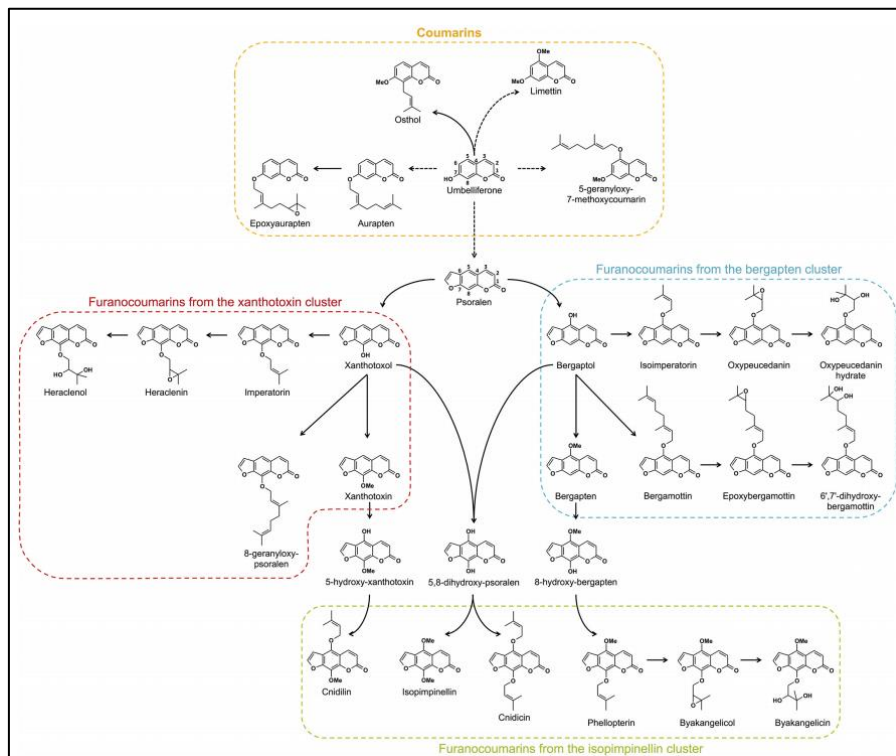


Figura 42. Representación esquemática de las vías de la cumarina y la furocumarina. Las líneas continuas indican pasos enzimáticos directos; las líneas discontinuas representan múltiples pasos enzimáticos. Fuente: *The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways* (Dugrand-Judek *et al.*, 2015)

Por otro lado, las variedades donde se encontró menor cantidad fueron *Corsica* y *Maxima*. En otros estudios se puede observar cómo en la variedad *Corsica* se detectó un bajo nivel de cumarinas/furocumarinas. En la variedad de *Corsica* se observó la presencia de Xanthotoxol en estado

inmaduro. Estos dos últimos resultados coinciden con el estudio realizado por Dugrand-Judek *et al.* (2015) pero sin embargo no se detectó la presencia de ninguna cumarina o furocumarina en estado maduro. La variedad *Maxima* presentó pequeñas concentraciones de cumarinas/furocumarinas, especialmente de isogeijerin (7-methoxy-6-(3-methyl-2-oxobutyl) chromen-2-one). Para el estado maduro la variedad *Maxima* solo presentó trazas de aurapteno. Se advirtió la presencia de otras furocumarinas como imperatorina (9-(3-Metilbut-2-enoxi)-7-furo[3,2-g]cromenona), wampetin (3-metil-5-[(2Z)-2-metil-4-({2-oxo-2H-furo[3,2-g]cromen-9-yl)oxi)but-2-en-1-il]-2,5-dihidrofuran-2-ona) y felopterina (4-metoxi-9-(3-metilbut-2-enoxi)furo[3,2-g]cromen-7-ona) de las cuales se hallaron pequeñas cantidades del orden de 0,1-0,3 % en la variedad *Rugosa*, además de un aumento de la cantidad de aurapteno (7-((E)-3, 7-Dimetilocta-2, 6-dieniloxi)-2H-cromen-2-ona) entre estado inmaduro y maduro (0,256-0,428%). El compuesto isogeijerin tuvo una presencia destacable en casi todas las variedades en estado inmaduro, especialmente en la variedad *Amalfi*, pero prácticamente no se detectó en estado maduro.

Las cumarinas tienen propiedades anticancerígenas, antioxidantes o insecticidas (Pavela *et al.*, 2020), pero además de la importancia en farmacognosia, también cabe destacar las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes, aromatizantes, aditivos alimentarios y en perfumería (Lončar *et al.*, 2020).

Tabla 11. Composición en porcentajes del aceite esencial en las diferentes variedades según naturaleza química para el estado inmaduro.

Inmaduro	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Aldehidos	Ésteres	Otros	Total
Amalfi	59,54	0,56	1,36	0,40	1,78	63,64
Aurantiata	51,02	0,34	0,83	0,14	0,91	53,24
Bajoura	45,85	0,52	4,74	0,86	1,75	53,72
Corsica	67,00	0,69	6,16	1,33	0,23	75,41
Maxima	41,57	0,54	0,64	0,34	0,35	43,44
Etrog	48,14	0,49	1,16	18,93	0,57	69,29
Pane	61,56	0,78	4,48	7,13	0,50	74,45
Piretto	69,47	0,91	6,09	1,12	1,44	79,03
Rugosa	49,96	0,42	0,39	0,20	1,34	52,31
Mano de Buda	67,80	0,76	2,51	0,41	1,60	73,08

En la tabla 11, podemos observar de una manera más resumida los porcentajes de composición total por clases en estado inmaduro. La variedad en la que más monoterpenos se encontró fue *Piretto* que a su vez fue una de las variedades en la que más aldehídos se encontraron. La variedad *Corsica* también exhibió una alta composición en monoterpenos junto a aldehídos. Otras variedades como *Pane* presentaron altos porcentajes en monoterpenos, aldehidos y ésteres y otras como *Etrog* un remarcable alto porcentaje en ésteres (18,93%).

Tabla 12. Composición en porcentajes del aceite esencial en las diferentes variedades según naturaleza química para el estado maduro.

Maduro	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Aldehidos	Ésteres	Otros	Total
Amalfi	68,91	0,83	1,63	0,59	0,55	72,51
Aurantiata	56,42	0,55	0,81	0,38	0,89	59,05
Bajoura	60,96	0,64	3,44	0,89	1,21	67,14
Corsica	52,44	0,40	3,49	1,41	0,00	57,47
Maxima	60,03	0,56	0,26	0,58	0,00	61,43
Etrog	43,15	0,49	1,07	25,92	0,18	70,81
Pane	60,09	1,36	1,71	0,70	0,09	63,95
Piretto	69,17	1,10	3,53	1,75	0,82	76,37
Rugosa	70,40	0,57	0,13	0,79	0,68	72,57
Mano de Buda	78,78	0,91	1,50	0,40	1,18	82,77

La tabla 12 muestra los porcentajes de composición total por clases en estado maduro. Como ya se ha comentado, se puede observar un aumento de los terpenos y sesquiterpenos, junto a una disminución de los aldehídos. En cuanto al grupo de los ésteres se advierten leves decrecimientos y aumentos según la variedad, pero es otra vez de notable interés el aumento de ésteres en la variedad *Etrog* debido a su alta composición en acetato de linalilo (bergamiol) (25,88%). Por el método de cuantificación empleado, los porcentajes totales reflejan la cantidad total de compuestos detectados por el cromatógrafo, de modo que parte de la composición del aceite corresponde a compuestos no registrados por el detector, debido a su elevada masa molar o polaridad.

5. Conclusiones:

Todos los árboles se cultivaron en las mismas condiciones de suelo, clima y prácticas culturales en la finca El Bartolí de la Todolí Citrus Fundació. Las condiciones de extracción fueron idénticas para todas las muestras, y la influencia de las condiciones ambientales y parámetros técnicos sobre la composición química se consideraron insignificantes. Por ello, la variación de la composición del aceite esencial (AE) de las diferentes variedades se debe a un factor de expresión génica. Nuestros resultados muestran cómo las variedades de Cidro (*Citrus medica* L.) exhiben una diversidad de expresión relativamente alta.

Tras el análisis mediante GC/MS-FID y la rigurosa cuantificación mediante calibración con estándar interno y aplicación de los factores de respuesta, se detectaron en la composición química de los AE extraídos de las diez variedades de cidro estudiadas, antes de la maduración, 48 compuestos diferentes que comprenden hidrocarburos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados, sesquiterpenos, ésteres y aldehídos, además de compuestos de mayor peso molecular como cumarinas y furocumarinas. Tras la maduración, se encontraron en el aceite esencial analizado los mismos grupos de compuestos volátiles en diferentes concentraciones respecto a la fruta no madura.

Una vez comparadas las composiciones, según variedad y estado de maduración, se pudieron formular las siguientes afirmaciones:

-Los monoterpénos y sesquiterpenos mostraron un aumento significativo durante la maduración, compensado por una disminución de los aldehídos y alcoholes. El grupo de los ésteres mostró una tendencia más dispar entre las variedades. Entre los monoterpénos más abundantes podemos destacar la presencia mayoritaria de D-limoneno seguida de γ -terpineno. Ambos se encontraron en todas las variedades, siendo probablemente los responsables del fuerte y característico olor de los cidros.

-Otros compuestos con aromas característicos, tales como citral (neral y geranial), linalool, mircenol, nonanal, decanal y citronelal fueron encontrados en diferentes proporciones dependiendo de la variedad y estado de maduración.

-Las variedades donde se observaron cambios estadísticamente más significativos entre estados de maduración fueron por orden de mayor a menor Mano de Buda, Maxima, Bajoura y Amalfi. En estas variedades se observaron cambios significativos en más del 70% de sus componentes.

-El proceso de extracción planteado y desarrollado permitió reproducir las condiciones y resultados en cuanto a composición de métodos como la hidrodestilación y la extracción por microondas, utilizados en la industria. Este método de extracción nos permitió obtener aceites esenciales sin someterlos a temperaturas que pudieran alterarlos, de modo que los perfiles descritos representan fielmente la composición real de dichos aceites esenciales.

Los resultados en cuanto a composición del AE e influencia de la maduración pueden proporcionar información respecto a la potencial que las distintas variedades de cidro pueden tener en las industrias alimentaria, de bebidas y farmacéutica. Además, su comparación resulta importante para poder elegir conscientemente la mejor variedad para cultivar desde el punto de vista de producción y calidad en función de sus posibles usos, así como el período óptimo de cosecha donde los compuestos orgánicos volátiles (COV) deseados en los AE sean más abundantes.

Estos resultados aportan una visión de la influencia del estado de maduración de las diferentes variedades de cidro y ofrecen una aplicación potencial de los mismos como fuente de subproductos para industrias productoras de aromas y fragancias ampliamente utilizadas en cosméticos, industria alimentaria y productos químicos, así como en el mundo de la gastronomía, donde los chefs son agentes innovadores, impulsando el uso de AE mediante agentes encapsulantes para dar sabor a diferentes platos y bebidas.

6. Bibliografía

- Adams, R. P. (2001). *Identification of essential oil components by gas chromatography, quadrupole mass spectroscopy*. 3rd ed. Carol Stream, Ill.: Allured Pub. Corporation. 469 pp
- Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Ed. Mundiprensa. 2ª edición. Madrid, 422 pp.
- Agustí, M.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C.; Juan M.; Almela, V. (2003). *Cuajado y Desarrollo de los frutos Cítricos*. Instituto Agroforestal Mediterráneo Universidad Politécnica Valencia. GENERALITAT VALENCIANA Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 80 pp.
- Adedeji, G.B.; Fagade O.E. & Oyelade A.A. (2007). *Prevalence of Pseudomonas aeruginosa in clinical samples and its sensitivity to citrus extract*. African Journal of Biomed Research. 2007; (10). pp 183-187. Recuperado de <http://www.ajbrui.com>
- Ali, B.; Al-Wabel, N.; Shams, S.; Ahamad, A.; Khan, S; Anwar, F. (2015). *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(8), pp. 601-611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Alzamora, L.; Morales, L.; Armas, L.; Fernández, G. (2001). *Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas*. Anales de la Facultad de Medicina, Vol. 62, núm.2, pp.156 - 161 [Consultado: 1 de noviembre de 2020]. ISSN: 1025-5583. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37962208>
- Bailey, D. G.; Dresser, G.; Arnold, J. M. (2013). *Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences?* CMAJ: Canadian Medical Association journal, 185(4), pp. 309–316. <https://doi.org/10.1503/cmaj.120951>
- Barkley, N.; Roose, M.; Krueger, R.; Federici, C. (2006). *Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)*. Theor Appl Genet, 112, 1519–1531. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0255-9>
- Belhachat, D.; Mekimene, L.; Belhachat, M.; Ferradji, A.; Aid, F. (2018). *Application of response surface methodology to optimize the extraction of essential oil from ripe berries of Pistacia lentiscus using ultrasonic pretreatment*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 9, pp 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.003>
- Bourgaud, F.; Hehn, A.; Larbat, R.; Doerper, S.; Gontier, E.; Kellner, S.; Matern, U. (2006). *Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes*. Phytochem Rev 5, pp 293–308. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>
- Brigand, J.; Nahon, P. (2016). *Gastronomy and the citron tree (Citrus medica L.)*. International Journal of Gastronomy and Food Science, 3, pp. 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.03.001>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Ed. Acribia S.A. 2ª edición. Zaragoza, 1099 pp.
- Buettner, A.; Schieberle, P. (2001). *Evaluation of Aroma Differences between Hand-Squeezed Juices from Valencia Late and Navel Oranges by Quantitation of Key Odorants and Flavor Reconstitution Experiments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(5), pp. 2387–2394. <https://doi.org/10.1021/jf001363l>
- Butelli, E.; Licciardello, C.; Ramadugu, C.; Durand-Hulak, M.; Celant, A.; Reforgiato, G.; Froelicher, Y.; Martin, C. (2019). *Noemi Controls Production of Flavonoid Pigments and Fruit Acidity and Illustrates the Domestication Routes of Modern Citrus Varieties*. Current Biology 29 (1), pp. 158-164.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.040>
- Catania C.; Avagnina, S. (2007) *Los aromas responsables de la tipicidad y de la vinosidad*. <http://inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos/> Estación Experimental Agropecuaria Mendoza. INTA. (consultado el 25/01/2021)
- Cabredo-Pinillos, S.; Cedrón-Fernández, T.; González-Briongos, M.; Puente-Pascual, L.; Sáenz-Barrio, C. (2006). *Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method*. Talanta, 69(5), pp. 1123–1129. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.011>
- Calabrese, F. (2002) *Origin and history* capítulo 1. Pp 1-16 en Dugo, G. y Di Giacomo, A. (2002). *Citrus*. Londres, Taylor & Francis. SBN 0415-28491-0.

- Cachet, T., Brevard, H., Chaintreau, A., Demyttenaere, J., French, L., Gassenmeier, K.; Loesing, G. (2016). *IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID*. Flavour and fragrance journal, 31(3), pp. 191-194. <https://doi.org/10.1002/ffj.3311>
- Calka, O.; Akdeniz, N.; Metin, A.; Behçet, L. (2005). *Phototoxic dermatitis due to Chenopodium album in a mother and son*. Contact dermatitis, 53(1), pp. 58–60. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.0456e.x>
- Caputo, L.; Cornara, L.; Bazzicalupo, M.; Francesco, C.; De Feo, V.; Trombetta, D.; Smeriglio, A. (2020). *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species*. Molecules. 25 (8). 1890. <https://doi.org/10.3390/molecules25081890>
- Cerutti, M.; Neumayer, F. (2004). *Introducción a la obtención de aceite esencial de limón*. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario, Argentina Invenio, 7(22). pp. 149-155. Recuperado de <http://www.unirioja.es>
- Chamblee, T. S.; Clark, B. C. (1993). *Lemon and Lime Citrus Essential Oils*. Bioactive Volatile Compounds from Plants. Capítulo 8. pp 88–102. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0525.ch008>
- Cooper, W.C. (1989) *Odyssey of the orange in China: national history of the citrus fruits in China*. Winter Park, Fla. 122 pp.
- Costa, R.; De Fina, M.R.; Valentino, M.R.; Dugo, P.; Mondello, L. (2007). *Reliable identification of terpenoids and related compounds by using linear retention indices interactively with mass spectrometry search*. Natural Product Communications., 2(4). <https://doi.org/10.1177/1934578X0700200412>
- Cottin, R. (2002). *Citrus in the World*, SRA INRA-CIRAD, San Giuliano. 58pp.
- Culleré, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. (2007). *An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(3), pp. 876–881. <https://doi.org/10.1021/jf062432k>
- De Cássia da Silveira e Sá, R.; Andrade, L.; De Sousa, D. (2013). *A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes*. Molecules 18, pp. 1227-1254. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>
- Deng, G.; Craft, J.D.; Steinberg, K.M.; Li, P.L.; Pokharel, S.K.; Setzer, W.N. (2017) *Influence of Different Isolation Methods on Chemical Composition and Bioactivities of the Fruit Peel Oil of Citrus medica L. var. sarcodactylis (Noot.) Swingle*. Medicines 4(1). <https://doi.org/10.3390/medicines4010001>
- Di Giacomo, A.; Di Giacomo, G. (2002). *Essential oil production*. Capítulo 8. Pp 114-148 en Dugo, G. y Di Giacomo, A. (2002). Citrus. Londres, Taylor & Francis. SBN 0415-28491-0.
- Di Rauso Simeone, G.; Di Matteo, A.; Rao, M. A; Di Vaio, C. (2019). *Variations of peel essential oils during fruit ripening in four lemon (Citrus limon (L.) Burm. F.) cultivars*. Journal of the Science of Food and Agriculture.100(1). pp 193-200. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10016>
- Duarte, A.; Fernandes, J.; Bernardes, J.P. & Miguel, M. (2016). *Citrus as a Component of the Mediterranean Diet*. Journal of Spatial and Organizational Dynamics. IV. 289-304. <http://hdl.handle.net/10400.1/8913>
- Dugrand-Judek, A.; Olry, A.; Hehn, A.; Costantino, G., Ollitrault, P.; Froelicher, Y. & Bourgaud, F. (2015). *The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways*. PLoS ONE 10(11): e0142757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142757>
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). *Ultrasound-assisted extraction of natural products*. Food Engineering Reviews, 3(2), 108-120. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Ettre, L.S. (2003) *Retention Index Expressions*. Chromatographia. Department of Chemistry, Yale University. 58, pp. 491–494. <https://doi.org/10.1365/s10337-003-0075-x>
- Ettre, L.S. y Hinshaw, J.V. (1993). *Basic Relationships of Gas Chromatography*, Cáp. 4, 1st ed. Cleveland: Advanstar Data. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240180310>

- Fan, F.; Tao, N.; Jia, L.; He, X. (2014). *Use of citral incorporated in postharvest wax of citrus fruit as a botanical fungicide against Penicillium digitatum*. Postharvest Biology and Technology, 90, pp. 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.005>
- Fatemeh, S.; Khadijeh A.; Gholamreza B. K. (2006) *Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of Satureja hortensis*. Food Chemistry, Vol: 99 (1). Pp 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.026>
- Fekadu, T.; Seifu, T.; Mitiku, A. (2020). *Extraction of Essential Oil from Orange Peel using Different Methods and Effect of Solvents, Time, Temperature to Maximize Yield*. IJESC, 9(12), https://www.researchgate.net/publication/340050318_Extraction_of_Essential_Oil_from_Orange_Peel_using_Different_Methods_and_Effect_of_Solvents_Time_Temperature_to_Maximize_Yield
- Gabriele, B., Fazio, A., Dugo, P.; Costa, R.; Mondello, L. (2009). *Essential oil composition of Citrus medica var. liscia L. cv. Diamante (Diamante citron) determined after using different extraction methods*. J. Sep. Sci 32(1), 99–108. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800404>
- Gandhi, M.; Chikindas, M. (2007). *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*. International journal of food microbiology, 113(1), pp. 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>
- Gao, Z.; Zhong W.; Chen, K.; Tang, P.; Guo, J. (2020) *Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis Swingle against Listeria monocytogenes*. Industrial Crops and Products, ISSN: 0926-6690, Vol: 144, 112036. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112036>
- González-Mas, M.; Escriche, M.; Jover, S.; Bermejo, A.; Cano, A.; Gutiérrez-Suanzes, A. (2010). *Estudio del aceite esencial de Clementinas: Diferenciación de variedades según el perfil volátil de la corteza*. Levante Agrícola, especial Postcosecha, 401, pp. 185-192. Recuperado de <http://www.unirioja.es>
- Habibullah, W.; Devi, C. (2016). *Ultrasonic-assisted extraction of essential oil from Botryophora geniculata using different extracting solvents*. 4th International Conference on Fundamental and Applied Sciences, vol. 1787, no. 1. <https://doi.org/10.1063/1.4968083>
- Hamada, T.; Harano, K.; Niihara, R.; Kitahara, H.; Yamamoto, M.; Vairapan, C.; Tani, F.; Onitsuka, S.; Okamura, H. (2020). *Composition and Monthly Changes of the Volatile Constituents in the Sour Hetsuka-daidai Citrus Peel*. Journal of Oleo Science, 69, pp. 643-648. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19296>
- Ibáñez, M. D.; Blázquez, M. A. (2018). *Phytotoxicity of Essential Oils on Selected Weeds: Potential Hazard on Food Crops*. Plants (Basel, Switzerland), 7(4), 79. <https://doi.org/10.3390/plants7040079>
- Inglese, P.; Sortino, G. (2019). *Citrus History, Taxonomy, Breeding, and Fruit Quality*. Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science. Consultado 23 octubre 2021, en <https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.001.001/acrefore-9780199389414-e-221>.
- Iriti, M.; Faoro, F. (2009). *Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution*. International Journal of Molecular Sciences, 10(8), pp 3371-3399. <https://doi.org/10.3390/ijms10083371>
- Jafarpour, M.; Yousefi, G.; Hamed, A.; Shariat, A.; Salehi, A.; Heydari, M. (2016). *Effect of a traditional syrup from Citrus medica L. fruit juice on migraine headache: A randomized double blind placebo controlled clinical trial*. Journal of Ethnopharmacology, 179, pp. 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.040>
- Karimi, I.; Alizadeh, M.; Pirsá, S.; Moghaddas, E. (2020). *Physico-chemical, organoleptic, antioxidative and release characteristics of flavoured yoghurt enriched with microencapsulated Melissa officinalis essential oil*. International Journal of Dairy Technology. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12691>

- Kima, K.; Ko, Y.; Yang, H.; Ham, Y.; Roh, S.W.; Jeon, Y.J.; Ahn, G.; Kang, M.C.; Yoon, W. J.; Kim, D.; Oda, T. (2013). *Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (Citrus medica L. var. sarcodactylis) through blocking JNK, ERK and NF-κB signalling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells*. Food Chemistry Toxicology, 57, pp 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.017>
- Klein J.D. (2014) *Citron Cultivation, Production and Uses in the Mediterranean Region*. In: Yaniv Z., Dudai N. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East. Medicinal and Aromatic Plants of the World*, vol 2. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9276-9_10
- Kováts, E. (1958). *Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*. Helvetica Chimica Acta, 41(7), pp. 1915–1932. <https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703>
- Kozioł, A.; Stryjewska, A.; Librowski, T.; Salat, K.; Jarosz, M.; Moniczewski, A., & Lochyński, S. (2014). *An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes*. Mini reviews in medicinal chemistry. 14. recuperado de <https://www.ingentaconnect.com/contentone>
- Kumar, S.; Jena, S. N.; Nair, N. K. (2009). *Molecular phylogeny in Indian Citrus L. (Rutaceae) inferred through PCR-RFLP and trnL-trnF sequence data of chloroplast DNA*. Scientia Horticulturae, 119(4), pp. 403–416. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.030>
- Langgut, D. (2017). *The Citrus Route Revealed: From Southeast Asia into the Mediterranean*. Hortscience, 52(6), 814-822. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11023-16>
- Liang, S. J., Wu, H., Lun, X., & Lu, D. W. (2006). *Secretory Cavity Development and Its Relationship with the Accumulation of Essential Oil in Fruits of Citrus medica L. var. sarcodactylis (Noot.) Swingle*. Journal of Integrative Plant Biology, 48(5), pp. 573–583. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00230.x>
- Llorens-Molina, J. A.; Vacas, S.; Verdeguer, M.; Castell, V. (2017). *TLC-GC/MS Method for identifying and selecting valuable essential Oil Chemotypes from Wild Populations of Mentha longifolia L.* Natural Volatiles and Essential Oils, 4(4), pp. 49-61. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/en/pub/nveo/issue/38934/455011>
- Llorens-Molina, J. A.; Vacas, S.; Castell, V. y Verdeguer M. (2020). *Seasonal variations of essential oils from five accessions of Mentha longifolia (L.) L. with selected chemical profiles*. Journal of Essential Oil Research, 32(5), pp. 419-428. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1773328>
- Llorens-Molina, J. A.; Vacas, S.; Fernández, J; Castell, V. (2018). *Influence of growing substrates and fertilization in biomass amount and essential oil yield and composition of Mentha x piperita*. Conference: International Symposium on Essential Oils 20153 recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/323573451>
- Llorens-Molina, J. A.; Vacas, S.; Castell V.; Németh-Zámboriné, É. (2016): *Variability of essential oil composition of wormwood (Artemisia absinthium L.) affected by plant organ*. Journal of Essential Oil Research, 9(1). Pp 11-21. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1202152>
- Lončar, M.; Jakovljević, M.; Šubarić, D.; Pavlić, M.; Buzjak Služek, V.; Cindrić, I. & Molnar, M. (2020). *Coumarins in Food and Methods of Their Determination*. Foods, 9(5), 645. <https://doi.org/10.3390/foods9050645>
- Luro, F.; Neves, C.; Gilles, C.; Gesteira, A.; Paoli, M.; Ollitrault, P.; Tomi, F.; Micheli, F.; Gibernau, M. (2020). *Effect of Environmental Conditions on the Yield of Peel and Composition of Essential Oils from Citrus Cultivated in Bahia (Brazil) and Corsica (France)*. Agronomy, 10(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy10091256>
- Luro, F.; Curk, F.; Froelicher, Y.; Ollitrault, P. (2017). *Recent insights on Citrus diversity and phylogeny*. En Zech-Matterne, V., Fiorentino, G. (Eds.), *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses*. Naples: Publications du Centre Jean Bérard.

- Luro, F., Viglietti, G., Marchi, E., Costantino, G., Scarpia, M. G., Tomi, F., ... Ollitrault, P. (2019). *Genetic, morphological and chemical investigations reveal the genetic origin of *Pompia* (*C. medica tuberosa* Risso & Poiteau) – An old endemic Sardinian citrus fruit*. *Phytochemistry*, 168. 112083. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112083>
- Mabayo, V.; Aranas, J.; Cagas, V.; Cagas, D.; Ido, A. & Arazo, R. (2018). *Optimization of oil yield from *Hevea brasiliensis* seeds through ultrasonic-assisted solvent extraction via response surface methodology*. *Sustainable Environment Research*. 28(1). 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.08.001>
- Machado, K. da C.; Islam, M. T.; Ali, E. S.; Rouf, R.; Uddin, S. J.; Dev, S.; Reza, H. M.; Das, A. K.; Melo-Cavalcante; A. A. de C. (2018). *A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene*. *Phytotherapy Research*, 32(12), pp. 2376-2388 <https://doi.org/10.1002/ptr.6199>
- Mancini, E.; Camele, I.; Elshafie, H. S. et al., (2014). *Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy)*. *Chemistry & Biodiversity*, 11(4), pp. 639–651. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300326>
- MAPAMA. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2018). *Anuarios de estadísticas 2017*. <http://www.mapama.gob.es/es/> (consultado 22 agosto 2020).
- Marais, J. (1986). *Principaux Monotérpenols Odorants du Cépage Muscatés*. *S. Afr. Enol. Vitic.* 4: 49-52.
- Marzocchi, S.; Baldi, E.; Crucitti, M. C.; Toselli, M., & Caboni, M. F. (2019). *Effect of Harvesting Time on Volatile Compounds Composition of Bergamot (*Citrus × Bergamia*) Essential Oil*. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(6), pp. 426-435. <https://doi.org/10.1002/ffj.3520>
- Meena, A.; Kandale, A.; Meda, M. (2011). *A review on citron-pharmacognosy, phytochemistry and medicinal uses*. *The Journal of Pharmacy*. 2(1). Pp 14-19. Recuperado de <http://www.irjponline.com/>
- Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; de Cindio, B.; Loizzo, M.; Conforti, F.; Menabeni, R.; Bettini, R.; Menichini, F. (2011). *Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. *Diamante* essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction*. *Natural Product Research*, 25(8), pp. 789–799. <https://doi.org/10.1080/14786410902900085>
- Mesejo, C.; Agustí, M.; Reig, C. (2011). *Cultivos Leñosos*. Capítulo 11. Cítricos. <http://hdl.handle.net/10251/9819>
- Mesbahi, G.; Jamalain, J.; Farahnaky, A. (2005). *A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems*. *Food Hydrocolloids*, 19(4), pp. 731-738. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.08.002>
- Mitropoulou, G.; Nikolaou, A.; Santarmaki, V.; Sgouros, G.; Kourkoutas, Y. (2020). **Citrus medica* and *Cinnamomum zeylanicum* Essential Oils as Potential Biopreservatives against Spoilage in Low Alcohol Wine Products*. *Foods*, 9(5), 577. <https://doi.org/10.3390/foods9050577>
- Modello, L.; Verzera, A.; Previti, P.; Crispo, F.; Dugo G. (1998). *Multidimensional capillary GC-GC for the analysis of complex samples*. 5. Enantiomeric distribution of monoterpene hydrocarbons, monoterpene alcohols and linalyl acetate of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), pp. 4275–4282 <https://doi.org/10.1021/jf980228u>
- Morton, J. (1987). *Citron*. En: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL. pp. 179–182. Recuperado de <https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/citron.html> (Consultado 5 Septiembre 2020)
- Nicolosi, E. (2007) *Origin and taxonomy*, en I.A. Khan (ed.), *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, Wallingford, pp. 19-44.
- Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; La Malfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. (2000). *Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers*. TAG

- Theoretical and Applied Genetics, 100(8), pp. 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s001220051419>
- Pavela, R.; Maggi, F.; Benelli, G. (2019). *Coumarin (2H-1-benzopyran-2-one): a novel and eco-friendly aphicide*. Natural Product Research, <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1660334>
 - Peñuelas, J. (2004). *Plant VOC emissions: making use of the unavoidable*. Trends in Ecology & Evolution, 19(8), pp. 402–404. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.06.002>
 - Piñeiro, Z.; Palma, M.; Barroso, C. G. (2004). *Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography*. Analytica Chimica Acta, 513(1), pp. 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.044>
 - Ramadugu, C.; Keremane, M.L.; Hu, X.; Kar, D.; Federici, C.T.; Kahn, T.; Roose, M.L.; Lee, R.F. (2015). *Genetic analysis of citron (Citrus medica L.) using simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms*. Scientia Horticulturae, 195, pp. 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.004>
 - Reuther, W. (1973). *Climate and citrus behavior*. Pp. 280-337 en The Citrus Industry. 2nd Ed., Vol. 3, (ed.) W. Reuter Berkeley: University of California Press
 - Rivas da Silva, A. C.; Lopes, P. M.; Barros de Azevedo, M. M.; Costa, D. C.; Alviano, C. S.; Alviano, D. S. (2012). *Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers*. Molecules (Basel, Switzerland), 17(6), pp. 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>
 - Rodríguez-Saona, C. (2012). *La Ecología Química de Interacciones Tri-Tróficas*. Pp. 315-342 en: J. C. Rojas; E. A. Malo (eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.
 - Savo, V.; Caneva, G.; Guarrera, P.M.; Reedy, D. (2011) *Folk phytotherapy of the Amalfi Coast (Campania, Southern Italy)*. Journal of Ethnopharmacology, 135(2), pp. 376–392. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.027>
 - Sedláková, J.; Kocourková, B.; Lojková, L.; Kubáň, V. (2003). *The essential oil content in caraway species (Carum carvi L.)*. Hort. Sci, 30(2), 73-79. Recuperado de <https://www.researchgate.net/>
 - Shiota, H. (1990) *Volatile components in the peel oil from fingered citron (Citrus medica L. var. sarcodactylis Swingle)*. Flavour and Fragrance Journal, 5(1), pp. 33–37. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730050106>
 - Sood S.; Bansal S.; Muthuraman A. (2009) *Therapeutic Potential of Citrus medica L. Peel Extract in Carrageenan Induced Inflammatory Pain in Rat*. Research Journal of Medicinal Plant, 3(4), pp.123 – 133. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2009.123.133>
 - Statti, G.; Conforti, F.; Sacchetti, G.; Muzzoli, M.; Agrimonti, C.; Menichini, F. (2004). *Chemical and biological diversity of Bergamot (Citrus bergamia) in relation to environmental factors*. Fitoterapia. 75(2), pp. 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.12.002>
 - Stratakos, A. C.; Koidis, A. (2016). *Methods for Extracting Essential Oils*. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, pp. 31–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
 - Swingle, W.T.; Reece, P.C. (1967). *The botany of citrus and its wild relatives*. Pp. 389–390 en Reuther, W.; Webber, H.J.; Batchelor, L.D. (Eds.), *The Citrus Industry*, vol. 1. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
 - Talon, M.; Wu, G. A.; Gmitter, Jr., F. G.; Rokhsar, D. S. (2020) *The origin of citrus*, pp. 9-20. En: Talón, M.; Caruso, M.; Gmitter Jr., F. G. (2020) *The Genus Citrus*. Elsevier Inc. Woodhead Publishing.
 - Tanaka, T. (1954). *Species problem in citrus; a critical study of wild and cultivated units of citrus, based upon field studies in their native homes. (Revisio Aurantiacearum IX)*, Tokyo, 152 pp.
 - Tardugno, R.; Spagnoletti, A.; Grandini, A.; Maresca, I.; Sacchetti, G.; Pellati, F.; Benvenuti, S. (2016): *Chemical profile and biological activities of Cedrelopsis grevei H. Baillon bark essential oil*. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 152, pp. 120-129. <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1255271>

- Tolkowsky, S. (1938). *Hesperides: A history of the culture and use of citrus fruits*. London, 371 pp.
- Venkateshwarlu, G.; Selvaraj, Y. (2000). *Changes in the Peel Oil Composition of Kagzi Lime (Citrus aurantifolia Swingle) during Ripening*. Journal of Essential Oil Research, 12(1), pp. 50–52. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712040>
- Vekey, K. (2001). *Mass spectrometry and mass-selective detection in gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 921(2), pp. 227-236. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00825-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00825-1)
- Venturini, N.; Curk, F.; Desjobert, J.; Karp, D.; Costa, J.; Paolin, J. (2010) *Chemotaxonomic investigations of peel and petitgrain essential oils from 17 citron cultivars*. Chemistry and Biodiversity. 7(3), pp. 736–751. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900028>
- Verdeguer, M.; Roselló, J.; Castell, V.; Llorens, J. A.; Santamarina, M. P. (2020). *Cherry tomato and persimmon kaki conservation with a natural and biodegradable film*. Current Research in Food Science, 2, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.11.005>
- Verzera, A.; Lamonica, G.; Mondello, L.; Trozzi, A.; Dugo, G. (1996). *The composition of bergamot oil*. Perfumer Flavorist, 21. pp 19–34. Recuperado de <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2533437>
- Yu, GW.; Cheng, Q.; Nie, J.; Wang, X. J.; Wang, P.; Li, Z. G. y Lee, M. R. (2018). *Microwave Hydrodistillation Based on Deep Eutectic Solvent for Extraction and Analysis of Essential Oil from Three Amomum Species Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. Chromatographia, 81, pp. 657–667. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3482-8>
- Wang, F.; You, H.; Guo, Y.; Wei, Y.; Xia, P.; Yang, Z.; Yang, D. (2020). *Essential oils from three kinds of fingered citrons and their antibacterial activities*. Industrial Crops and Products, 147, 112172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112172>
- War, A. R.; Sharma, H. C.; Paulraj, M. G.; War, M. Y., y Ignacimuthu, S. (2011). *Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management*. Plant signaling & behavior, 6(12), pp. 1973–1978. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18053>
- Wilkins, J.M.; Hill, S. (2006). *Food in the Ancient World*. Blackwell Publishing, Oxford, 320 pp.
- Wu, G.; Terol, J.; Ibanez, V.; López-García, A.; Pérez-Román, E.; Borredá, C.; Domingo, C.; Tadeo, F.; Carbonell-Caballero, J.; Alonso, R.; Curk, F.; Du, D., Ollitrault, P.; Roose, M.; Dopazo, J.; Gmitter, F.; Rokhsar, D.; Talon, M. (2018). *Genomics of the origin and evolution of Citrus*. Nature, 554, pp 311-316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. (2010). *Analysis of Essential Oils*. En Baser, K. (Ed.), Buchbauer, G. (Ed.). (2016). Pp 151-185 en: *Handbook of Essential Oils*. Boca Raton: CRC Press.
- Zhao, S.; Ren, W.; Gao, W.; Tian, G.; Zhao, C.; Bao, Y.; Cui, J.; Lian, Y.; Zheng, J. (2020). *Effect of mesoscopic structure of citrus pectin on its emulsifying properties: Compactness is more important than size*. Journal of Colloid and Interface Science, 570, pp. 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.02.113>
- Zhong G.; Nicolosi E. (2020). *Citrus Origin, Diffusion, and Economic Importance*. En: Gentile A., La Malfa S., Deng Z. (eds) *The Citrus Genome*. Compendium of Plant Genomes. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_2

Páginas web:

- Aula virtual. Cromatografía. https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/43719/mod_resource/content/2/Cromatograf%C3%ADa.pdf (Consultado el 22/11/2020).
- Grandview research, 2020. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market> , (consultado el 02/11/2020).
- Marketwatch, 2020. <https://www.marketwatch.com/press-release/essential-oils-market-size-share-and-latest-industry-growth-report-2020-2027-2020-12-16> (consultado 28/02/2021).
- Statista, 2017. <https://www.statista.com/statistics/435226/essential-oils-european-imports-by-type/> (consultado 25/10/2020).
- Statista, 2019. <https://www.statista.com/statistics/826356/essential-oils-production-value-europe/> (consultado 25/10/2020)

7. Anexos

ANEJO I – CROMATOGRAMAS GC-MS

ANEJO II – LOCALIZACIÓN DE LA FINCA

ANEJO III – IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS

ANEJO IV – IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS

ANEJO V – MATERIAL FOTOGRÁFICO