



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL**

# INFLUÈNCIA DEL MÈTODE D'EXTRACCIÓ EN LA COMPOSICIÓ DE L'OLI ESSENCIAL DE LA CORFA DE CITRUS JAMBHIRI, CITRUS HYSTRIX I CITRUS LIMON

**Treball de Fi de Grau en Ciència i Tecnologia dels Aliments  
Curs 2020/2021**

**Autor: Arnau Cebrián I Ortega**

**Tutor UPV: Dr. D. Juan Antonio Llorens Molina**

**Tutor (Todolí Citrus Fundació): Dr. D. Óscar Olivares-Fuster**

**Paraules clau:** *Citrus jambhiri*, *C. hystrix*, *C. limon*, oli essencial, extracció, composició química, quantificació.

Resum.

Els olis essencials son substàncies intensament aromàtiques responsables de les fragàncies de diferents òrgans vegetals, com poden ser flors, fulles i fruits. Aquests olis tenen múltiples aplicacions en la indústria alimentària (additius, conservants, aromatitzants...). És per aquesta raó que l'estudi de la composició química i quantificació dels seus components té gran interès.

L'objectiu del treball és estudiar la influència de tres mètodes d'extracció en la composició química, tant qualitativa com quantitativa, de l'oli essencial de tres espècies de cítrics; *Citrus jambhiri* Lush., *C. hystrix* DC. y *C. limon* (L.) Burm. f. cultivar Rugoso.

El material vegetal del que hem disposat per l'elaboració del treball prové de la col·lecció de Todolí Citrus Fundació. L'obtenció d'olis essencials de fruits cítrics, localitzats principalment al flavedo, pot realitzar-se fent servir diversos mètodes d'extracció. En aquest cas, els mètodes utilitzats han estat: l'obtenció directa per capil·laritat a partir de les vesícules que contenen l'oli essencial, la hidrodestil·lació amb un equip Clevenger i l'extracció amb dissolvents orgànics assistida per ultrasò i centrifugació.

Per a les mostres obtingudes per extracció directa a partir de les vesícules d'oli, l'anàlisi qualitatiu dels extractes s'ha realitzat per cromatografia de gasos amb detectors d'espectroscopia de masses. L'anàlisi quantitatiu ha estat dut a terme mitjançant l'ús del detector per ionització de flama. Per als extractes obtinguts per centrifugació i per hidrodestil·lació s'ha realitzat una quantificació aproximada a partir de les àrees dels pics dels cromatogrames.

Després d'aquests anàlisis, pel que fa a la composició dels olis, s'ha observat una clara influència del mètode d'extracció de l'oli essencial en el seu perfil. Aquesta influència és més marcada al *C. hystrix* degut al seu perfil notablement més complex, on la presència de compostos oxigenats és major.

**Palabras clave:** *Citrus jambhiri*, *C. hystrix*, *C. limon*, aceite esencial, extracción, composición química, cuantificación.

Resumen.

Los aceites esenciales son sustancias intensamente aromáticas responsables de las fragancias de diferentes órganos vegetales, como pueden ser flores, hojas y frutos. Estos aceites tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (aditivos, conservantes, aromatizantes...). Es por esta razón que el estudio de la composición química y cuantificación de sus componentes tiene gran interés.

El objetivo del trabajo es estudiar la influencia de tres métodos de extracción en la composición química, tanto cualitativa como cuantitativa, del aceite esencial de tres especies de cítricos; *Citrus jambhiri* Lush., *C. hystrix* DC. y *C. limon* (L.) Burm. f. cultivo Rugoso.

El material vegetal del que hemos dispuesto para la elaboración del trabajo proviene de la colección de Todolí Citrus Fundación. La obtención de aceites esenciales de frutos cítricos, localizados principalmente al flavedo, puede realizarse usando varios métodos de extracción. En este caso, los métodos utilizados han estado: la obtención directa por capilaridad a partir de las vesículas que contienen el óleo esencial, la hidrodestilación con un equipo Clevenger y la extracción con disolventes orgánicos asistida por ultrasonido y centrifugación.

Para las muestras obtenidas por extracción directa a partir de las vesículas de aceite, el análisis cualitativo de los extractos se ha realizado por cromatografía de gases con detectores de espectroscopía de masas. La evaluación del rendimiento de la extracción mediante hidrodestilación se realizó gravimétricamente por evaporación del diclorometano del extracto con un rotavapor. El análisis cuantitativo ha sido llevado a cabo mediante el uso del detector por ionización de llama. En el caso de los extractos obtenidos por hidrodestilación, ha sido aplicado el cálculo de factores de respuesta relativos al octanoato de metilo como estándar interno. Con los extractos obtenidos por centrifugación se ha realizado una cuantificación aproximada a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas.

Después de estos análisis, en cuanto a la composición de los aceites, se ha observado una clara influencia del método de extracción del aceite esencial en su perfil. Esta influencia es más marcada al *C. hystrix* debido a su perfil notablemente más complejo, donde la presencia de compuestos oxigenados es mayor.

**Keywords:** *Citrus jambhiri*, *C. hystrix*, *C. lemon*, essential oil, extraction, chemical composition, quantification.

Abstract.

Essential oils are intensely aromatic substances responsible for the fragrances of different plant organs, such as flowers, leaves and fruits. These oils have multiple applications in the food industry (additives, preservatives, flavourings...). It is for this reason that the study of the chemical composition and quantification of its components has great interest.

The objective of the work is to study the influence of three extraction methods on the chemical composition, both qualitative and quantitative, of the essential oil of three varieties of citrus fruits; *Citrus jambhiri* Lush., *C. hystrix* DC. and *C. limon* (L) Burm. f. crop Rough.

The plant material from which we have prepared the work comes from the collection of Todolí Citrus Foundation. Essential oils of citrus fruits, located mainly in the flavedo, can be obtained using several extraction methods. In this case, the methods used have been: the direct production by capillarity from the vesicles containing the essential oil, the hydrodistillation with a Clevenger equipment and the extraction with organic solvents assisted by ultrasound and centrifugation.

For samples obtained by direct extraction from oil vesicles, the qualitative analysis of the extracts has been performed by gas chromatography with mass spectroscopy detectors. The evaluation of the extraction performance by hydrodistillation was carried out gravimetrically by evaporation of the dichloromethane extract with a rotavapour. Quantitative analysis has been carried out using the flame ionization detector. For extracts obtained by hydrodistillation, the calculation of response factors for methyl octanoate has been applied as an internal standard. With the extracts obtained by centrifugation, an approximate quantification was made from the areas of the chromatograms peaks.

After these analyses, in terms of the composition of the oils, a clear influence of the method of extraction of the essential oil on their profile has been observed. This influence is more pronounced on *C. hystrix* due to its significantly more complex profile, where the presence of oxygenated compounds is greater.

## **AGRAÏMENTS**

Vull expressar el meu agraïment al meus tutors Dr. Juan Antonio Llorens Molina i Dr. Óscar Olivares Fuster, per haver-me donat a conèixer el món de la investigació dels cítrics, i dels seus olis essencials, per la seua plena disposició a resoldre els meus dubtes i curiositats al llarg de la realització del treball i per la seua supervisió i seguiment continu.

A Sandra Vacas González per l'ajuda proporcionada en la part cromatogràfica.

A l'Institut Agroforestal Mediterrani de l'UPV per posar a la meua disposició els seus laboratoris i material necessari per a realitzar el treball.

A la Todolí Citrus Fundació per la seua col·laboració.

I per últim, gràcies als meus familiars i amics que sempre han estat quan i on els demanat que estigueren en aquest curs acadèmic costós i dur, tant en la realització del treball com en la meua vida privada. Gràcies a vosaltres soc la persona que soc i sempre us estaré agraït.

Gràcies a tots.

## Índex

1.	INTRODUCCIÓ .....	1
1.1	ELS OLIS ESSENCIALS DE CÍTRICS EN LA INDÚSTRIA ALIMENTÀRIA .....	1
1.1.1	ELS OLIS ESSENCIALS DE CÍTRICS EN LA GASTRONOMIA.....	2
1.2	ESPÈCIES ESTUDIADAES .....	2
1.2.1	<i>Citrus hystrix</i> .....	2
1.2.1.1	MORFOLOGIA I TAXONOMIA .....	2
1.2.1.2	LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA .....	3
1.2.1.3	COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL .....	3
1.2.2	<i>Citrus jambhiri</i> .....	4
1.2.2.1	MORFOLOGIA I TAXONOMIA .....	4
1.2.2.2	LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA .....	4
1.2.2.3	COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL .....	4
1.2.3	<i>Citrus limon</i> cv. Rugoso.....	5
1.2.3.1	MORFOLOGIA I TAXONOMIA .....	5
1.2.3.2	LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA .....	5
1.2.3.3	COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL .....	6
1.3	OLIS ESSENCIALS .....	6
1.3.1	USOS .....	6
1.3.2	PROPIETATS FÍSQUES.....	7
1.3.3	COMPOSICIÓ QUÍMICA.....	7
1.3.3.1	TERPENS .....	7
1.3.3.1.1	MONOTERPENS.....	7
1.3.3.1.2	SESQUITERPENS .....	8
1.3.3.1.3	DITERPENS.....	8
1.3.4	MÈTODES D'OBTENCIÓ DELS OLIS ESSENCIALS .....	8
1.3.4.1	DESTIL·LACIÓ PER ARROSSEGAMENT DE VAPOR D'AIGUA .....	9
1.3.4.2	PREMSAT EN FRED.....	9
1.3.4.3	EXTRACCIÓ DE DIÒXID DE CARBONI SUPERCRÍTIC (S-CO <sub>2</sub> ).....	9
1.3.4.4	EXTRACCIÓ AMB DISSOLVENTS .....	9
1.3.4.5	MACERACIÓ O ENFLEURAGE.....	9
2.	OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.....	10
2.1	OBJECTIUS .....	10
2.2	PLA DE TREBALL .....	10
3.	MATERIALS I MÈTODES.....	10

3.1	MATERIAL VEGETAL .....	10
3.2	EXTRACCIÓ D'OLI ESSENCIAL .....	11
3.2.1	EXTRACCIÓ DIRECTA DE LES VESÍCULES .....	11
3.2.1.1	MATERIALS .....	11
3.2.1.2	FONAMENT .....	11
3.2.1.3	METODOLOGIA .....	11
3.2.2	EXTRACCIÓ AMB SOLVENTS ASISTIDA AMB ULTRASÒ I CENTRIFUGA ..	11
3.2.2.1	MATERIALS .....	11
3.2.2.2	FONAMENT .....	12
3.2.2.3	METODOLOGIA .....	13
3.2.3	EXTRACCIÓ PER HIDRODESTIL·LACIÓ .....	13
3.2.3.1	MATERIALS .....	13
3.2.3.2	FONAMENT .....	13
3.2.3.3	METODOLOGIA .....	14
3.3	COMPOSICIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS OLIS ESSENCIALS .....	14
3.3.1	FONAMENT .....	14
3.3.2	METODOLOGIA .....	16
3.4	ANÀLISI ESTADÍSTIC .....	21
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	21
4.1	COMPOSICIÓ DE L'OLI ESSENCIAL .....	21
4.1.1	<i>Citrus hystrix</i> .....	21
4.1.2	<i>Citrus jambhiri</i> .....	25
4.1.3	<i>Citrus limon</i> cv. Rugoso.....	28
4.2	COMPARACIÓ QUALITATIVA .....	31
4.2.1	ESPÈCIES .....	31
4.2.2	INFLUÈNCIA DELS MÈTODES D'EXTRACCIÓ .....	32
4.3	COMPARACIÓ QUANTITATIVA .....	32
5.	CONCLUSIONS .....	33
6.	BIBLIOGRAFIA.....	34

## LLISTAT DE FIGURES I TAULES

### FIGURES

Figura 1. Estructures d'alguns monoterpens .....	7
Figura 2. Estructures d'alguns sesquiterpens .....	8
Figura 3. Òxid de manool .....	8
Figura 4. Representació gràfica de la tècnica emprada per realitzar l'extracció de l'oli essencial directament de les vesícules .....	11
Figura 5. Detector d'espectrometria de masses .....	15
Figura 6. Detector de ionització de flama .....	15
Figura 7. Fotografia de cromatògraf de gasos i un detector de masses Clarus 500 GC-MS .....	16
Figura 8. Cromatograma dels patrons de la sèrie homòloga dels n-alcans considerats.....	17
Figura 9. Cromatograma complet corresponent al C. jambhiri per GC/MS.....	17
Figura 10. Cromatograma complet corresponent al C. jambhiri per GC/MS amb els pics integrats .....	18
Figura 11. Llistat dels pics detectats. ....	18
Figura 12. Espectre de masses obtingut experimentalment corresponent al pic amb $t_r=12,95$ . .....	19
Figura 13. Espectre de masses proporcionat per la llibreria Adams, R.P. (2007) corresponent al sabinè. ....	19
Figura 14. Captura de pantalla del programa AMDIS .....	20
Figura 15. Captura de pantalla de NIST 2.0.....	20
Figura 16. GC/MS cromatograma complet corresponent al C. hystrix amb la identificació dels components majoritaris .....	21
Figura 17. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost $\beta$ -pinè en oli essencial de C. hystrix .....	23
Figura 18. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost limonè en oli essencial de C. hystrix .....	24
Figura 19. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost nootkatona en oli essencial de C. hystrix.....	24
Figura 20. GC/MS cromatograma complet corresponent al C. jambhiri amb la identificació dels components majoritaris .....	25
Figura 21. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost sabinè en oli essencial de C. jambhiri .....	26
Figura 22. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost limonè en oli essencial de C. jambhiri .....	27
Figura 23. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost precocè I en oli essencial de C. jambhiri .....	28
Figura 24. GC/MS cromatograma complet corresponent al C. limon amb la identificació dels components majoritaris .....	28
Figura 25. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació $P \leq 0,05$ per al compost $\gamma$ -terpinè en oli essencial de C. limon .....	30



Figura 26. Intervals basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost limonè en oli essencial de *C. limon* ..... 31

## TAULES

Taula 1. Jerarquia taxonòmica de <i>C. hystrix</i> DC. ....	2
Taula 2. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de <i>C. hystrix</i> DC. ....	3
Taula 3. Jerarquia taxonòmica de <i>C. jambhiri</i> Lush. ....	4
Taula 4. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de <i>C. jambhiri</i> Lush. ....	5
Taula 5. Jerarquia taxonòmica de <i>C. limon</i> (L.). ....	5
Taula 6. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de <i>C. limon</i> (L.). ....	6
Taula 7. Composició química de l'oli essencial de <i>C. hystrix</i> . ....	22
Taula 8. Composició química de l'oli essencial de <i>C. jambhiri</i> . ....	26
Taula 9. Composició química de l'oli essencial de <i>C. limon</i> . ....	29

# 1. INTRODUCCIÓ

El gènere *Citrus* engloba una tipologia de fruits característics de les zones temperades del planeta. Diferents hipòtesis s'han anat formulant referents a la història i l'origen geogràfic dels cítrics. Actualment es considera que la zona d'origen de la majoria d'espècies d'aquest gènere se situa en el triangle format per l'àrea oriental de Assam (al nord-est de la Índia), el nord de Myanmar i el nord-oest de Yunnan (Talon et al., 2020). Quant a l'origen del cultiu dels cítrics, les zones tropicals i subtropicals del continent asiàtic i l'arxipèlag malaisi probablement foren les àrees nuclears on va començar a produir-se aquesta activitat fa ja uns 4000 anys (Calabrese, 2002).

Hui en dia el cultiu de fruits del gènere *Citrus* és una activitat molt important. Els cítrics es consumeixen en grans quantitats en tot el món de forma natural, pelada o com a suc. A més a més, els seus derivats són part de la indústria alimentària, cosmètica, farmacèutica... Contenen molts nutrients com la vitamina A, B i C, minerals, fibra dietètica i molts metabòlits secundaris entre els que es troben els fenols dietètics, els flavonoides, els limonoides i els carotenoides. Diferents parts dels fruits cítrics han sigut objecte d'estudi donats els seus beneficis, tant per a la salut humana com per a la indústria agroalimentària. L'oli essencial d'aquests fruits té un alt potencial com a component funcional en aliments i begudes degut al seu aroma cítric fresc i a la seva eficàcia en aplicacions de conservació alimentària (Abirami et al., 2014; Liew et al., 2020). Entre els subproductes més importants obtinguts dels cítrics trobem els olis essencials

Els olis essencials són el producte final del metabolisme secundari de les plantes (Alzamora et al., 2001). Estan compostats per una barreja complexa de més de 100 components de diferent natura química. S'obtenen a partir de diverses matèries primeres naturals i són principalment valorats pel seu impacte olfatiu (Cerutti & Neumayer, 2004).

La norma ISO 9235:2013(en) defineix els olis essencials com el "Producte obtingut a partir d'una matèria primera natural d'origen vegetal per destil·lació al vapor, per processos mecànics a partir del pericarpí de fruits cítrics, per hidrodestil·lació o per destil·lació seca, després de la separació de la fase aquosa, en el seu cas, per processos físics".

Els olis essencials tenen un gran interès pràctic en sectors com el de la perfumeria, la cosmètica, així també com en el de la medicina. Cal destacar la llarga tradició medicinal i terapèutica de les espècies del gènere *Citrus* al llarg de la història, en especial a la Xina i altres regions asiàtiques. A més a més, a la indústria agroalimentària aquest producte és molt valorat per la gastronomia i té gran potencial com alternativa natural a alguns additius alimentaris.

## 1.1 ELS OLIS ESSENCIALS DE CÍTRICS EN LA INDÚSTRIA ALIMENTÀRIA

Els olis essencials més utilitzats en el món són els provinents de cítrics i s'utilitzen principalment com aromatitzants en begudes, caramels i gelatines. Per afegiment, moltes investigacions relacionades amb la detecció de propietats antimicrobianes i antioxidants dels olis essencials (Frassinetti et al., 2011; Gülay et al., 2009), així com en els seus efectes en les propietats organolèptiques dels aliments, han posicionat l'ús dels olis essencials com a una solució molt prometedora davant la creixent demanda de productes alimentaris amb menys additius químics.

En aquest sentit, els olis essencials de cítrics són alternatives potencials a l'ús d'additius químics en aliments com conservants, aromatitzants i antioxidants. Altrament, són necessaris més

estudis científics sobre la composició i les possibles aplicacions dels olis essencials. Cal destacar el particular interès en estudis relacionats amb la vida útil i l'estabilitat dels olis essencials de cítrics durant el procés de transformació dels aliments (Mustafa, 2015).

### 1.1.1 ELS OLIS ESSENCIALS DE CÍTRICS EN LA GASTRONOMIA

Quant al sector gastronòmic, cal destacar la importància d'entitats com la Todolí Citrus Fundació. La seva àmplia col·lecció de cítrics consta d'una gran diversitat d'espècies provinents de diferents parts del món. Aquesta col·lecció està a disposició de qualsevol persona que vullga simplement conèixer-la, i també d'aquelles que estiguen interessades en desenvolupar projectes professionals al voltant d'ella. En aquest sentit, cuiners innovadors com Ricard Camarena, Quique Dacosta o Ferran Adrià fan servir la matèria primera aportada per aquesta Fundació per realitzar algunes de les seves investigacions per tal d'elaborar noves creacions amb els cítrics, i els seus olis essencials, com a ingredients.

## 1.2 ESPÈCIES ESTUDIADAES

### 1.2.1 *Citrus hystrix*

#### 1.2.1.1 MORFOLOGIA I TAXONOMIA

La primera espècie estudiada rep el nom científic de *Citrus hystrix* DC., pertany al grup de les papedes i el seu nom col·loquial es llima Kaffir. El terme "kaffir" es va utilitzar per categoritzar aquesta llima com un dels cultius cítrics menys importants abans que es descobriren els seus usos potencials per a la vida humana (Wongpornchai, 2012). Aquest terme està actualment en desús, degut a que és una paraula menyspreadora, i cada vegada més se li coneix com Combaya. En aquest text se la denominarà d'aquesta manera.

*Citrus hystrix* és un arbre que creix fins als dos metres. Els seus fruits són inflats i fortament aromàtics. La seva pell és rugosa, de color groc verdós a la cara externa i blanc cremós a la cara interna. Les tiges joves, els pecíols i el gineceu són de color verd clar i pubescents. Les fulles són simples, en disposició helicoidal i estipulars. Com totes les espècies i varietats del grup Papeda, el pecíol es alat i de similar mida a la fulla (Wiert, 2006).

Taula 1. Jerarquia taxonòmica de *C. hystrix* DC.

<b>Regne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisió</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Família</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Citroideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Citreae</i>
<b>Gènere</b>	<i>Citrus</i>
<b>Espècie</b>	<i>Citrus hystrix</i> DC

### 1.2.1.2 LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA

La Combaya és una de les espècies de cítrics més esteses al sud-est d'Àsia, incloent Indonèsia. També es troba al Vietnam, on creix comunament com una espècie endèmica en Bay Nui, província de An Giang. El botànic suís Augustin Pyrame de Candolle (DC) va portar a Europa la llavor d'aquest fruit des de l'illa Maurici. De Candolle la va classificar com la primera espècie del subgènere *papeda*, nomenant-la *Mauritius papeda* en 1824 (Budiarto et al., 2019).

En Indonèsia, els agricultors del districte de Tulungagung extrauen l'oli essencial de la Combaya en el context de la diversificació de productes provinents de les fulles fresques d'aquesta espècie, que és àmpliament cultivada.

Quant a les condicions climàtiques i del sòl, estudis anteriors relacionen positivament el rendiment en el cultiu de la llima *hystrix* amb les pluges, l'estat del carboni orgànic, el nivell de nutrients (nitrogen, fòsfor i magnesi) en les fulles i un pH edafològic neutre (Efendi et al., 2021).

### 1.2.1.3 COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL

Els components volàtils de l'oli essencial de la Combaya són una barreja d'hidrocarburs, monoterpens, sesquiterpens, cetones, àcids, aldehids, alcohols i esters. S'han realitzat diversos estudis sobre la composició de l'oli essencial de fruits i fulles de *C. hystrix* de diferents zones geogràfiques. El grau de variabilitat és tal que fins i tot en mostres procedents de la mateixa regió es poden observar diferències molt significatives quant a la composició del seus olis essencials. La variabilitat de dita composició, que subjau en aquestes investigacions, es mostra a la següent taula.

Taula 2. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de *C. hystrix* DC.

Referències	Localització	Components (>5%)
(Kasuan et al., 2013)	Selangor, Malàisia	sabinè (31,224%), $\beta$ -pinè (32,967%), limonè (20,687%), citronel·lal (7,531%)
(Sato et al., 1990)	Chiang Rai, Tailàndia	$\beta$ -pinè (25,93%), sabinè (20,36%), limonè (5,27%), citronel·lal (16,80%)
(Le et al., 2020)	An Giang, Vietnam	$\beta$ -pinè (47,926%), limonè (24,121%), citronel·lal (11,84%)
(Sreepian et al., 2019)	Chiang Rai, Tailàndia	sabinè (14,99%), $\beta$ -pinè (21,10%), limonè (25,28%), citronel·lal (7,63%), terpinè-4-ol (5,06%)
(Muhammad, 1999)	Jerangau, Terengganu	sabinè (20,13%), $\beta$ -pinè (20,13%), limonè (11,78%), citronel·lal (12,56%)
(Chanthaphon et al., 2008)	Songkhla, Tailàndia	limonè (8,13%), citronel·lal (15,67%), $\beta$ -pinè (30,48%), sabinè (22,75%), terpinè-4-ol (6,61%)

## 1.2.2 *Citrus jambhiri*

### 1.2.2.1 MORFOLOGIA I TAXONOMIA

La segona espècie estudiada rep el nom científic de *Citrus jambhiri* Lush., pertany també a la família *Rutaceae* i es coneix comunament com Llima Rugosa. No obstant això, aquets fruit no és una llima. El *C. jambhiri* és un híbrid entre un Mandarí antic (*C. reticulata* Blanco) i un Cidro (*C. medica* (L.)), i per tant, pertany al grup dels mandariners àcids. És un arbre alt i molt ramificat, proveït d'abundants espines. Els fruits el·lipsoidals són de corfa dura, rugosa i de color groc. La seva polpa és escassa i àcida (León, 1968).

Taula 3. Jerarquia taxonòmica de *C. jambhiri* Lush.

<b>Regne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisió</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Família</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Citroideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Citreae</i>
<b>Gènere</b>	<i>Citrus</i>
<b>Espècie</b>	<i>Citrus jambhiri</i> Lush.

### 1.2.2.2 LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA

El *C. jambhiri* és una de les espècies natives de l'Índia. Aquest mandariner àcid s'utilitza com portaempelt per a plantacions comercials de cítrics en tot el món. A l'Índia, la llima rugosa continua essent el portaempelt més emprat per als cultius de cítrics del nord, nord-est, centre i sud de l'Índia degut al seu efecte beneficiós sobre el vigor i el rendiment de la seva descendència, a més de la seua adaptabilitat a sòls arenosos, tolerància a la sequera i salinitat, bon creixement en condicions de sòl profund i resistència al virus tristesa dels cítrics (CTV) i als viroides de la exocortis dels cítrics (CEVd) i la xyloporosis dels cítrics (HSVd) (Rohini et al., 2020).

### 1.2.2.3 COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL

S'han realitzat diversos estudis sobre la composició de l'oli essencial de fruits de *C. jambhiri* procedents de diferents zones geogràfiques. Aquests estudis mostren en ocasions una gran variabilitat quant a la composició. Amb l'excepció d'alguns casos, el limonè es posiciona com al compost principal de l'oli essencial de la llima rugosa, amb xicotetes diferències en la seva proporció.

Taula 4. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de *C. jambhiri* Lush.

Referències	Localització	Components (>5%)
(Mohammed et al., 2013)	Shambat, Sudan	limonè (84,5%)
(Sembiring, 2019)	Sumatra Septentrional, Indonesia	limonè (71,88%), 1,4-ciclohexadiè (13,93%), β-pinè (10,57%)
(Ogunjinmi et al., 2019)	Ibadán, Nigèria	òxid de <i>cis</i> -linalool (19,85%), òxid de <i>trans</i> -linalool (14,86%), terpinè-4-ol (7,37%), linalool (6,19%)
(Hamdan et al., 2010)	Banha, Egipte	limonè (92,48 %)
(Shaw & Wilson, 1976)	Florida, Estats Units	limonè (92,2%)
(Lota et al., 2002)	San-Giuliano, Còrsega	limonè (91,4%)

### 1.2.3 *Citrus limon* cv. Rugoso

#### 1.2.3.1 MORFOLOGIA I TAXONOMIA

La tercera i última espècie estudiada rep el nom científic de *Citrus limon* (L.) Burm. f. cultivar Rugoso, també pertany a la família Rutaceae i el seu nom col·loquial també és el de llima rugosa, més encertat en aquest cas que no pas amb el *C. jambhiri*. El *C. limon* cv. Rugoso és un arbre de baixa estatura, espinós i de brotades joves vermelloses. Els pecíols són alats, amb ales estretes. La làmina ovada mesura de 6 a 12 cm de llarg i té les vores serrades. Les flors tenen 5 pètals de color blanc amb les vores rosades (León, 1968). El fruit presenta un color groc apagat que manté tonalitats verdoses encara en la maduresa. La forma del fruit és molt variable, no obstant això tendeix a ser ovalat, podent presentar o no un xicotet mamelló apical, amb el punt d'inserció afonat en una corona irregular. La corfa és extremadament rugosa i molt aromàtica. L'albedo és gruixut i no molt agradable degut a les insercions dels olis essencials amargs de la corfa. La polpa és pàl·lida, verdosa al començament de la maduresa, mitjanament sucosa, molt àcida i un poc amarga. No presenta llavors.

Taula 5. Jerarquia taxonòmica de *C. limon* (L.). Burm. f.

<b>Regne</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisió</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Família</b>	<i>Rutaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Citroideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Citreae</i>
<b>Gènere</b>	<i>Citrus</i>
<b>Espècie</b>	<i>Citrus limon</i> (L.)

#### 1.2.3.2 LOCALITZACIÓ GEOGRÀFICA I CLIMA

La llimera és una espècie originària del sud-est asiàtic, Xina i l'arxipèlag malaisi. La varietat mediterrània comú de la llima rugosa no s'ha trobat creixent de forma salvatge a cap lloc de la regió mediterrània (Vekiari et al., 2002).

Les llimeres són més sensibles al fred que altres tipus de cítrics, prefereixen llocs assolellats. Creixen en sòls argilencs, ben drenats, humits i dins d'un ampli rang de pH. Els majors productors són Itàlia i Estats Units. Altres grans productors d'aquest cítric són Grècia, Espanya i Argentina (Chaturvedi y Shrivastava Suhane, 2016).

### 1.2.3.3 COMPOSICIÓ OLI ESSENCIAL

S'han realitzat diversos estudis sobre la composició de l'oli essencial de fruits de *C. limon* procedents de diferents zones geogràfiques. Aquests estudis mostren una gran variabilitat a la composició, la qual també està relacionada amb la diversitat fenotípica d'aquesta espècie, tal com es mostra en la següent taula.

Taula 6. Taula bibliogràfica dels components majoritaris (>5%) de l'oli essencial de *C. limon* (L.).

Referències	Localització	Components (>5%)
(Öntaş et al., 2016)	Ortaca, Turquia	$\beta$ -pinè (8,81%), limonè (54,4%), $\gamma$ -terpinè (12,0%)
(Golmakani & Moayyedi, 2015)	Jahrom, Índia	limonè (63,15%), $\beta$ -pinè (9,01%), $\gamma$ -terpinè (11,19%)
(Moosavy et al., 2017)	Tabriz, Iran	limonè (46,93%), $\gamma$ -terpinè (16,89%), tri-cyclen (6,67%)
(Paw et al., 2020)	Assam, Índia	limonè (55,40 %), <i>trans</i> -verbenol (6,43%), neral (10,39%)
(Hamdan et al., 2013)	Banha, Egipte	$\beta$ -pinè (7,67%), limonè (52,73%), $\gamma$ -terpinè (9,88%)
(Bourgou et al., 2012)	Menzel Bouzelfa, Tunísia	sabinè (5,82%), limonè (69,71%), $\gamma$ -terpinè (9,96%)
(Ferhat et al., 2007)	Boufarik, Alger	$\beta$ -pinè (8,58%), limonè (72,9%), $\gamma$ -terpinè (7,77%)
(Vekiari et al., 2002)	Khanià, Creta	$\beta$ -pinè (5,6%), limonè (14,0%), <i>trans</i> -isocitral (5,67%)

## 1.3 OLIS ESSENCIALS

### 1.3.1 USOS

L'ús tradicional dels olis essencials ha estat relacionat amb la indústria cosmètica, de la perfumeria i l'aromateràpia. En l'actualitat, s'ha originat una tendència dins de sectors com el dels tractaments fitosanitaris o la conserva i valorització d'aliments relacionada amb la recerca de substituïts per als productes químics de síntesi, comunament emprats, degut als seus possibles efectes mediambientals i per a la salut humana. Aquest nou escenari ha potenciat l'interès per l'ús de productes naturals com poden ser distints tipus d'extractes vegetals. En particular, els olis essencials s'han convertit en els productes naturals derivats de les plantes més importants degut a les seves diverses propietats biològiques i medicinals (Mancini et al., 2014). Cal destacar el creixent impacte dels olis essencials en altres àmbits com el de la farmacologia i la indústria agroalimentària. Aquest fet es degut al seu ampli espectre de propietats antibacterianes, antioxidants, antiinflamatòries, antivirals i antifúngiques (Ali et al., 2015).

## 1.3.2 PROPIETATS FÍSiques

Els olis essencials són líquids a temperatura ambient, volàtils i normalment incolor, el que els diferencia dels olis "fixes". En general, la seva densitat és inferior a la del aigua (els olis essencials de sassafràs, clavell o canella són excepcions). Són liposolubles i solubles en els dissolvents orgànics habituals, com l'hexà i el diclorometà. Malgrat poder ser arrossegats pel vapor d'aigua, són insolubles en ella. No obstant això, són lo suficientment solubles per proporcionar-li part del seu aroma (Bruneton, 2001).

## 1.3.3 COMPOSICIÓ QUÍMICA

Quantitativament, la composició dels olis essencials és molt variable. Dins del contingut d'aquests es poden distingir dues fases:

- Fracció volàtil, constitueix entre el 85 i el 99% del total i conté principalment monoterpens, sesquiterpens i diterpens junts als seus derivats oxigenats: alcohols, aldehids, cetones, epòxids o èsters, tant alifàtics com aromàtics. Cal mencionar la possible notable presència de fenilpropanoids i de diferents compostos alifàtics oxigenats tals com l'hex-2-enal o l'octà-3-ol. En general es defineixen com compostos orgànics volàtils (Buettner & Schieberle, 2001).
- Fracció no volàtil (residual), representa entre l'1 i el 15% del total de l'oli. Conté hidrocarburs, àcids grassos, esterols, carotenoides, ceres, cumarines i flavonoides.

### 1.3.3.1 TERPENS

Els terpenoids són els compostos principals dels olis essencial. Estructuralment, estan constituïts per la unió de molècules d'isoprè a través d'unions 1,4. En els olis essencials es troben únicament els terpens més volàtils, és a dir, aquells la massa molecular dels qual no és molt elevada (mono- i sesquiterpens) (Bruneton, 2001).

#### 1.3.3.1.1 MONOTERPENS

Els monoterpens consten de dues unitats d'isoprè (C10). Són les molècules més abundants dels olis essencials. Poden estar presents com hidrocarburs o bé com els seus derivats oxigenats (alcohols, fenols, aldehids i cetones, èters, èsters i epòxids). La seva forma més habitual és com monoterpens regulars. Aquests poden ser acíclics (mircens, ocimens), monocíclics (D-limonè,  $\gamma$ -terpinè) o bicíclics (pinens) (figura 1). Constitueixen més del 90% de molts olis essencials, com en el cas dels obtinguts del flavedo i fulles dels cítrics (González-Mas et al., 2019).

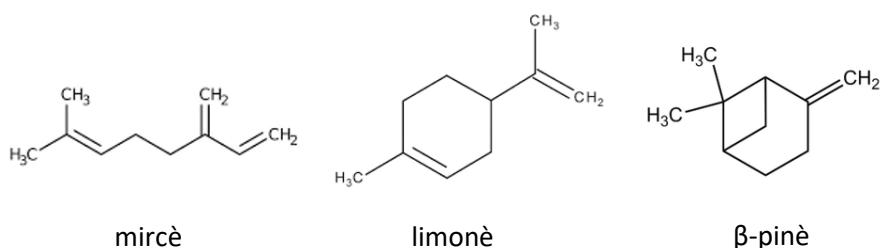


Figura 1. Estructures d'alguns monoterpens.



Els monoterpens es poden trobar moltes vegades en la seua forma oxigenada, així podem trobar-los amb els següents grups funcionals:

- Alcohols: acíclics (geraniol, linalol), monocíclics (terpinè-4-ol, mentol), bicíclics (borneol).
- Aldehids: generalment acíclics (geranial, neral, citronel·lal).
- Cetonas: acícliques (tagetona), monocícliques (mentona, carvona), bicícliques (alcanfor).
- Èsters: acíclics (acetat de linalil, acetat de citronelil) i monocíclics (acetat de mentil, acetat de isobornil).
- Fenols: timol, carvacrol.

### 1.3.3.1.2 SESQUITERPENS

Els sesquiterpens estan formats per tres unitats d'isoprè (C15) (figura 2), poden ser:

- Acíclics (bisabolè)
- Monocíclics (zingiberè, curcumè)
- Bicíclics (azulens)

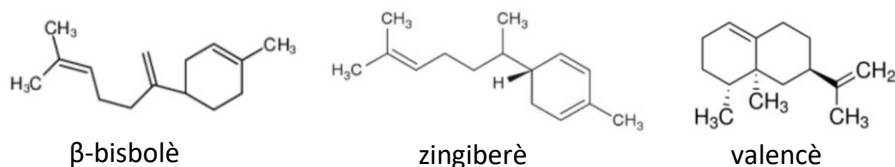


Figura 2. Estructures d'alguns sesquiterpens

### 1.3.3.1.3 DITERPENS

Els diterpens estan formats per quatre unitats d'isoprè (C20) (figura 3).

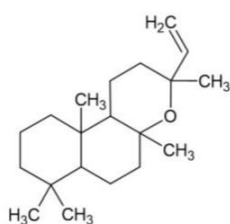


Figura 3. Òxid de manool

## 1.3.4 MÈTODES D'OBTENCIÓ DELS OLIS ESSENCIALS

Existeixen diferents mètodes d'extracció que es poden emprar per obtenir l'oli essencial. La composició i el rendiment dels olis es veuen influenciats pel tipus de mètode utilitzat.

#### 1.3.4.1 DESTIL·LACIÓ PER ARROSSEGAMENT DE VAPOR D'AIGUA

La destil·lació per arrossegament de vapor d'aigua és la tècnica més difosa per ser fàcil d'utilitzar i produir olis d'alta qualitat. Aquest mètode consisteix en la separació del compostos volàtils de la mostra fent passar a través d'ella vapor d'aigua que posteriorment condensarà i es separarà en dos líquids immiscibles, aigua i oli essencial (Carranza et al., 2012). A nivell de laboratori s'utilitzen equips com el Clevenger, on s'introdueix el material vegetal amb l'aigua i es sotmet conjuntament a ebullició. Aquest mètode es coneix com hidrodestil·lació.

Recentment, la hidrodestil·lació ha sigut objecte d'important modificació basades en l'ús de microones, que permeten optimitzar l'extracció de l'oli essencial utilitzant condicions menys agressives que l'acció prolongada de l'aigua en ebullició (Yu et al., 2018).

#### 1.3.4.2 PREMSAT EN FRED

La forma tradicional d'extraure els olis essencial dels cítrics és mitjançant el premsat en fred de les seves corfes. Aquest mètode està quasi exclusivament reservat a la producció d'olis essencials de cítrics. L'oli està present en vesícules localitzades a diferents profunditats del flavedo. La separació mecànica de l'oli essencial d'aquestes vesícules mitjançant el premsat en fred origina una emulsió d'aigua en oli. Finalment l'emulsió es centrifuga per tal d'obtenir l'extracte d'oli essencial pur (Bousbia et al., 2009).

#### 1.3.4.3 EXTRACCIÓ DE DIÒXID DE CARBONI SUPERCRÍTIC (S-CO<sub>2</sub>)

L'extracció amb fluids supercrítics ha guanyat molta rellevància en una gran varietat de camps degut a les seves particulars característiques. Els fluids supercrítics proporcionen una gran solubilitat millorant el rati de transferència de massa. A més a més, l'operació es pot modificar amb el canvi de la pressió i la temperatura d'aquest fluid. Amb aquest canvi de pressió i temperatura durant el procés s'aconsegueix l'extracció selectiva dels compostos volàtils de la mostra. El diòxid de carboni s'utilitza comunament com a fluid supercrític degut a que es segur, barat, no combustible, incolor, insípid, inodor, no tòxic i té una gran disponibilitat (Khajeh et al., 2005).

#### 1.3.4.4 EXTRACCIÓ AMB DISSOLVENTS

L'extracció amb dissolvents és un mètode utilitzat per extraure els compostos termolàbils de l'oli essencial. Aquesta tècnica consisteix en sotmetre al material vegetal a un bany amb dissolvents i una vegada finalitza l'extracció, la barreja resultant -que conté l'oli essencial- es filtra i destil·la. Els solvents més comunament emprats són el alcohol, l'etanol, l'èter de petroli i el metanol. L'extracció amb dissolvents s'utilitza principalment en la indústria del perfum. La seva aplicació en la indústria alimentària no és possible degut a que els olis essencials produïts contenen traces del dissolvent emprat (Stratakos & Koidis, 2016).

#### 1.3.4.5 MACERACIÓ O ENFLEURAGE

La maceració és un mètode convencional que es remunta a l'antiguitat. Ha estat utilitzada comunament per l'extracció d'olis essencials de flors. Aquest procés es realitza cobrint el material vegetal amb una capa de grassa freda i inodora. Els compostos volàtils d'aquests es van dissolvent en la grassa. Les flors es van reemplaçant fins que aquesta capa de grassa arriba a la

saturació. En acabant, la grassa se separa i s'extrauen els compostos de fragància amb alcohol. En l'actualitat no sembla tindre cap aplicació en la indústria alimentària i està virtualment obsoleta (Stratakos & Koidis, 2016).

## 2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

### 2.1 OBJECTIUS

Els objectius que es pretenen aconseguir amb la realització d'aquest treball són els següents:

- Determinar la influència del mètode d'extracció sobre la composició dels olis essencials de *Citrus hystrix* DC., *C. jambhiri* Lush. i *C. limon* (L.) Burm. f. cv. Rugoso comparant:
  - Extracció directa a partir de les vesícules que contenen l'oli essencial
  - Hidrodestil·lació amb equip Clevenger
  - Extracció amb dissolvents assistida per ultrasons amb centrifugació
- Identificar i quantificar els components més importants de l'oli essencial per cadascuna de les mostres mitjançant l'anàlisi per cromatografia de gasos amb detectors de espectroscòpia de masses i ionització de flama.

### 2.2 PLA DE TREBALL

Per tal d'aconseguir els objectius plantejats es va realitzar el següent pla de treball:

- Recol·lecció del material vegetal de fruits seleccionats al atzar. Les mostres varen ser aportades per Todolí Citrus Fundació.
- Obtenció dels olis essencials de les mostres mitjançant tres mètodes d'extracció: Extracció directa de les vesícules, extracció amb dissolvents assistida per ultrasons i centrifugació i hidrodestil·lació amb Clevenger.
- Anàlisi per cromatografia de gasos amb espectroscòpia de masses (GC/MS) com mètode de detecció per tal de determinar la composició dels olis essencials
- Anàlisi per cromatografia de gasos amb detector de ionització de flama (GC/FID) com mètode de detecció per tal de quantificar els compostos presents en l'oli essencial de cada mostra
- Anàlisi estadístic dels resultats mitjançant la ferramenta estadística d'anàlisi de la variància (ANOVA) per analitzar les diferències entre les mitjanes de grups i els seus procediments associats i determinar si existeixen diferències significatives.

## 3. MATERIALS I MÈTODES

### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Els fruits de les tres espècies de cítrics –*Citrus hystrix* DC., *C. jambhiri* Lush. i *C. limon* (L.) Burm. f. cv. Rugoso - que hem utilitzat per a l'elaboració del treball provenen de la col·lecció de Todolí Citrus Fundació. Els diferents fruits foren recollits amb el mateix estadi de maduresa. El material vegetal es va emprar fresc, sense cap mètode d'assecat.

## 3.2 EXTRACCIÓ D'OLI ESSENCIAL

### 3.2.1 EXTRACCIÓ DIRECTA DE LES VESÍCULES

#### 3.2.1.1 MATERIALS

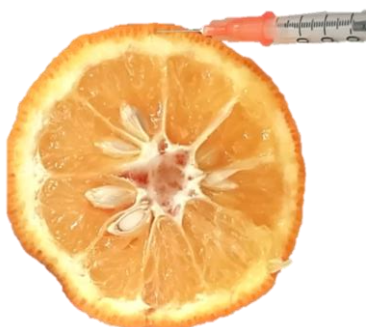
- Cotó
- Diclorometà  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Scharlau)
- Paper Parafilm
- Pipeta Pasteur
- Sulfat de sodi  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidre – Merck KGaA
- Xeringa tuberculina 1 mL (0,5 x 16 mm) de polipropilè amb agulla hipodèrmica de 0,3 mm de secció
- Vials d'insert

#### 3.2.1.2 FONAMENT

Aquest mètode d'extracció consisteix en l'aspiració directa de l'oli essencial present a les vesícules del flavedo mitjançant una xeringa d'agulla fina (Gabriele et al., 2009).

#### 3.2.1.3 METODOLOGIA

L'extracció de l'oli essencial directament de les vesícules no permet obtenir una gran quantitat d'aquest. Per accelerar el procés vam realitzar les punxions amb l'agulla a través del flavedo de manera tangencial (transversalment a l'espessor del flavedo), extraient l'oli al mateix temps que retiràvem la xeringa. D'aquesta manera es permet alliberar l'oli essencial de varies vesícules amb una sola punxada. L'oli pur es va introduir en tres vials d'insert diferents – un per cada espècie de cítric- als quals els vam afegir 300  $\mu\text{L}$  de diclorometà, afegint una xicoteta quantitat de sulfat de sodi anhidre per tal de deshidratar l'extracte. Posteriorment, aspirant a través de cotó amb una pipeta Pasteur, els extractes van ser transvasats a uns altres vials. Aquests van ser protegits amb paper Parafilm i guardats a una temperatura de 4°C sense contacte amb la llum fins el moment de ser analitzats.



*Figura 4. Representació gràfica de la tècnica emprada per realitzar l'extracció de l'oli essencial directament de les vesícules*

### 3.2.2 EXTRACCIÓ AMB SOLVENTS ASISTIDA AMB ULTRASÒ I CENTRIFUGA

#### 3.2.2.1 MATERIALS

- Agitador orbital Rotabit J.P. SELECTA®
- Aigua destil·lada
- Balança analítica

- Batidora de mà -minipimer Braun
- Cotó
- Diclorometà CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Scharlau)
- Equip de centrifuga - DIGICEN 20R Orto-Alresa
- Equip Rotavapor Laborotta4001-Heidolph
- Equipo ultrasonidos Elma- S 30 Elmasonic
- Gots de precipitats
- Llana de vidre
- Matrassos Erlenmeyer
- Paper Parafilm
- Pipetes Pasteur
- Sulfat de sodi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre – Merck KGaA
- Tubs d'assaig
- Vials d'insert
- Xeringa

### 3.2.2.2 FONAMENT

Aquest mètode consisteix en l'extracció de l'oli essencial present al flavedo, fent servir material fresc prèviament triturat per afavorir l'alliberament de l'oli al trencar les vesícules, mitjançant l'adició d'un dissolvent. La separació del component objectiu del material vegetal es basa en la seva solubilitat amb el solvent orgànic. En aquest cas es tracta de diclorometà (Llorens-Molina et al., 2017).

Per optimitzar el procés d'extracció es va fer servir un altre mètode complementari, l'acció dels ultrasons. Sotmetre al material vegetal a un bany d'ultrasò augmenta la eficiència i la velocitat d'extracció. De la mateixa manera, redueix la temperatura necessària, permet l'estalvi de dissolvent i afavoreix la solubilitat del compost objectiu (Esclapez et al., 2011).

Quant al procés de centrifugat, la seva finalitat és trencar l'emulsió formada en dues fases com a conseqüència de la diferència de densitat entre elles. Una fase orgànica composta per l'oli essencial i el diclorometà, i una fase aquosa amb les sals inorgàniques i els compostos solubles en aigua (Gallard, 2021). Una de les raons per les quals el diclorometà va ser escollit com el solvent encarregat d'extraure l'oli essencial va ser la seua densitat. Aquesta propicia la precipitació de la fase orgànica al fons dels tubs de centrifuga, facilitant la seua posterior extracció amb la pipeta Pasteur. Tanmateix, el diclorometà va ser escollit per les seues característiques físiques. El seu punt d'ebullició és relativament baix, el que permet realitzar un procés de separació del dissolvent amb el rotavapor a baixa temperatura. En aquestes condicions s'evita la pèrdua de volàtils i els possibles efectes de la descomposició tèrmica d'alguns compostos, obtenint un extracte més complex (Piñeiro et al., 2004).

Pel que fa al rotavapor, és un aparell que permet la ràpida evaporació del dissolvent d'una dissolució mitjançant una destil·lació al buit, podent recuperar el solut. Una vegada el dissolvent es condensa pot ser recollit al matràs col·lector. El rotavapor consta d'un motor rotatori el qual evita que el dissolvent bote violentament mentre s'aplica el buit fent girar el matràs. Aquest mecanisme contribueix també a que l'evaporació es duga a terme d'una manera controlada al permetre que el líquid banye una major superfície interna del matràs. El matràs de destil·lació pot ser calfat externament amb un bany termostàtic d'aigua (Chévez et al., 2014).

### 3.2.2.3 METODOLOGIA

Per dur a terme aquest procés d'extracció, en primer lloc es va separar l'epicarp i el flavedo. És convenient eliminar la major part d'albedo possible amb l'objectiu de facilitar la separació de les dues fases generades una vegada finalitzada la centrifuga. Una volta pesat el material vegetal es va triturar amb la intenció de trencar totes les vesícules possibles de l'oli essencial i propiciar la seua disgregació. La barreja resultant va ser sotmesa durant 5 minuts a un bany d'ultrasò per tal de millorar l'eficiència del procés dut a terme a temperatura ambient (Belhachat et al., 2018; Habibullah & Wilfred, 2016; Mabayo et al., 2018). Després del bany d'ultrasò, es va realitzar un filtrat amb llana de vidre col·locada dins d'una xeringa, eliminant així tots els sòlids. L'emulsió resultant es va distribuir en matrassos Erlenmeyer en quantitats de 25 mL als quals se li va afegir 2 mL de diclorometà. Els matrassos es van agitar durant 15 minuts a una velocitat de 120 rpm/min i a temperatura ambient mitjançant un agitador orbital. En acabat el procés d'homogeneïtzació els matrassos es van abocar en tubs d'assaig per a la seua centrifuga durant 10 minuts a una velocitat de 5000 rpm i a una temperatura de 4°C. Posteriorment la fase orgànica es va separar amb una pipeta Pasteur, a la que se li va afegir sulfat de sodi anhidre fins que l'extracte va quedar transparent. El líquid resultant es va filtrar amb una pipeta Pasteur a través de cotó i es va sotmetre a evaporació en el rotavapor a 25-30°C regulant la pressió de manera que l'extracte va estar bullint suaument. En el moment en que es van deixar d'apreciar les bombolles resultants de l'evaporació del dissolvent, es va extreure el matràs, es va tapar i es va pesar, tarant-lo prèviament amb el tap posat. L'operació es va repetir fins que el pes de l'oli essencial va ser constant. L'extracte pur es va anar introduint en nou vials d'insert diferents, per cada espècie de cítric es van extraure tres mostres d'oli essencial. Els vials van ser protegits amb paper Parafilm i guardats a una temperatura de 4°C sense contacte amb la llum fins el moment de ser analitzats.

### 3.2.3 EXTRACCIÓ PER HIDRODESTIL·LACIÓ

#### 3.2.3.1 MATERIALS

- Aigua destil·lada
- Balança analítica
- Batidora de mà -minipimer Braun
- Cotó
- Diclorometà CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Scharlau)
- Equip Clavenger (material complementari: mantes calefactores, matràs baló i refrigerant)
- Equip Rotavapor Laborotta4001-Heidolph
- Gots de precipitat
- Matrassos Erlenmeyer
- Paper Parafilm
- Pipetes Pasteur
- Sulfat de sodi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidre – Merck KGaA
- Vials cromatogràfics

#### 3.2.3.2 FONAMENT

L'equip Clevenger permet realitzar hidrodestil·lacions per arrossegament de vapor amb la finalitat d'extraure olis essencials. L'aparell consta d'una manta calefactora (encarregada de controlar la temperatura), un matràs baló (on s'introdueix la barreja formada per aigua

destil·lada i material vegetal per tal de portar-la a ebullició), una bureta (per separar l'oli essencial de l'aigua) i el refrigerant (per on circula l'aigua freda que condensarà el vapor format per aigua i oli essencial). Al connectar la manta calefactora, la barreja d'aigua i material vegetal es calfarà fins que trenque a bullir. Aleshores es produeix el vapor que arrossega l'oli essencial fins on es troba el refrigerant. En aquets punt l'oli essencial, junt a l'aigua, es condensa i es deposita en la bureta on, per efecte de les diferents densitats d'ambdós líquids, se separaren en dues fases. La fase aquosa se situarà en la part inferior mentre que la fase oliosa ho farà en la part superior (Lin, 2020).

### 3.2.3.3 METODOLOGIA

Per dur a terme el procés d'hidrodestil·lació amb l'equip Clevenger, primer es van pelar els fruits per tal de separar l'epicarp i el flavedo. Després de pesar el material vegetal, es va triturar per tal de trencar totes les vesícules possibles que contenen l'oli essencial i propiciar la seva disgregació. Una vegada triturat el material, la barreja es va portar a un matràs baló i se li va afegir aigua fins un volum total de 500 mL. A continuació es va desenvolupar la hidrodestil·lació fins que es va deixar d'observar més producció d'oli, unes 2 hores aproximadament. Finalitzat aquest procés es va decantar l'aigua i es va recollir l'oli afegint 1-2 mL de diclorometà per tal d'arrossegar tot allò que es va poder quedar adherit a la paret interna del Clevenger. L'extracte d'oli essencial amb el diclorometà es va recollir en un got de precipitat. Arribats a aquest punt, en el got de precipitat teníem un líquid format per dues fases clarament diferenciades. Una fase aquosa situada en la part superior i una fase orgànica, formada per l'oli essencial i el diclorometà, situada en la part inferior. D'una banda, la major part de l'aigua es va eliminar succionant amb una pipeta Pasteur. D'altra banda, les traces d'aigua es van eliminar afegint sulfat de sodi anhidre. El líquid resultant es va filtrar amb una pipeta Pasteur a través de cotó. A continuació l'extracte es va sotmetre a una evaporació en el rotavapor i es va repartir en diferents vials cromatogràfics, de la mateixa manera que en la metodologia explicada al punt 2.2.2.2 (*vide supra*). Els vials van ser protegits amb paper Parafilm i guardats a una temperatura de 4°C sense contacte amb la llum fins el moment de ser analitzats.

## 3.3 COMPOSICIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS OLIS ESSENCIALS

### 3.3.1 FONAMENT

La cromatografia de gasos és un mètode físic de separació en el que els components d'una barreja, dissolts en una fase mòbil gasosa, es van desplaçant amb diferents velocitats a través d'una fase estacionària. Aquest fenomen produeix una separació dels diferents components amb la finalitat de realitzar la seva identificació atenent a la capacitat de avanç. La velocitat d'avanç característica de cada compost dóna lloc a una diferència en els seus "temps de retenció". Per tal d'efectuar aquets procés es requereix la volatilització prèvia de la mostra, degut a que tant la fase mòbil com la barreja a separar han d'estar en estat gasós (García-Segura et al., 1996). Segons la naturalesa de la fase estacionària i el programa de temperatura emprat, els diferents compostos de la barreja són retinguts en major o menor mesura per la fase estacionària, eixint de la columna i arribant al detector en diferents temps, com s'ha indicat anteriorment.

Hi ha diferents tipus de detectors que poden ser utilitzats. En aquest treball en concret, s'ha utilitzat un detector per espectroscòpia de masses, amb la finalitat d'identificar els compostos, i un detector de ionització de flama (FID), encarregat de la quantificació dels mateixos.

L'espectrometria de masses és una tècnica en la que s'obtenen ions quan les molècules d'una substància, generalment orgànica, són sotmeses a un impacte electrònic amb un feix d'electrons a 70 eV. Aquests ions, se separen segons la seua relació massa-càrrega iònica, com a conseqüència, s'obté un espectre de masses característic d'eixa substància (Figura 5). La combinació directa de la cromatografia de gasos amb l'espectrometria de masses es reconeguda com un dels sistemes més eficaços per a l'estudi de barreges complexes de productes orgànics. Es pot obtenir informació estructural per cadascun dels components de la barreja original, a mesura que van sent eluïts en sèrie a la columna cromatogràfica, connectant l'eixida del cromatògraf de gasos a la càmera de ionització d'un espectròmetre de masses (Dabrio et al., 1973).

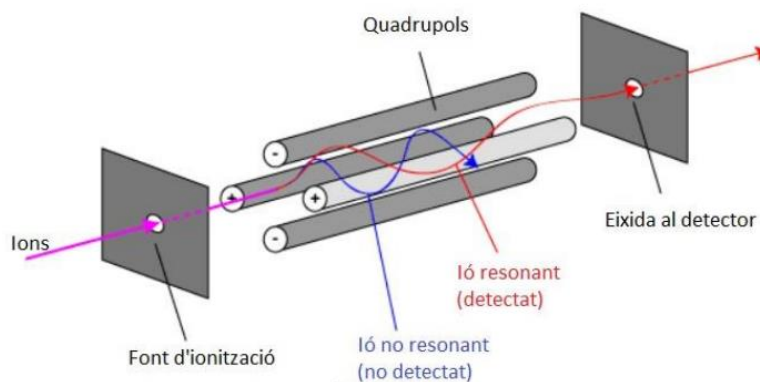


Figura 5. Detector d'espectrometria de masses (Il·lustració obtinguda del material docent de la Universitat de València)

El detector de ionització de flama és un dels més utilitzats i versàtils. S'aplica per als compostos orgànics presents en la mostra, susceptibles de ser combustionats. Es tracta d'un cremador d'hidrogen/oxigen on es barreja l'efluent de la columna (gas portador i analit) amb l'hidrogen (figura 6). Una vegada s'ha dut a terme la barreja, s'encén mitjançant una espurna elèctrica, produint-se una flama d'alta temperatura. La majoria de compostos orgànics produeixen ions i electrons quan es pirolitzen a la temperatura d'aquesta flama. La detecció dels ions produïts implica controlar la corrent originada al captar les càrregues (Skoog et al, 2008). La recollida de les càrregues s'aconsegueix aplicant centenars de volts entre la punta de l'encenedor i l'elèctrode col·lector, dispostat sobre la flama. Un pic amperímetre mesura la corrent resultant.

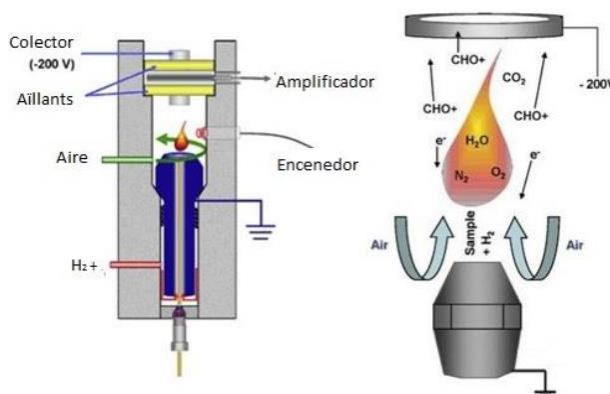


Figura 6. Detector de ionització de flama. (Il·lustracions obtingudes del material docent de les universitats de València i Politècnica de Catalunya, respectivament)

El detector FID és sensible al nombre d'àtoms de carboni transportats per unitat de temps. Per tant, es un dispositiu capaç de captar la massa però no la concentració. Com a conseqüència, aquest detector té un important avantatge, els canvis de velocitat de flux de la fase mòbil no afecten en la seua resposta (Marín, 2014).



### 3.3.2 METODOLOGIA

L'anàlisi de les mostres es va realitzar mitjançant cromatografia de gasos amb detector de ionització de flama (GC-FID) i espectrometria de masses (GC-MS).

Per l'anàlisi quantitatiu es va emprar un cromatògraf Clarus 500 GC (Perkin-Elmer Inc. Wellesley, PA. EE. UU.) equipat amb un detector FID i una columna capil·lar ZB-5 (30 m x 0,25 mm de diàmetre intern x 0,25 µm d'espessor de pel·lícula; Phenomenex Inc. Torrance, CA. EE. UU.). El volum d'injecció va ser d'1 µL. La temperatura del forn del GC es va programar amb una rampa de calfament de 50°C a 250°C a una velocitat de 3°C min<sup>-1</sup>. Per al gas portador es va utilitzar heli (1,2 mL min<sup>-1</sup>). Les temperatures del injector i el detector es van fixar a 250°C. La composició percentual de l'oli essencial es va calcular a partir de les àrees dels pics del cromatograma sense factors de correcció mitjançant el sotware Total Chrom 6.2 (Perkin-Elmer Inc., Wellesley, OA. EE. UU.).

L'anàlisi per qualitatiu es va emprar un aparell Claurs GC-MS (Perkin-Elmer Inc.) equipat amb la mateixa columna capil·lar, portador i condicions operatives descrites anteriorment per a l'anàlisi GC-FID. La temperatura de la font de ionització es va ficar en 200°C i es va utilitzar el mètode d'impacte electrònic a 70 eV. Els espectres de masses es van obtenir mitjançant el mètode d'escombratge de ions totals (TIC) (rang de masses m / z 45-500 uma). Els cromatogrames de ions totals i els espectres de masses es van processar amb el sotware Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Els índex de retenció es van determinar mitjançant la injecció d'estàndards de n-alcans C8-C25 (Supelco, Bellefonte, PE, EE. UU.) en les mateixes condicions.



Figura 7. Fotografia de cromatògraf de gasos i un detector de masses Clarus 500 GC-MS

La identificació dels pics es va realitzar combinant el càlcul dels seus índex de retenció i l'anàlisi mitjançant GC-MS. En primer lloc, els índex de retenció van ser calculats per mitjà de l'expressió (Dool & Kratz, 1962):

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

On:

- n és el nombre d'àtoms de carboni del n-alcà que elueix abans del pic analitzat
- N és el nombre d'àtoms de carboni del n-alcà que elueix després del pic analitzat

- $z$  es la diferencia del número d'àtoms de carboni del  $n$ -alcà entre el que elueix abans del pic analitzat i el de després del pic analitzat 16
- $t_{Rx}$  és el temps de retenció del pic analitzat
- $t_{Rn}$  és el temps de retenció del  $n$ -alcà anterior al pic analitzat
- $t_{RN}$  és el temps de retenció del  $n$ -alcà posterior al pic analitzat

Per realitzar els càlculs dels índexs de retenció de cada pic es necessari determinar, en les mateixes condicions de treball, els temps de retenció de la sèrie homòloga dels  $n$ -alcans considerats, obtenint el cromatograma corresponent:

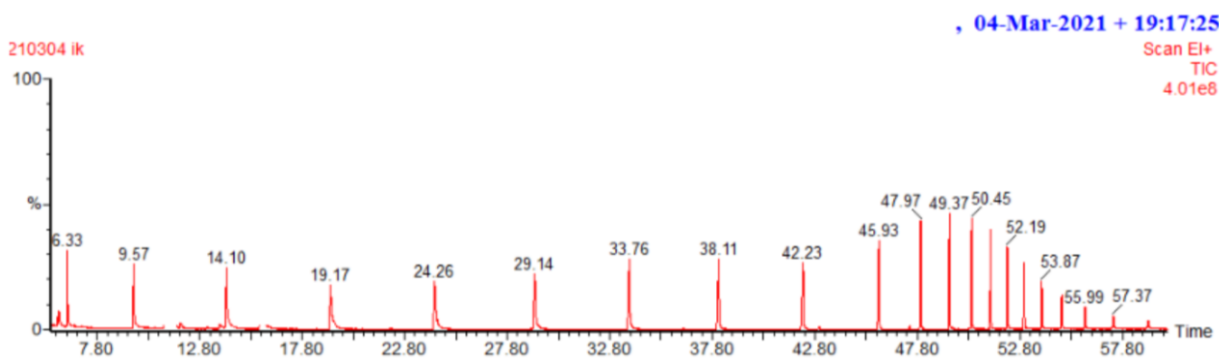


Figura 8. Cromatograma dels patrons de la sèrie homòloga dels  $n$ -alcans considerats

Els components de l'oli essencial es van identificar mitjançant la comparació dels índex de retenció calculats i les coincidències d'alta probabilitat d'acord amb la recerca en la biblioteca informàtica d'espectres de masses (NIST MS 2.0), a través de les aplicacions informàtiques AMDIS i Turbomass 2.0, i les dades disponibles de la literatura (Adams, 2007).

El següent exemple mostra el procés d'identificació mitjançant CG-EM.

El primer pas va ser obrir el cromatograma de la mostra a estudiar dins del programa Turbomass 2.0.

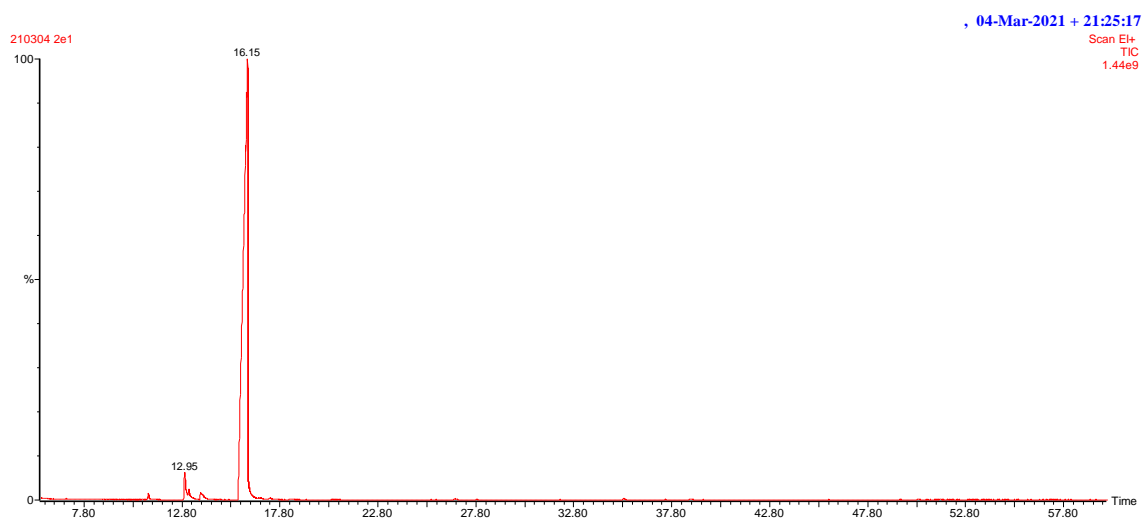


Figura 9. Cromatograma complet corresponent al *C. jambhiri* per GC/MS

Seguidament, s'integren i editen els pics obtinguts.

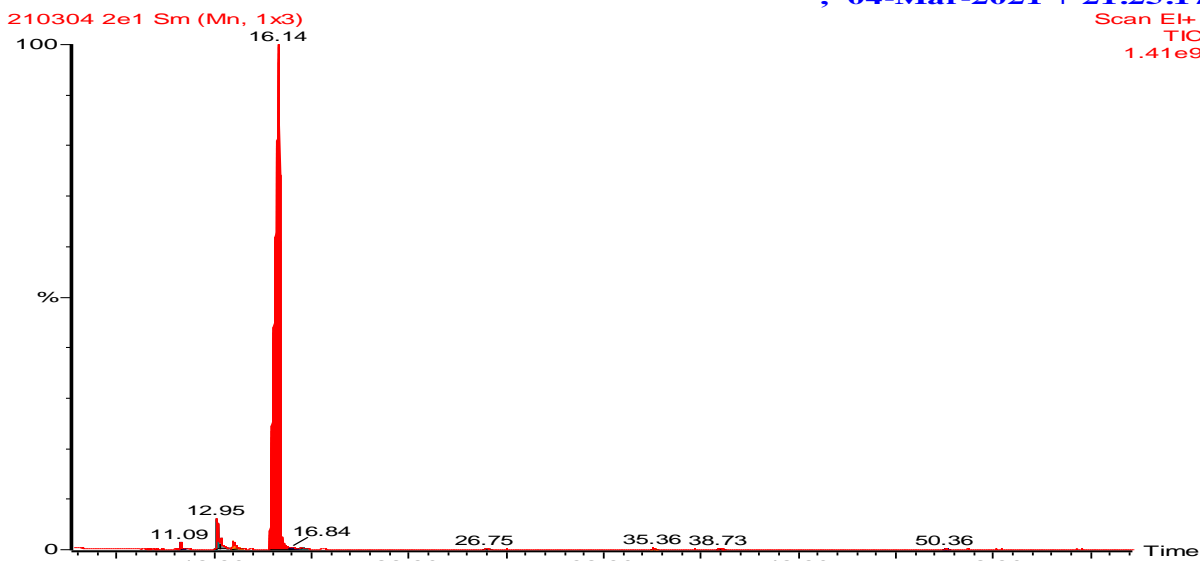


Figura 10. Cromatograma complet corresponent al C. jambhiri per GC/MS amb els pics integrats

A continuació, es va fer un llistat en el programa Microsoft Excel dels pics detectats. Amb el valor del temps de retenció per la sèrie dels n-alcans, es calculen els índexs de retenció lineals (Linear Retention Indices -LRI-).

tr	LRI	Area relativa (%)			
5.964	0	0,03	27.268	1262	0,01
6.389	801	0,02	27.843	1273	0,06
6.904	806	0,10	30.929	1339	0,03
10.776	927	0,02	32.045	1363	0,03
11.086	933	1,16	32.090	1364	0,03
12.947	975	5,25	32.170	1366	0,02
13.162	979	1,83	32.650	1376	0,02
13.767	993	1,32	32.710	1377	0,02
14.672	1011	0,02	34.896	1426	0,02
14.692	1012	0,02	35.361	1437	0,24
15.198	1022	0,02	37.462	1485	0,05
16.143	1040	87,81	37.657	1490	0,01
16.843	1054	0,36	37.877	1495	0,01
17.308	1063	0,34	38.122	1500	0,02
17.714	1071	0,04	38.733	1515	0,15
17.764	1072	0,03	39.398	1531	0,03
17.859	1074	0,02	45.806	1697	0,04
17.949	1076	0,02	45.921	1700	0,03
18.014	1077	0,01	46.861	1746	0,02
18.399	1085	0,04	49.067	1878	0,01
18.494	1087	0,03	49.447	1907	0,03
18.774	1092	0,02	49.517	1914	0,02
18.869	1094	0,01	50.358	1991	0,08
20.500	1126	0,02	51.233	2085	0,02
20.565	1127	0,02	51.528	2119	0,03
20.670	1129	0,01	51.873	2161	0,02
25.422	1224	0,02	52.183	2199	0,01
25.522	1226	0,03	52.984	2297	0,02
25.652	1229	0,02	53.274	2331	0,02
25.762	1231	0,02	55.475	2555	0,01
26.202	1240	0,01	57.126	2682	0,02
26.753	1251	0,17	57.356	2699	0,02
					100,00

Figura 11. Llistat dels pics detectats.

L'àrea relativa dels pics també proporciona una aproximació quantitativa del perfil de l'oli essencial analitzat.

El procés d'identificació de cada un dels pics del cromatograma es descrit a continuació i s'aplica per tots aquells que per l'abundància d'ions en l'espectre de masses permet una comparació satisfactòria amb les dades proporcionades en les llibreries.

Per exemple, per a un pic de  $t_r = 12,95$  (Figura 9), l'aplicació turbomass mostra el seu espectre de masses.

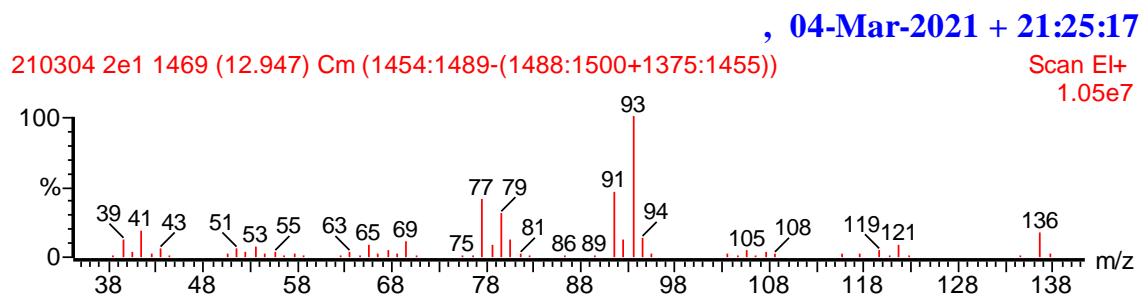


Figura 12. Espectre de masses obtingut experimentalment corresponent al pic amb  $t_r=12,95$ .

La identificació pot ser automàtica o manual, en aquest cas es mostra com realitzar-la manualment consultant la llibreria d'espectres de masses de Adams, R.P. (2007).

RT: 6.91 AI: 969 KI: 975 **Sabinene**  
 CAS#: 3387-41-5 MF: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> FW: 136 MSD LIB#: 304  
 CN: bicyclo(3.1.0)hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-  
 Synonyms: 4(10)-thujene  
 Source: distillation of black pepper, RP Adams #5448; 82.90% *Juniperus sabina*,  
 J. Chromatog. 396:416(1987); 62.36% *Litsea cubeba* (flower); 61.91% *Citrus paradisi*

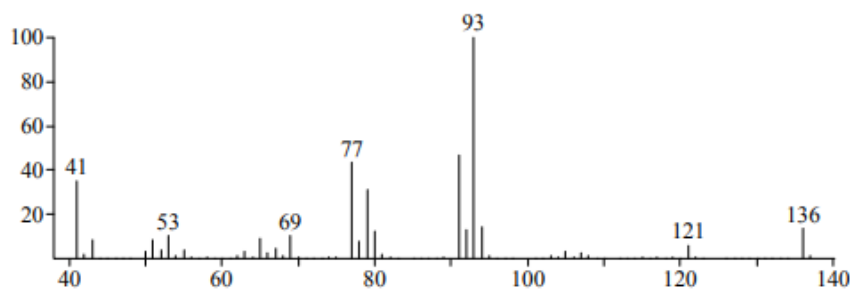


Figura 13. Espectre de masses proporcionat per la llibreria Adams, R.P. (2007) corresponent al sabinè.

En aquest cas la similitud és evident i la identificació es pot considerar correcta, tenint en compte també que l'índex de retenció experimental (LRI=975) és igual al bibliogràfic (LRI=975). El pic molecular, quan apareix (depèn de l'estabilitat de la molècula al experimentar l'impacte electrònic), també proporciona informació útil, ja que podem confirmar la massa molecular de la substància. En aquest cas s'observa que el seu valor és 136.

El programa AMDIS permet realitzar la identificació automàticament, ordenant segons la seua similitud els espectres de masses de cada pic amb els de la llibreria NIST 2.0. Cal tindre en compte al interpretar l'informe degut a que segons la font de procedència de les dades pot aparèixer indistintament algun dels noms comuns o sistemàtics.

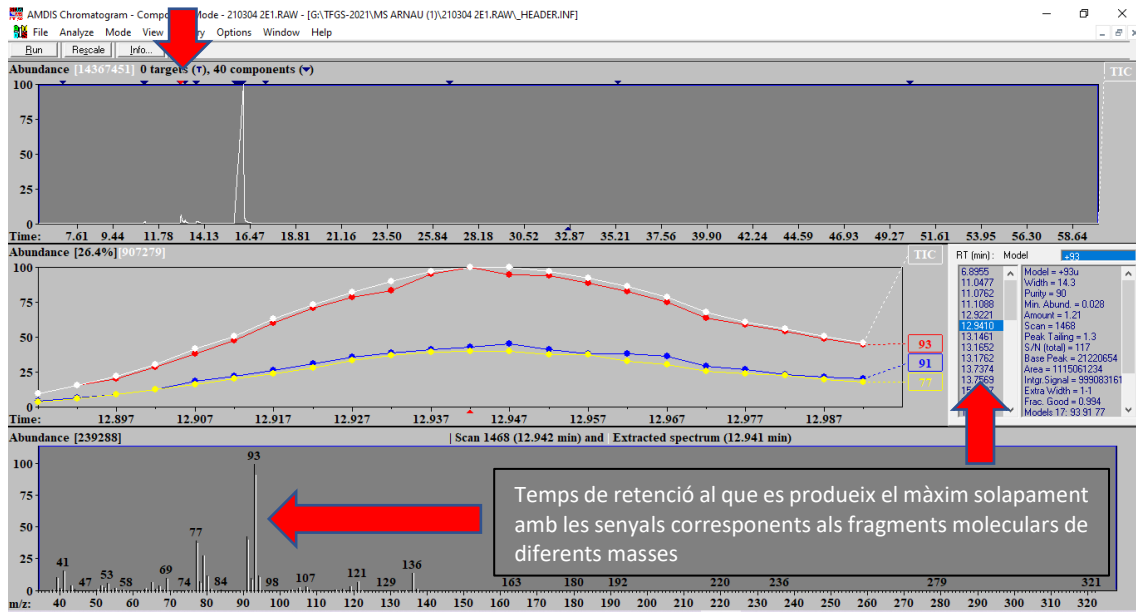


Figura 14. Captura de pantalla del programa AMDIS. La fletxa superior és una ampliació del pic, la fletxa intermèdia indica el temps de retenció i la fletxa inferior és l'espectre de masses del pic procedent del cromatograma.

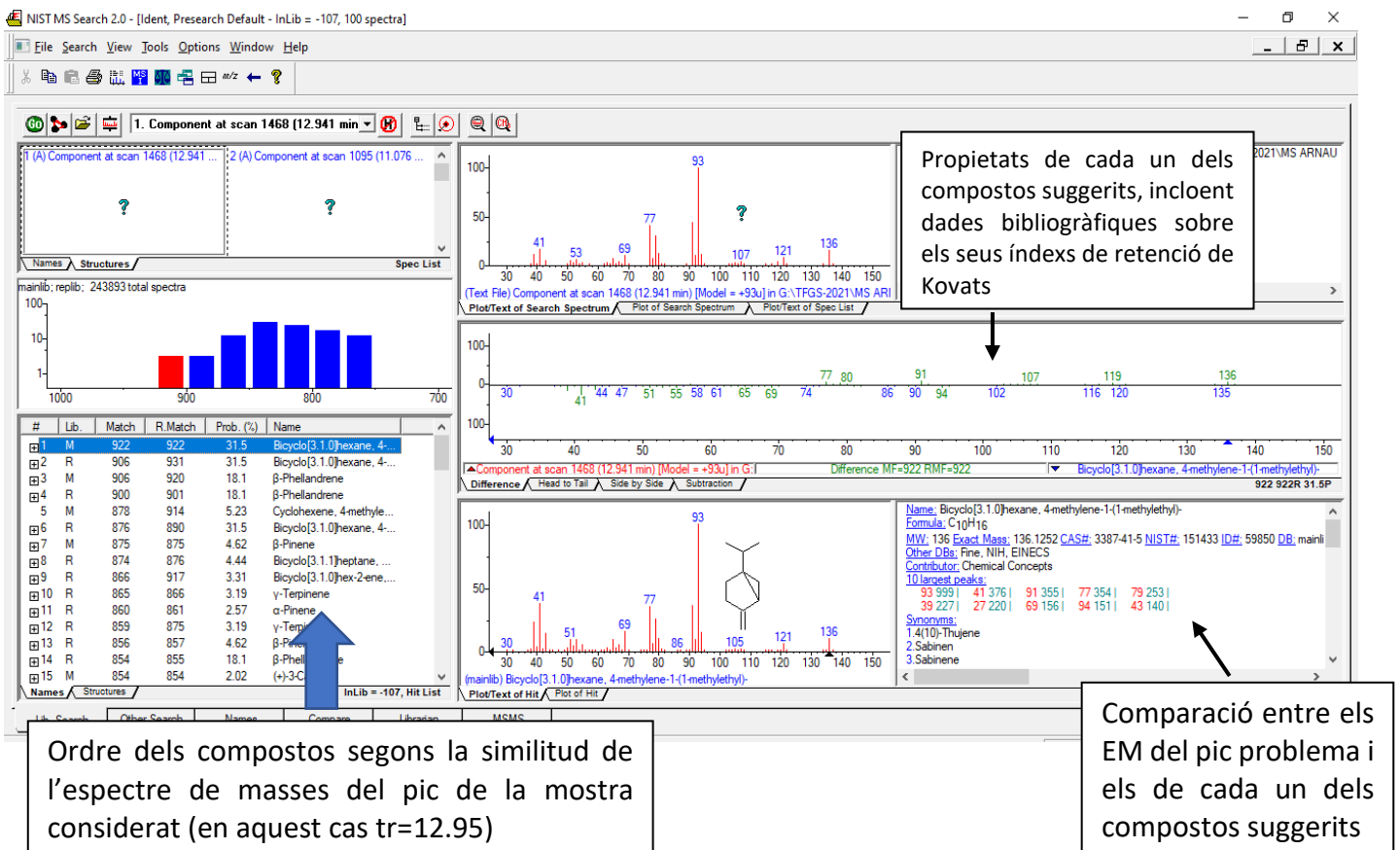


Figura 15. Captura de pantalla de NIST 2.0.

La determinació de l'índex de retenció permet discriminar entre les substàncies proposades en les primeres posicions. Si el temps de retenció del pic concorda amb el LRI de la llibreria, es confirma que el pic estudiat correspon a la substància citada. En els casos en que s'ha disposat de patrons purs, la confirmació de la natura dels pics també s'ha realitzat d'aquesta manera.

### 3.4 ANÀLISI ESTADÍSTIC

Una vegada obtinguts els resultats experimentals es va realitzar un processament estadístic. Aquests resultats es van sotmetre a un anàlisi de variància unidimensional (ANOVA), amb el programa Statgraphics Centurion, per tal de determinar si existeixen diferències significatives entre els diferents tipus de mètodes d'extracció. Amb aquest procediment es van poder conèixer les diferències de composició dels olis essencials analitzats depenent del mètode d'extracció. Per a la interpretació dels resultats es va fer ús de les taules "Resum de l'Anàlisi", "Resum Estadístic" "Taula ANOVA", "Taula de Mitjanes", "Proves de Múltiples Rangos" i "Verificació de la Variància" i del gràfic "Gràfic de mitjanes". Per tal de discriminar entre les mitges es va emprar el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$ . Els resultats es van expressar en  $\% \pm$  error estàndard.

Per al seu anàlisi, les dades expressades com a percentatges van ser transformades mitjançant l'operador ASENSO( $RAIZ(x/100)$ ) (on la "x" és el resultat sobre el qual es vol garantir l'homoscedasticitat) amb l'aplicació MS Excel per tal de garantir l'homogeneïtat de variàncies, pràctica habitual en els treballs sobre olis essencials.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 COMPOSICIÓ DE L'OLI ESSENCIAL

Els cromatogrames referents a l'espectrometria de masses provenen de les mostres obtingudes mitjançant l'extracció directa, degut a que es considera el mètode més respectuós amb la composició real de l'oli. És per aquesta raó que la identificació es va dur a terme amb els mostres extretes per aquest mètode en concret. Una vegada analitzats els cromatogrames dels olis essencials de les tres espècies de cítrics, es van identificar la majoria dels seus components.

#### 4.1.1 *Citrus hystrix*

A continuació es mostra el cromatograma obtingut mitjançant per al *C. hystrix* DC. mitjançant l'extracció directa, on apareixen marcats els components identificats ordenats segons del seu respectiu temps de retenció.

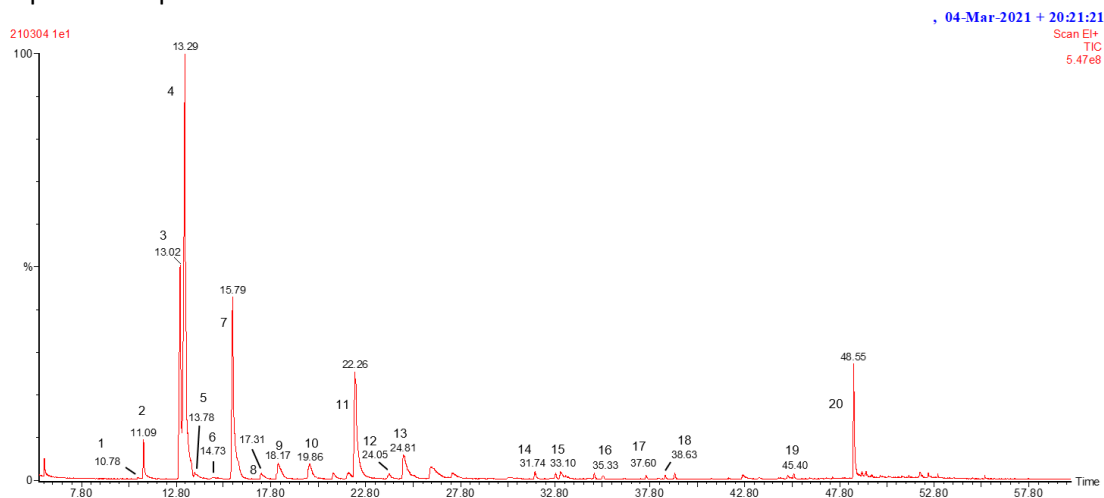


Figura 16. GC/MS cromatograma complet corresponent al *C. hystrix* amb la identificació dels components majoritaris. Components majoritaris [ $> 0,1\%$  de l'àrea del pics en el TIC -Total ion chromatogram].

(1)  $\alpha$ -thujè<sup>1</sup> [0,08%], (2)  $\alpha$ -pinè [2,01%], (3) sabinè [11,57%], (4)  $\beta$ -pinè [25,85%], (5) mircè [0,35%], (6)  $\alpha$ -terpinè [0,29%], (7) limonè [15,55%], (8)  $\gamma$ -terpinè [0,81%], (9) terpinolè [2,78%], (10) linalool [2,44%], (11) citronel·lal [12,59%], (12) terpinè-4-ol [0,57%], (13)  $\alpha$ -terpineol [4,40%], (14) acetat de citronelil [0,58%], (15) acetat de geranil [0,77%], (16) bergamotè [0,22%] (17) valencè [0,21%], (18)  $\beta$ -bisabolè [0,20%], (19)  $\alpha$ -bisabolol [0,27%], (20) nootkatona [5,45%]

Finalitzada la identificació dels component majoritaris, es va realitzar una estimació de la proporció relativa d'aquests. La composició percentual de l'oli essencial es va calcular a partir de les àrees de pic del cromatograma obtingut mitjançant GC/FID, atès que aquest tipus de detector, pel seu fonament, dóna una aproximació quantitativa més acurada. Cal mencionar que la quantificació dels components dels olis essencials només es va realitzar per a les mostres obtingudes per extracció amb solvents i per hidrodestil·lació, ja que les mostres obtingudes per extracció directa sols es van emprar per realitzar l'anàlisi qualitatiu, degut a les raons mencionades anteriorment. A continuació es mostra la taula on s'exposen els resultats, referents a la quantitat relativa de cada component, obtinguts per al mètode d'extracció amb solvents i a la hidrodestil·lació.

Taula 7. Composició química de l'oli essencial de *C. hystrix*. Resultats expressats en el tant per cent respecte a l'àrea total dels pics del cromatograma obtingut mitjançant GC/FID.

Compost	LRI	Mètode d'extracció			
		Extracció amb solvents		Hidrodestil·lació	
		$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	
$\alpha$ -thujè	926	0,09 $\pm$ 0,03	a	0,2 $\pm$ 0,0	a
$\alpha$ -pinè	933	1,8 $\pm$ 0,05	b	2,3 $\pm$ 0,01	a
sabinè	973	13,6 $\pm$ 0,5	b	22,0 $\pm$ 0,6	a
$\beta$ -pinè	978	20,8 $\pm$ 0,7	b	33,1 $\pm$ 0,9	a
mircè	989	0,7 $\pm$ 0,02	b	1,2 $\pm$ 0,05	a
$\alpha$ -terpinè	1006	0,4 $\pm$ 0,2	a	0,08 $\pm$ 0,0	a
limonè	1030	6,2 $\pm$ 1,5	a	7,4 $\pm$ 1,5	a
$\gamma$ -terpinè	1058	0,5 $\pm$ 0,1	a	0,4 $\pm$ 0,06	a
terpinolè	1071	2,5 $\pm$ 0,07	a	1,0 $\pm$ 0,04	b
linalol	1100	1,7 $\pm$ 0,8	a	1,2 $\pm$ 0,1	a
citronel·lal	1153	9,6 $\pm$ 0,3	b	14,0 $\pm$ 1,2	a
terpinè-4-ol	1179	0,6 $\pm$ 0,04	b	1,3 $\pm$ 0,1	a
$\alpha$ -terpineol	1196	3,0 $\pm$ 0,1	a	1,2 $\pm$ 0,04	b
acetat de citronelil	1349	0,5 $\pm$ 0,02	a	0,7 $\pm$ 0,1	a
acetat de geranil	1378	0,8 $\pm$ 0,1	a	1,2 $\pm$ 0,1	a
bergamotè	1419	0,5 $\pm$ 0,1	a	0,2 $\pm$ 0,02	b
valencè	1480	0,6 $\pm$ 0,2	a	0,05 $\pm$ 0,01	b
$\beta$ -bisabolè	1507	1,3 $\pm$ 0,6	a	-	
$\alpha$ -bisabolol	1664	0,4 $\pm$ 0,02	a	-	
nootkatona	1802	10,6 $\pm$ 0,2	a	-	
<b>Hidrocarburs monoterpènics</b>		46,6 $\pm$ 0,9	b	67,6 $\pm$ 1,7	a
<b>Monoterpens oxigenats</b>		16,1 $\pm$ 1,2	a	19,5 $\pm$ 1,5	a
<b>Hidrocarburs sesquiterpènics</b>		1,4 $\pm$ 0,9	a	0,2 $\pm$ 0,02	b
<b>Sesquiterpens oxigenats</b>		11,2 $\pm$ 0,2	a	-	
<b>Alcans (cadena llarga)</b>		3,4 $\pm$ 0,3	a	-	
<b>Total</b>		79,6 $\pm$ 1,2		87,4 $\pm$ 0,4	

RI: índex de retenció.  $\bar{X}$ : mitjana de les repeticions. SE: error estàndard. Les lletres (a,b) expressen diferències honestament significatives (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$ . Lletres iguals per al mateix compost (per exemple, a,a) expressen diferències no significatives.

<sup>1</sup> El  $\alpha$ -thujè, malgrat no superar el 0,1% de la composició total, es considera un compost important degut a que s'ha identificat en totes les mostres obtingudes de les tres espècies estudiades per a cada mètode d'extracció. Aquest criteri es repeteix en els apartats posteriors.

Existeixen diferències significatives en l'àrea dels compostos al  $\alpha$ -pinè, sabinè,  $\beta$ -pinè, mircè,  $\gamma$ -terpinè, terpinolè, citronel·lal, terpinè-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, bergamotè i valencè. Els compostos  $\beta$ -bisabolè,  $\alpha$ -bisabolol i nootkatona apareixen només a la mostra obtinguda mitjançant l'extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. Els compostos identificats es poden classificar per la seua estructura química en quatre grups: hidrocarburs monoterpènics, monoterpens oxigenats, hidrocarburs sesquiterpènics i sesquiterpens oxigenats. Els dos grups químics majoritaris, independentment del mètode d'extracció emprat, són els hidrocarburs monoterpènics i els monoterpens oxigenats. Cal destacar que la quantitat relativa d'hidrocarburs monoterpènics extreta per hidrodestil·lació és molt major que la extreta amb dissolvents. Pel que fa als hidrocarburs sesquiterpènics i als sesquiterpens oxigenats, aquests últims es van extreure en més quantitat pel mètode amb dissolvents però no van aparèixer en l'extracte hidrodestil·lat, mentre que els hidrocarburs sesquiterpènics es van extraure per ambdós mètodes. També es van identificar una sèrie d'alcans de cadena llarga, que sols van estar presents en els extractes obtinguts mitjançant l'extracció amb dissolvents. Aquests compostos s'han agrupat en la taula com a un sol grup químic. Per a totes les gràfiques, als resultats se li ha aplicat la transformació  $Asen\sqrt{x\%/100}$  per tal de garantir l'homogeneïtat de variàncies.

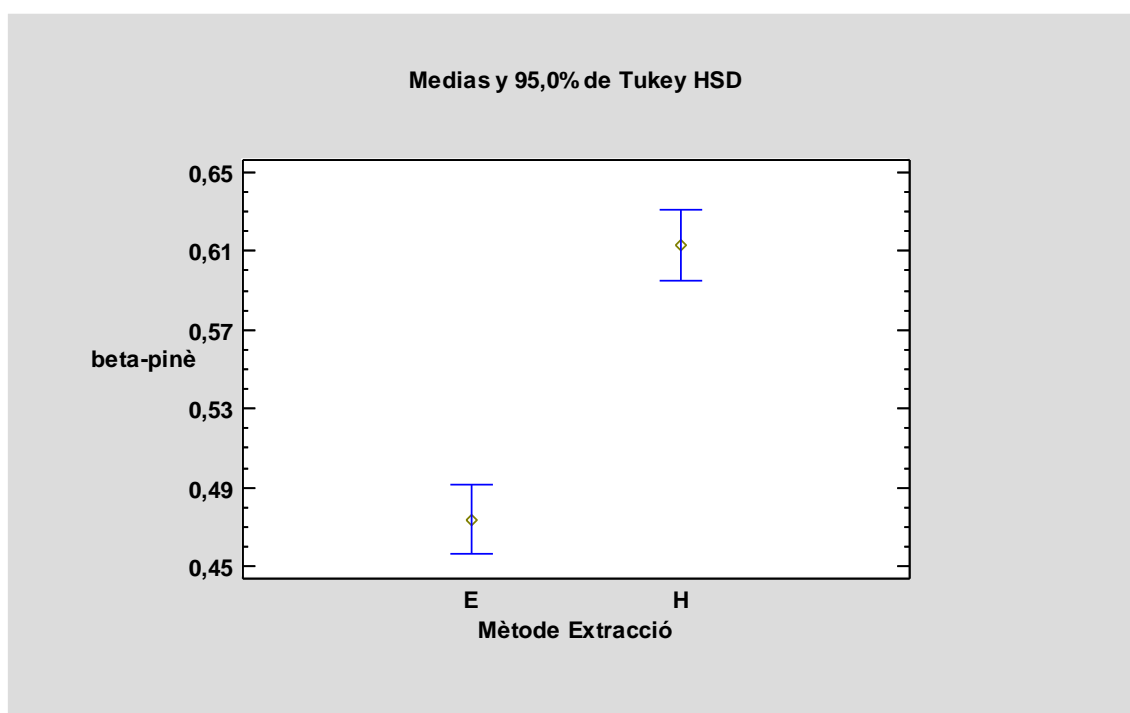


Figura 17. Interval basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost  $\beta$ -pinè en oli essencial de *C. hystrix*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(RAIZ(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

El  $\beta$ -pinè és un dels compostos que presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats. Apareix en més quantitat en les mostres obtingudes per hidrodestil·lació que en les obtingudes mitjançant el mètode d'extracció amb solvents.



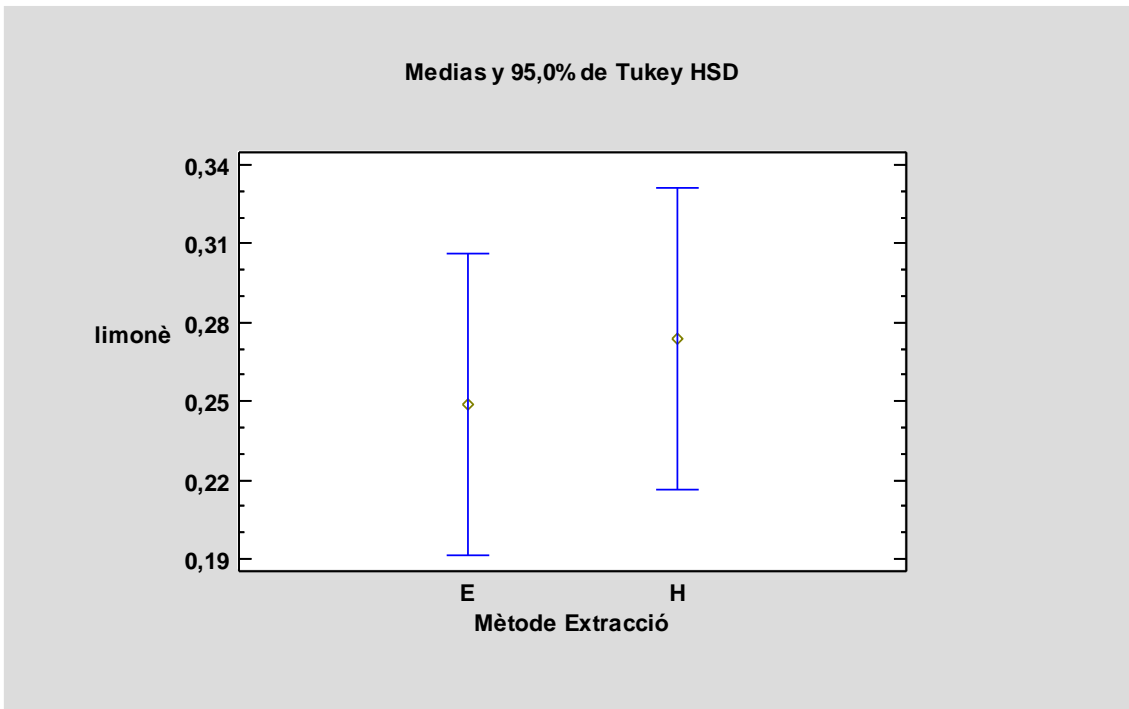


Figura 18. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost limonè en oli essencial de *C. hystrix*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrifuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(\text{RAIZ}(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

El limonè és un dels compostos que no presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats.

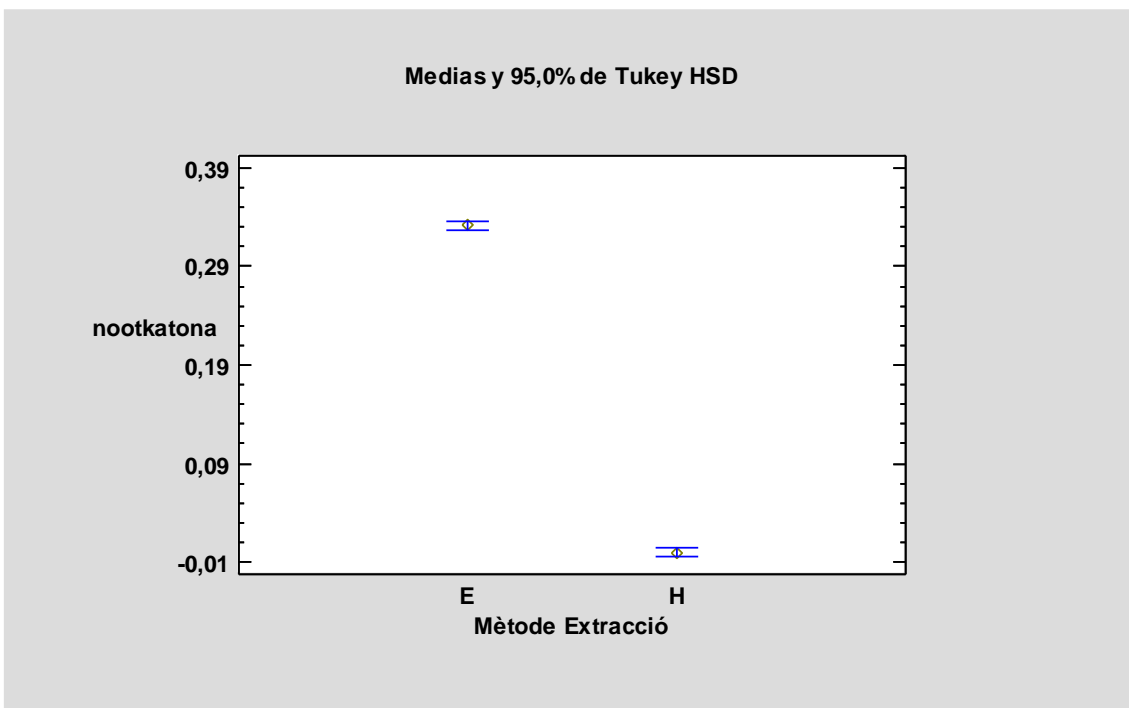


Figura 19. Interval basat en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost nootkatona en oli essencial de *C. hystrix*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrifuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(\text{RAIZ}(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

La nootkatona és un dels compostos que només apareix en els extractes obtinguts pel mètode d'extracció amb solvents. Una possible raó per la qual aquest compost no ha aparegut en els extractes obtinguts per hidrodestil·lació podria ser la seua volatilitat. La nootkatona es una cetona sesquiterpènica, un terpenoid de 15 àtoms de carboni, menys volàtil que monoterpens com el  $\alpha$ -terpinè. A més del seu major número d'àtoms de carboni, el fet de que siga una cetona (polar) redueix encara més la volatilitat del compost, el que explica la seua absència en l'extracte hidrodestil·lat.

#### 4.1.2 *Citrus jambhiri*

A continuació es mostra el cromatograma obtingut per al *C. jambhiri* Lush., on apareixen marcats els components identificats ordenats segons del seu respectiu temps de retenció.

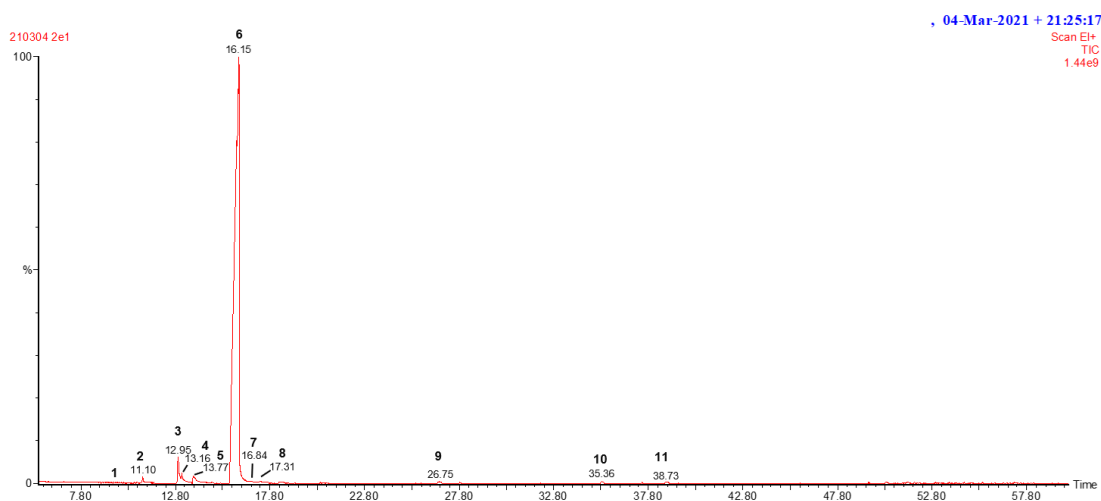


Figura 20. GC/MS cromatograma complet corresponent al *C. jambhiri* amb la identificació dels components majoritaris. Components majoritaris [ $> 0,1$  % de l'àrea del pics en el TIC -Total ion chromatogram].

(1)  $\alpha$ -thujè [0,02%], (2)  $\alpha$ -pinè [1,16%], (3) sabinè [5,25%], (4)  $\beta$ -pinè [1,83%], (5) mircè [1,32%], (6) limonè [87,81%], (7) E- $\beta$ -ocimè [0,36%], (8)  $\gamma$ -terpinè [0,34%], (9) precocè I [0,17%], (10) bergamotè [0,24%], (11)  $\beta$ -bisabolè [0,15%]

L'estimació de les proporcions relatives dels compostos identificats es va realitzar de la mateixa manera que en l'apartat anterior.

A continuació es mostra la taula on s'exposen els resultats, referents a la quantitat relativa de cada component, obtinguts per al mètode d'extracció amb solvents i a la hidrodestil·lació.

Taula 8. Composició química de l'oli essencial de *C. jambhiri*. Resultats expressats en el tant per cent respecte a l'àrea total dels pics del cromatograma obtingut mitjançant GC/FID.

Compost	LRI	Mètode d'extracció			
		Extracció amb solvents		Hidrodestil·lació	
		$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	
$\alpha$ -thujè	926	(tr)	a	(tr)	a
$\alpha$ -pinè	933	0,5 $\pm$ 0,01	a	0,4 $\pm$ 0,0	b
sabinè	973	3,3 $\pm$ 0,1	a	2,7 $\pm$ 0,1	b
$\beta$ -pinè	978	0,2 $\pm$ 0,0	a	0,1 $\pm$ 0,01	b
mircè	989	1,7 $\pm$ 0,05	a	1,7 $\pm$ 0,01	a
Limonè	1029	87,1 $\pm$ 1,7	a	85,2 $\pm$ 0,3	a
E- $\beta$ -ocimè	1046	0,2 $\pm$ 0,02	a	0,2 $\pm$ 0,01	a
$\gamma$ -terpinè	1058	0,07 $\pm$ 0,02	a	0,05 $\pm$ 0,01	a
precocè I	1247	0,2 $\pm$ 0,05	a	-	
bergamotè	1432	0,2 $\pm$ 0,01	a	0,1 $\pm$ 0,01	b
$\beta$ -bisabolè	1507	0,4 $\pm$ 0,02	a	0,2 $\pm$ 0,01	b
<b>Hidrocarburs monoterpènics</b>		93,0 $\pm$ 1,8	a	90,4 $\pm$ 0,3	a
Altres		0,2 $\pm$ 0,05	a	-	
<b>Hidrocarburs sesquiterpènics</b>		0,6 $\pm$ 0,02	a	0,3 $\pm$ 0,02	b
<b>Total</b>		93,8 $\pm$ 1,8		90,7 $\pm$ 0,2	

RI: índex de retenció.  $\bar{X}$ : mitjana de les repeticions. SE: error estàndard. tr: traces. Les lletres (a,b) expressen diferències honestament significatives (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$ . Lletres iguals per al mateix compost (per exemple, a,a) expressen diferències no significatives.

Existeixen diferències significatives en l'àrea dels compostos al  $\alpha$ -pinè, sabinè,  $\beta$ -pinè, bergamotè i  $\beta$ -bisabolè. El precocè I apareix apareixen només a la mostra obtinguda mitjançant l'extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. Els compostos identificats es poden classificar per la seua estructura química en tres grups: hidrocarburs monoterpènics, hidrocarburs sesquiterpènics i altres. El grup químic majoritari continua sent el dels hidrocarburs monoterpènics. En aquest cas la proporció encara és major degut a l'abundant presència de limonè en els dos extractes. Per a totes les gràfiques, als resultats se li ha aplicat la transformació  $Asen\sqrt{x\%/100}$  per tal de garantir l'homogeneïtat de variàncies.

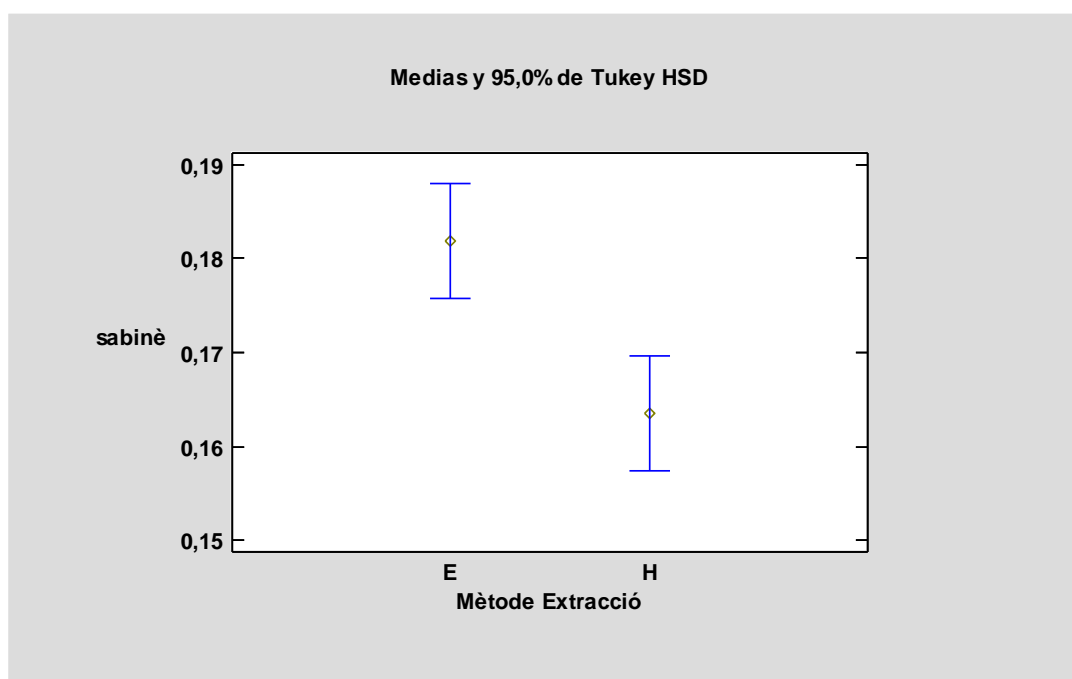


Figura 21. Interval basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost sabinè en oli essencial de *C. jambhiri*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(\text{RAIZ}(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

El sabinè és un dels compostos que presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats. Apareix en més quantitat en les mostres obtingudes mitjançant el mètode d'extracció amb solvents que les obtingudes per hidrodestil·lació.

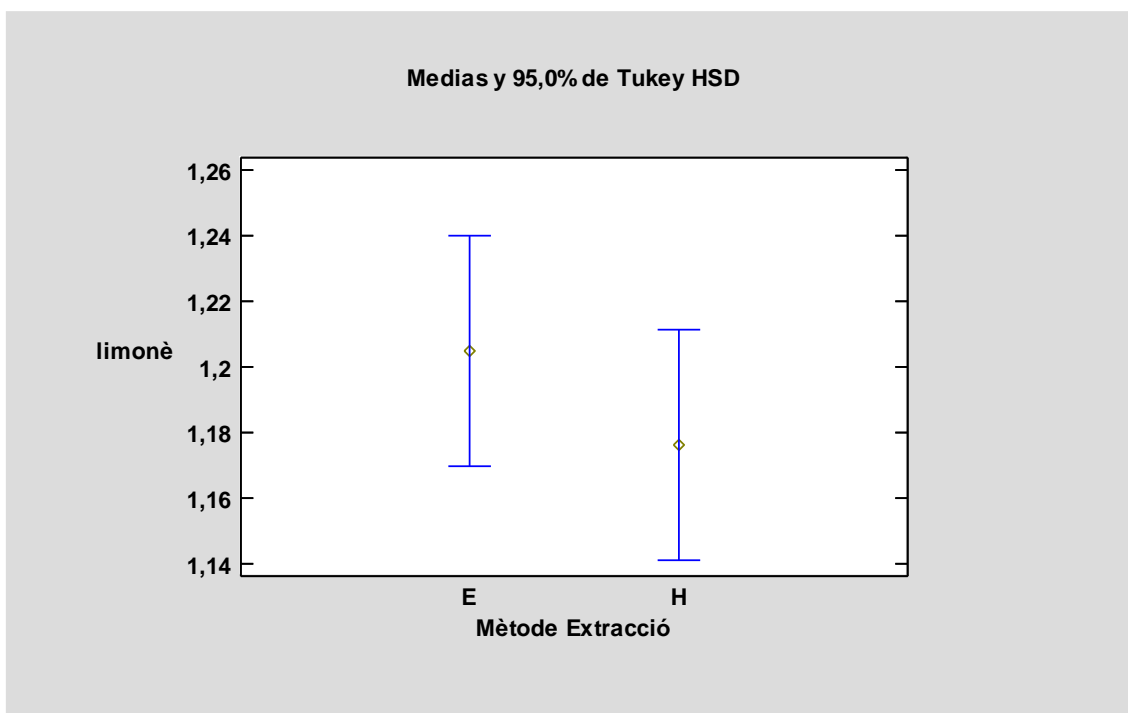


Figura 22. Interval basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost limonè en oli essencial de *C. jambhiri*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrifuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(\text{RAIZ}(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

En aquesta espècie de cítric el limonè continua sent un dels compostos que no presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats.

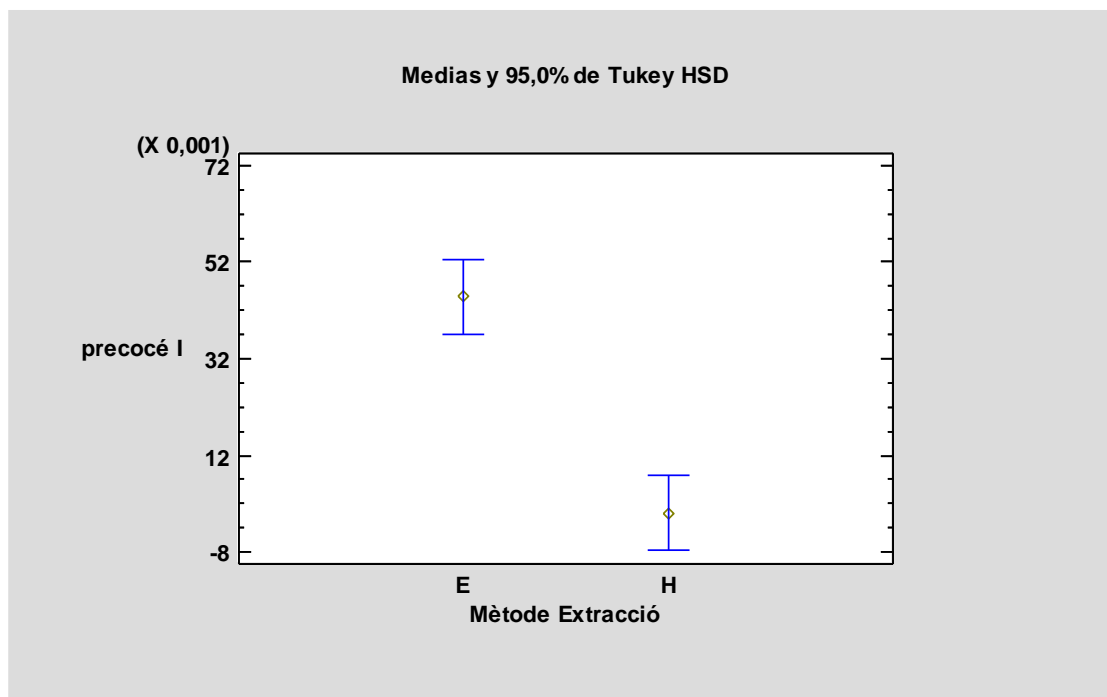


Figura 23. Intervalos basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost precocè I en oli essencial de *C. jambhiri*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrifugació. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(RAIZ(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

Per aquest compost s'ha proposat com a possible candidat el precocè I. L'elecció s'ha fonamentat en el seu espectre de masses, el qual coincideix quasi a la perfecció. No obstant, l'índex de retenció no concorda ( $LRI_{precocè} = 1461 / LRI_{compost} = 1071$ ). Caldria continuar investigant per tal d'esbrinar si hi ha algun derivat estructural del precocè I que pogués tindre els mateixos ions majoritaris en l'espectre de masses però que per la seua polaritat tingués un índex de retenció menor. Aquest compost apareix citat en un article recent sobre el *C. jambhiri* (Babarinde et al., 2020).

### 4.1.3 *Citrus limon* cv. Rugoso

A continuació es mostra el cromatograma obtingut per al *C. limon* (L.) Burm. f. cv. Rugoso, on apareixen marcats els components identificats ordenats segons del seu respectiu temps de retenció.

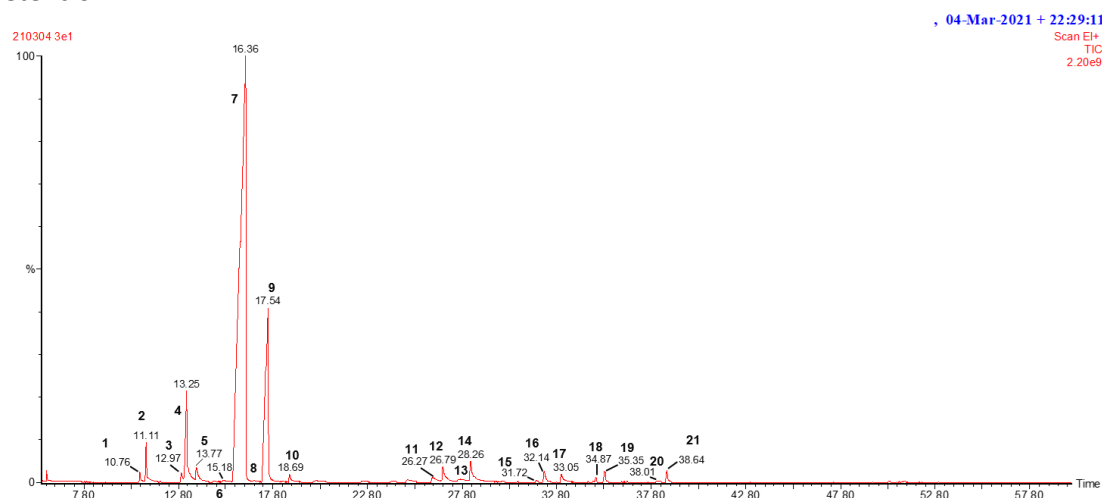


Figura 24. GC/MS cromatograma complet corresponent al *C. limon* amb la identificació dels components majoritaris. Components majoritaris [ $> 0,1\%$  de l'àrea del pics en el TIC -Total ion chromatogram].

(1)  $\alpha$ -thujè [1,02%], (2)  $\alpha$ -pinè [4,13%], (3) sabinè [0,93%], (4)  $\beta$ -pinè [9,81%], (5) mircè [1,43%], (6)  $\alpha$ -terpinè [0,19%], (7) limonè [48,78%], (8) trans- $\beta$ -ocimè [0,11%], (9)  $\gamma$ -terpinè [19,98%], (10) terpinolè [0,88%], (11) nerol [0,50%], (12) neral [1,60%], (13) geraniol [0,28%], (14) geranial [2,34%], (15) acetat de citronelil [0,17%], (16) acetat de neril [1,26%], (17) acetat de geranil [0,91%], (18) trans- $\beta$ -cariofilè [0,53%], (19) bergamotè [1,17%], (20) biciclogermacrè [0,10%], (21)  $\beta$ -bisabolè [1,34%]

L'estimació de les proporcions relatives dels compostos identificats es van realitzar de la mateixa manera que en els apartats anteriors. A continuació es mostra la taula on s'exposen els resultats, referents a la quantitat relativa de cada component, obtinguts per al mètode d'extracció amb solvents i a la hidrodestil·lació.

Taula 9. Composició química de l'oli essencial de *C. limon*. Resultats expressats en el tant per cent respecte a l'àrea total dels pics del cromatograma obtingut mitjançant GC/FID.

Compost	LRI	Mètode d'extracció			
		Extracció amb solvents		Hidrodestil·lació	
		$\bar{X} \pm SE$		$\bar{X} \pm SE$	
$\alpha$ -thujè	928	0,5 $\pm$ 0,01	a	0,5 $\pm$ 0,01	a
$\alpha$ -pinè	936	1,6 $\pm$ 0,03	a	1,5 $\pm$ 0,05	a
sabinè	975	0,8 $\pm$ 0,01	a	0,8 $\pm$ 0,03	a
$\beta$ -pinè	980	5,1 $\pm$ 0,08	a	5,8 $\pm$ 0,3	a
mircè	991	1,5 $\pm$ 0,01	a	1,3 $\pm$ 0,02	b
$\alpha$ -terpinè	1019	0,2 $\pm$ 0,01	a	0,2 $\pm$ 0,01	a
limonè	1032	61,7 $\pm$ 0,7	a	59,5 $\pm$ 1,3	a
trans- $\beta$ -ocimè	1048	0,1 $\pm$ 0,0	a	0,06 $\pm$ 0,01	b
$\gamma$ -terpinè	1060	12,7 $\pm$ 0,2	a	11,7 $\pm$ 0,3	b
terpinolè	1087	0,5 $\pm$ 0,01	a	0,5 $\pm$ 0,01	a
nerol	1226	0,9 $\pm$ 0,06	a	0,6 $\pm$ 0,05	b
neral	1239	1,8 $\pm$ 0,01	a	1,5 $\pm$ 0,3	a
geraniol	1252	1,0 $\pm$ 0,3	a	0,6 $\pm$ 0,05	a
geranial	1268	2,8 $\pm$ 0,04	a	1,9 $\pm$ 0,3	a
acetat de citronelil	1358	0,9 $\pm$ 0,02	a	0,9 $\pm$ 0,07	a
acetat de neril	1378	0,9 $\pm$ 0,01	a	0,8 $\pm$ 0,1	a
trans- $\beta$ -cariofilè	1419	0,3 $\pm$ 0,01	a	0,1 $\pm$ 0,02	b
bergamotè	1433	0,6 $\pm$ 0,04	a	0,2 $\pm$ 0,02	b
biciclogermacrè	1495	0,09 $\pm$ 0,03	a	(tr)	a
$\beta$ -bisabolè	1507	0,9 $\pm$ 0,08	a	0,3 $\pm$ 0,01	b
<b>Hidrocarburs monoterpènics</b>		84,7 $\pm$ 0,9	a	82,0 $\pm$ 0,9	a
<b>Monoterpens oxigenats</b>		8,4 $\pm$ 0,3	a	6,1 $\pm$ 0,9	a
<b>Hidrocarburs sesquiterpènics</b>		1,9 $\pm$ 0,2	a	0,6 $\pm$ 0,05	b
<b>Total</b>		95,0 $\pm$ 0,8		88,7 $\pm$ 0,1	

RI: índex de retenció.  $\bar{X}$ : mitjana de les repeticions. SE: error estàndard. tr: traces. Les lletres (a,b) expressen diferències honestament significatives (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$ . Lletres iguals per al mateix compost (per exemple, a,a) expressen diferències no significatives.

Existeixen diferències significatives en l'àrea dels compostos al mircè, E- $\beta$ -ocimè,  $\gamma$ -terpinè, nerol, trans-cariofilè, biciclogermacrè i  $\beta$ -bisabolè. Els compostos identificats es poden classificar per la seua estructura química en tres grups: hidrocarburs monoterpènics, monoterpens oxigenats i hidrocarburs sesquiterpènics. El grup químic majoritari segueix sent el dels hidrocarburs monoterpènics, seguit dels monoterpens oxigenats i, per últim, els hidrocarburs sesquiterpènics són els compostos minoritaris. Per a totes les gràfiques, als resultats se li ha aplicat la transformació  $Asen\sqrt{x\%/100}$  per tal de garantir l'homogeneïtat de variàncies.

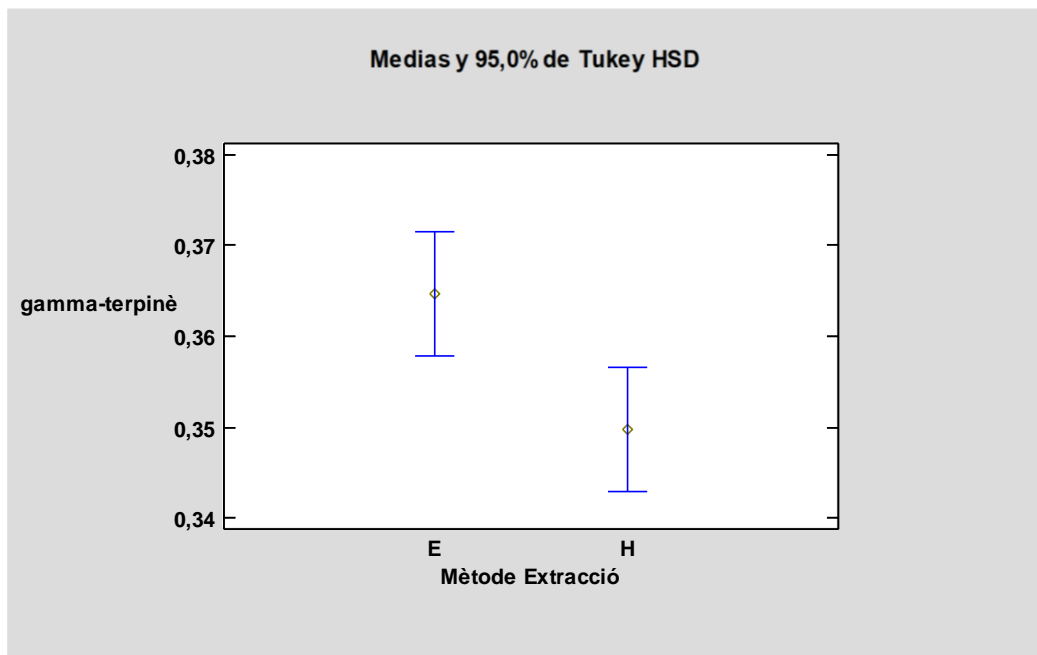


Figura 25. Interval basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost  $\gamma$ -terpinè en oli essencial de *C. limon*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(\text{RAIZ}(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

El  $\gamma$ -terpinè és un dels compostos que presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats. La proporció d'aquest compost és major en les mostres obtingudes mitjançant el mètode d'extracció amb solvents que les obtingudes per hidrodestil·lació.

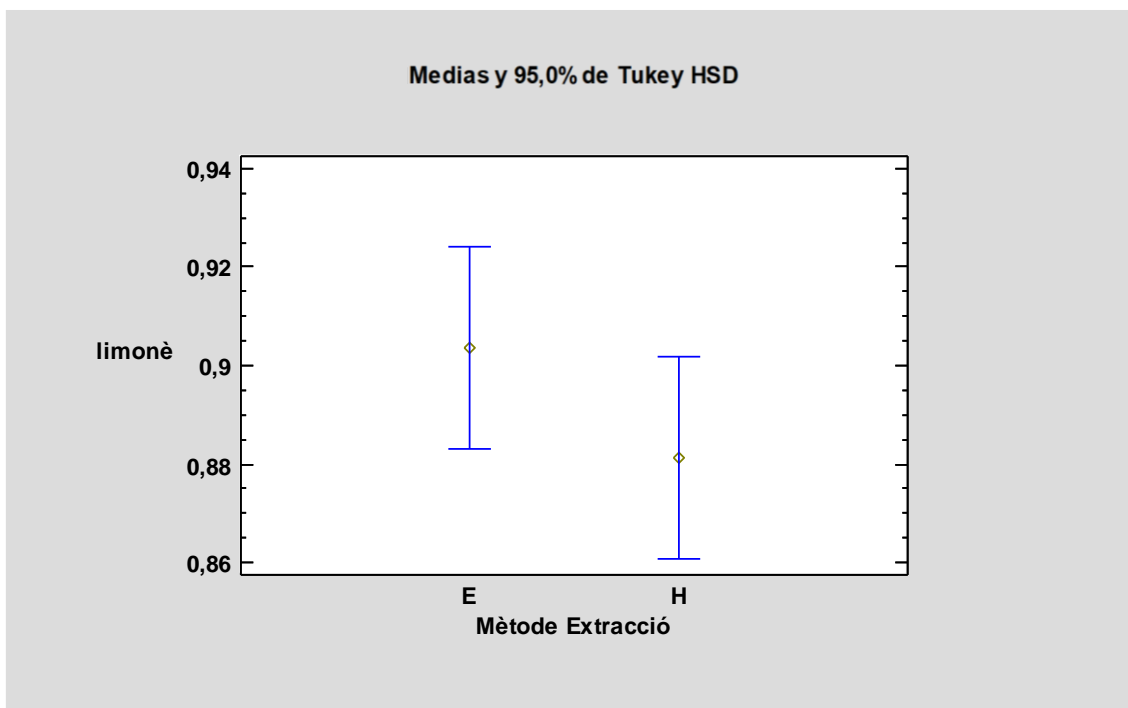


Figura 26. Interval basats en el mètode de diferència honestament significativa (HSD) de Tukey Post-Hoc amb valors de significació  $P \leq 0,05$  per al compost limonè en oli essencial de *C. limon*. E: extracció amb solvents assistida amb ultrasò i centrífuga. H: hidrodestil·lació. Valors transformats segons  $ASEN(RAIZ(x/100))$  dels % de l'àrea per a cada pic.

En les tres espècies estudiades el limonè és un dels compostos que no presenten diferències significatives en la seua proporció segons els dos mètodes d'extracció realitzats.

## 4.2 COMPARACIÓ QUALITATIVA

### 4.2.1 ESPÈCIES

Quant a l'anàlisi qualitatiu, realitzat mitjançant el mètode d'extracció directa, l'oli essencial de les tres espècies de cítrics estudiades presenta diferències en la seua composició.

Es van identificar pràcticament els mateixos hidrocarburs monoterpènics en cadascuna de les tres mostres d'oli essencial obtingudes a partir de les tres espècies estudiades amb excepcions puntuals com l' $\alpha$ -terpinè i el terpinolè, que no es van trobar al *C. jambhiri*, i el *trans*-beta-ocimè, que no estava present al *C. hystrix*.

Pel que fa als monoterpens oxigenats, és el grup químic que presenta més diferències entre les tres espècies estudiades. A l'extracte de *C. jambhiri* no es va trobar cap d'ells. A l'extracte de *C. hystrix* y *C. limon* si es van trobar monoterpens oxigenats, però només l'acetat de citronel·lil i l'acetat de geranil van aparèixer en ambdues mostres.

Es van identificar hidrocarburs sesquiterpènics en les tres mostres d'oli essencial. Van aparèixer dues diferències en aquest punt; el valencè només va estar present en l'extracte de *C. hystrix* i el biciclogermacrè només al de *C. limon*.

Cal destacar dues singularitats importants. En l'extracte d'oli essencial provinent del *C. hystrix* es van detectar dos sesquiterpens oxigenats, anomenats  $\alpha$ -bisabolol i nootkatona, que no van estar presents en cap del altres dos extractes. La nootkatona és un compost molt interessant que es sintetitza a partir de l'oxidació del valencè, el seu precursor. Anterioris estudis mostren la seua presència en l'oli essencial del pomelo (*C. paradisi* Macf.) (Guo et al., 2020). Actualment se li



atribueixen varies activitats fisiològiques tals com activitats antioxidants contra les emissions dels motors dièsel en el pulmó i activitats antifibròtiques contra la necrosis tumoral del fetge induït pel tetraclorur de carboni. A més a més, aquest compost es postula com a candidat per al desenvolupament d'un nou agent terapèutic contra les malalties infeccioses i ha exhibit un efecte inhibitori selectiu contra les bacteries Gram-positives (Yamaguchi, 2019). L'altra singularitat es troba a l'extracte de *C. jambhiri*, en el qual va estar present un membre de la classe dels cromens, el precocé I. Aquest compost no es va trobar en ningun dels altres dos extractes. La presència de precocé I en l'oli essencial de *C. jambhiri* també es pot observar en l'estudi realitzat per (Babarinde et al., 2020).

La comparació entre aquestes tres espècies té un valor relatiu. Aquest fet és degut a que són molt diferents entre elles. Per tant, és d'esperar que els seus olis essencials, com finalment s'ha demostrat, també presenten diferències en la seua composició.

#### 4.2.2 INFLUÈNCIA DELS MÈTODES D'EXTRACCIÓ

Els tres mètodes d'extracció emprats en aquest treball presenten algunes diferències des del punt de vista qualitatiu.

Primerament, caldria suposar que l'extracció directa i l'extracció amb dissolvents són els mètodes més pareguts i més respectuosos amb la composició real de l'oli essencial. Aquesta primera hipòtesi es va confirmar, ja que en les mostres obtingudes mitjançant l'extracció directa i l'extracció amb dissolvents es van identificar més compostos que els obtinguts per hidrodestil·lació. Concretant un poc més, amb el mètode d'extracció directa es van obtenir els extractes on es van identificar més compostos. No obstant, només es va identificar un compost més que en els extractes obtinguts per extracció amb dissolvents. L'acetat de geranil no es va detectar en la mostra d'oli essencial del *C. limon* extreta amb dissolvents però si en l'extreta amb l'agulla per extracció directa. Pel que fa als extractes obtinguts per hidrodestil·lació, compostos com l' $\alpha$ -bisabolol (*C. hystrix*), la nootkatona (*C. hystrix*) i el precocé I (*C. jambhiri*) no es van detectar, així com el  $\beta$ -bisabolè, que no es va detectar en l'extracte hidrodestil·lat del *C. hystrix*. La diferència quant a la composició dels extractes d'oli essencial de *C. hystrix* obtinguts per extracció amb dissolvents i per hidrodestil·lació també es pot observar d'una manera similar a l'estudi realitzat per (Chanthaphon et al., 2008). Aquesta diferència en la composició dels extractes, però dels olis essencials de *C. jambhiri* i *C. limon*, per als dos mètodes d'extracció mencionats anteriorment, també es poden apreciar en els estudis realitzats per (D. Hamdan et al., 2010) y (Golmakani & Moayyedi, 2015), respectivament.

L'extracció directa amb agulla és un mètode que no implica cap interacció ni física ni química amb l'oli essencial. Aquest fet el porta a ser el mètode d'extracció més respectuós amb la composició real de l'oli, i per tant, es pot considerar com un anàlisi qualitatiu de referència.

#### 4.3 COMPARACIÓ QUANTITATIVA

Quant a l'anàlisi quantitatiu, la proporció dels components dels olis essencials de les tres espècies de cítrics estudiades presenten grans variacions. Aquestes variacions en les proporcions són degudes a les diferències existents entre les tres espècies. Les dades quantitatives s'expressen pel mètode de normalització de les àrees dels pics com a percentatges de l'àrea total de cromatograma FID.

Després d'una primera apreciació dels resultats es pot observar com la composició global dels olis essencials de la corfa de *C. hystrix* és significativament similar a la obtinguda per (Sato et al.,

1990), on es va extraure mitjançant destil·lació per vapor. De la mateixa manera, les composicions globals dels olis essencials del *C. jambhiri* y *C. limon* concorden amb les obtingudes per (Lota et al., 2002) y (Ferhat et al., 2007) respectivament. En ambdós estudis els olis van ser obtinguts per hidrodestil·lació.

Els extractes d'oli essencial que es van sotmetre a l'anàlisi quantitatiu van ser els obtinguts mitjançant l'extracció amb dissolvents i la hidrodestil·lació. Els dos mètodes d'extracció no mostren diferències entre les proporcions dels monoterpens i dels sesquiterpens per al *C. jambhiri* i *C. limon*. La proporció dels monoterpens oxigenats en el *C. limon* tampoc sembla variar segons el mètode emprat.

Les diferències des del punt de vista quantitatiu es troben en el *C. hystrix*. En els extractes hidrodestil·lats del *C. hystrix* la proporció de monoterpens es molt major a la dels extractes obtinguts amb dissolvents. La proporció dels sesquiterpens també presenta una moderada variació segons el mètode utilitzat. Una altra gran diferència entre els dos mètodes d'extracció ve donada pels sesquiterpens oxigenats. A l'extracte obtingut amb dissolvents aquests representen un 11,2% mentre que en l'extracte hidrodestil·lat no hi ha presència d'aquests compostos.

Les diferències entre les proporcions dels compostos de l'oli essencial del *C. hystrix* segons el mètode d'extracció utilitzat pot ser han tingut relació amb la variació pròpia d'aquesta espècie entre les proporcions dels seus compostos. És a dir, en el cas del *C. jambhiri* i *C. limon* la quantitat d'hidrocarburs monoterpènics, en especial limonè, presents en el seu oli essencial dóna lloc a una gran homogeneïtat en la seua composició. Al *C. hystrix*, les proporcions estan més repartides entre els seus components essencials, aquesta diversificació pot facilitar l'aparició de diferències entre els extractes obtinguts mitjançant diferents mètodes d'extracció, en especial si aquests no interaccionen de la mateixa manera amb els compostos de l'oli.

## 5. CONCLUSIONS

Després de realitzar l'anàlisi dels olis essencials de les tres espècies estudiades mitjançant CG-MS-FID, es van detectar en la composició química dels extractes d'aquestes espècies, obtinguts per extracció directa, un total de 29 compostos diferents. Aquests compostos comprenen hidrocarburs monoterpènics, monoterpens oxigenats, hidrocarburs sesquiterpènics, sesquiterpens oxigenats i alguns alcans de cadena llarga. En els extractes obtinguts mitjançant l'extracció amb dissolvents també es van detectar els mateixos 29 compostos i en els extractes hidrodestil·lats només 25 d'ells.

Una vegada comparades les composicions, segons el mètode d'extracció emprat, es van poder formular les següents afirmacions:

- En el *C. hystrix*, la comparació dels mètodes d'extracció d'olis essencials emprats van mostrar un augment significatiu de monoterpens en els extractes obtinguts per hidrodestil·lació respecte als obtinguts per extracció amb dissolvents. No obstant això, els extractes obtinguts per extracció amb dissolvents mostren una major complexitat amb la presència de sesquiterpens oxigenats i alcans de cadena llarga, on cal destacar la nootkatona (sesquiterpè oxigenat).
- La comparació dels mètodes d'extracció emprats no va mostrar quasi cap diferència en els extractes dels olis essencials del *C. jambhiri* y *C. limon*. Aquest fet es deu

probablement a la seua abundància en hidrocarburs monoterpènics, especialment limonè, els quals monopolitzen la composició essencial d'ambdues espècies.

- L'extracció directa i l'extracció amb dissolvents van resultar ser els mètodes d'extracció més respectuosos amb la composició real de l'oli essencial.
- Com a conclusió general, cal destacar la influència del mètode d'extracció de l'oli essencial en el seu perfil i, com a conseqüència, en la presència de més o menys proporció d'aquells compostos que determinen la seva aplicació. Esta influència és més rellevant en espècies com ara el *C. hystrix* amb un perfil més complex, amb un major nivell de compostos oxigenats.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2014). Measurement of functional properties and health promoting aspects-glucose retardation index of peel, pulp and peel fiber from *Citrus hystrix* and *Citrus maxima*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 4(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.06.001>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Alzamora, L., Morales, L., & Fernández, G. (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de La Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 62, 156–161. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37962208>
- Babarinde, S. A., Kemabonta, K. A., Olatunde, O. Z., Ojutiku, E. O., & Adeniyi, A. K. (2020). Composition and toxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) rind essential oil against red flour beetle. *Acta Ecologica Sinica*. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.07.001>
- 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(April), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.04.003>
- Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Changes of peel essential oil composition of four tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/528593>
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.034>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica, Plantas Medicinales* (2ª). Acribia S.A.
- Budiarto, R., Poerwanto, R., Santosa, E., Efendi, D., & Agusta, A. (2019). Agronomical and physiological characters of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) seedling under artificial shading and pruning. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(3). <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i3.1920>
- 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), 2387–2394. <https://doi.org/10.1021/jf001363l>
- Carranza, J., Vicuña, E., Romero, P., Condorhuam, C., & Hilario, B. (2012). Modelamiento Y Simulación Del Proceso De Extracción De Aceites Esenciales Mediante La Destilación Por

- Arrastre Con Vapor. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 15(2), 19–27.
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceites esenciales del limón. *Invenio*, 7(12), 149–155. <http://www.redalyc.org/html/877/87701214/>
- Chanthaphon, S., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. Against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(SUPPL. 1), 125–131.
- Chaturvedi, D., & Shrivastava Suhane, R. R. N. (2016). Basketful Benefit of Citrus Limón. *International Research Journal of Pharmacy*, 7(6), 1–4. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.07653>
- Chávez Chávez, H. de la C., Coronado Velasquez, A. F., & Espinoza Sauzo, L. R. (2014). *Determinación y comparación de propiedades físico-químicas de dos aceites de pino (Pinus oocarpa schiede) extraídos mediante la técnica de soxhlet y clevenger*. [http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/879803/determinacion-y-comparacion-de-propiedades-fisico-quimicas-de-d\\_splKQjL.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/879803/determinacion-y-comparacion-de-propiedades-fisico-quimicas-de-d_splKQjL.pdf)
- Dool, H. Van Den, & Kratz, P. D. (1962). A GENERALIZATION OF THE RETENTION INDEX SYSTEM INCLUDING LINEAR TEMPERATURE PROGRAMMED GAS-LIQUID PARTITION CHROMATOGRAPHY. *CHROMATOGRAPHY*, 266(3), 463–471. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70262-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70262-9_7)
- Efendi, D., Budiarto, R., Poerwanto, R., Santosa, E., & Agusta, A. (2021). Relationship among agroclimatic variables, soil and leaves nutrient status with the yield and main composition of kaffir lime (*Citrus hystrix* dc) leaves essential oil. *Metabolites*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/metabo11050260>
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, and F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and ...*, April. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Cini, M., Croce Della, C. M., & Maserti, B. E. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 27–31. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700427>
- Gabriele, B., Fazio, A., Dugo, P., Costa, R., & Mondello, L. (2009). Essential oil composition of *Citrus medica* L. Cv. diamante (diamante citron) determined after using different extraction methods. *Journal of Separation Science*, 32(1). <https://doi.org/10.1002/jssc.200800404>
- Golmakani, M. T., & Moayyedi, M. (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from Citrus limón (Lisbon variety) peel. *Food Science and Nutrition*, 3(6), 506–518. <https://doi.org/10.1002/fsn3.240>
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Amparo Blázquez, M., & Granell, A. (2019). Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00012>
- Gülay Kirbaşlar, F., Tavman, A., Dülger, B., & Türker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 3207–3212.
- Guo, Y., Hou, E., Ma, N., Liu, Z., Fan, J., & Yang, R. (2020). Discovery, biological evaluation and docking studies of novel N-acyl-2-aminothiazoles fused (+)-nootkatone from Citrus paradisi Macf. as potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 104(100), 104294. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104294>
- Habibullah, & Wilfred, C. D. (2016). Ultrasonic-assisted extraction of essential oil from *Botryophora geniculata* using different extracting solvents. *AIP Conference Proceedings*, 1787. <https://doi.org/10.1063/1.4968083>
- Hamdan, D., El-Readi, M. Z., Nibret, E., Sporer, F., Farrag, N., El-Shazly, A., & Wink, M. (2010).

- Chemical composition of the essential oils of two Citrus species and their biological activities. *Pharmazie*, 65(2), 141–147. <https://doi.org/10.1691/ph.2010.9731>
- Hamdan, Dalia, Ashour, M. L., Mulyaningsih, S., El-Shazly, A., & Wink, M. (2013). Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x limon* L. Burm. f.) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 68 C(7–8), 275–284. <https://doi.org/10.1515/znc-2013-7-804>
- Kasuan, N., Muhammad, Z., Yusoff, Z., Rahiman, M. H. F., Taib, M. N., & Haiyee, Z. A. (2013). Extraction of *Citrus hystrix* D.C. (Kaffir Lime) essential oil using automated steam distillation process: Analysis of volatile compounds. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 17(3), 359–369.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., & Reza Pirmoradei, M. (2005). Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91(4), 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.033>
- Le, X. T., Ha, P. T. H., Phong, H. X., Hien, T. T., & Ngan, T. T. K. (2020). Extraction of Essential oils and volatile compounds of Kaffir lime (*Citrus hystrix* D.C) by hydrodistillation method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012024>
- León, J. (1968). *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales* (IICA (ed.); First).
- Liew, S. N., Utra, U., Alias, A. K., Tan, T. B., Tan, C. P., & Yussof, N. S. (2020). Physical, morphological and antibacterial properties of lime essential oil nanoemulsions prepared via spontaneous emulsification method. *LWT*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109388>
- Llorens-molina, J. A., Castell, V., Vacas, S., & Verdeguer, M. (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), 49–61.
- Lota, M. L., De Rocca Serra, D., Tomi, F., Jacquemond, C., & Casanova, J. (2002). Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 796–805. <https://doi.org/10.1021/jf010924l>
- Mabayo, V. I. F., Aranas, J. R. C., Cagas, V. J. B., Cagas, D. P. A., Ido, A. L., & Arazo, R. O. (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>
- Mancini, E., Camele, I., Elshafie, H. S., De Martino, L., Pellegrino, C., Grulova, D., & De Feo, V. (2014). Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the Southern Apennines (Italy). *Chemistry and Biodiversity*, 11(4), 639–651. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300326>
- Marín Beltrán, M. (2014). *Aplicació de la tècnica d'extracció de Likens-Nickerson (SDE) a productes naturals: poma Fuji i poma Golden*. <http://upcommons.upc.edu/pfc/handle/2099.1/21979>
- Máster, T. F. I. N. D. E. (2021). *Composició de los aceites esenciales de la corteza de diferentes variedades de Citrus medica L. Influencia del grado de maduración*. 2020–2021.
- Mohammed, A. M. A., Ibrahim, A. M., Omran, A. A., Mohamed, M. E., & Elsheikh, S. E. M. (2013). Minerals Content, Essential Oils Composition and Physicochemical Properties of *Citrus jambhiri* Lush. (Rough Lemon) from the Sudan. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 14, 25–30. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilcpa.14.25>
- Moosavy, M. H., Hassanzadeh, P., Mohammadzadeh, E., Mahmoudi, R., Khatibi, S. A., & Mardani, K. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4(2), 42–48.

- Muhammad, N. J. (1999). Volatile aroma compounds in Citrus hystrix oil (Sebatian aroma meruap dalam minyak Citrus hystrix). *Muhammad Nor J. Trop. Agric. and Fd. Sc.*, 27(2), 225–229. [http://ejtafs.mardi.gov.my/jtafs/27-2/Citrus hystrix oil.pdf](http://ejtafs.mardi.gov.my/jtafs/27-2/Citrus%20hystrix%20oil.pdf)
- Mustafa, N. E. M. (2015). Citrus Essential Oils: Current and Prospective Uses in the Food Industry. *Nutrition & Agriculture*, 7, 115–127.
- Ogunjinmi, O. E., Olawore, N. O., & Maharaj, V. J. (2019). Chemical Examination of Essential Oil from Stem, Roots and Fruit Peels of Nigerian Citrus jambhiri. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(6), 1614–1621. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1490208>
- Öntaş, C., Baba, E., Kaplaner, E., Küçükaydin, S., Öztürk, M., & Ercan, M. D. (2016). Antibacterial Activity of Citrus limon Peel Essential Oil and Argania spinosa Oil Against Fish Pathogenic Bacteria. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(5), 741–749. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2016.15311>
- Paw, M., Begum, T., Gogoi, R., Pandey, S. K., & Lal, M. (2020). Chemical Composition of Citrus limon L. Burmf Peel Essential Oil from North East India. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 23(2), 337–344. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1757514>
- 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), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.044>
- Polit, U., & Val, C. D. E. (2020). *Influencia del método de secado en la composición y rendimiento del aceite esencial de la corteza de citrus máxima*. 2019–2020.
- Rohini, M. R., Sankaran, M., Rajkumar, S., Prakash, K., Gaikwad, A., Chaudhury, R., & Malik, S. K. (2020). Morphological characterization and analysis of genetic diversity and population structure in Citrus × jambhiri Lush. using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(5), 1259–1275. <https://doi.org/10.1007/s10722-020-00909-4>
- Sato, A., Asano, K., & Sato, T. (1990). The chemical composition of Citrus Hystrix dc (Swangi). *Journal of Essential Oil Research*, 2(4), 179–183. <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697857>
- Sembiring, H. (2019). Antibacterial Activities of Rough Lemon (Citrus jambhiri Lush) Rind Essential Oil. *Journal of Chemical Natural Resources*, 1(1), 12–18. <https://doi.org/10.32734/jcnar.v1i1.830>
- Shaw, P. E., & Wilson, C. W. (1976). Comparison of Extracted Peel Oil Composition and Juice Flavor for Rough Lemon, Persian Lime, and a Lemon-Lime Cross. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(3), 664–666. <https://doi.org/10.1021/jf60205a066>
- Sreepian, A., Sreepian, P. M., Chanthong, C., Mingkhwancheep, T., & Prathit, P. (2019). Antibacterial activity of essential oil extracted from citrus hystrix (Kaffir lime) peels: An in vitro study. *Tropical Biomedicine*, 36(2), 531–541.
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., & Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 147–153. <https://doi.org/10.1021/jf001369a>
- Wiert, C. (2006). Medicinal Plants Classified in the Family Polygonaceae. In Taylor & Francis Group (Ed.), *Medicinal Plants of Asia and the Pacific*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420006803.ch9>
- Wongpornchai, S. (2012). Kaffir lime leaf. *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, 2(Dc), 319–328. <https://doi.org/10.1533/9780857095688.319>
- Yamaguchi, T. (2019). Antibacterial properties of nootkatone against Gram-positive bacteria. *Natural Product Communications*, 14(6), 1–5. <https://doi.org/10.1177/1934578X19859999>
- Yu, G. W., Cheng, Q., Nie, J., Wang, X. J., Wang, P., Li, Z. G., & 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(4), 657–667. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3482-8>