



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Composición de aceites esenciales de la corteza y hojas de
diferentes variedades de cítricos del grupo de las Papeda

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

AUTOR/A: Lara Flores, Allison Melissa

Tutor/a: Llorens Molina, Juan Antonio

Cotutor/a externo: OLIVARES FUSTER, OSCAR JESUS

Director/a Experimental: VACAS GONZALEZ, SANDRA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO RURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

*COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE LA CORTEZA Y HOJAS DE
DIFERENTES PAPEDAS Y SUS HÍBRIDOS*

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA:

ALLISON MELISSA LARA FLORES

TUTORES:

Juan A. Llorens-Molina (UPV)

Óscar Olivares-Fuster (Todolí Citrus Fundació)

Curso académico: 2022/2023
CONVOCATORIA SEPTIEMBRE 202

TÍTULO: Composición de los aceites esenciales de corteza y hojas de diferentes Papedas y sus híbridos.

RESUMEN

Los aceites esenciales son extractos concentrados de plantas aromáticas, cítricas o aliáceas que contienen compuestos volátiles y semivolátiles. Estos componentes son los responsables del aroma de las plantas y poseen una gran variedad de propiedades como son las antisépticas, antioxidantes o repelentes. Están contenidos en diversas partes de la planta como las flores, pelos glandulares, como los de las hojas, o en tejidos específicos como en el pericarpio de los frutos de los cítricos.

Es notable el elevado interés práctico que hay en la extracción de compuestos que forman los aceites esenciales, pues son sustancias que pueden ser usadas con diversas finalidades importantes dentro de la industria cosmética, alimentaria o farmacéutica. También resulta cautivadora la idea de descubrir qué pueden ofrecer variedades exóticas que no han sido estudiadas aún en profundidad.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar cualitativa y cuantitativamente la composición química de los aceites esenciales localizados en la corteza y las hojas de diferentes especies e híbridos de Papeda, un grupo de cítricos nativo de Asia tropical, de crecimiento lento que producen frutos generalmente amargos con valor ornamental, culinario o se emplean como portainjertos. Este grupo de cítricos cuenta con especies que junto con el Pummelo o Zamboa (*Citrus máxima* Merr.), el Mandarino (*C. reticulata* Blanco) y el Cidro (*C. medica* L.) son los antepasados de la mayoría de los cítricos actuales. Es por ello que otro propósito interesante es la comparación de papedas con pummelo, pues poseen un origen geográfico común, así como también un carácter morfológico común de hojas con peciolo alado

Se ha decidido caracterizar cualitativa y cuantitativamente estas especies debido a los pocos estudios que existen de ellas, lo que hace necesario conocer cuáles pueden ser las sustancias potencialmente útiles y en qué cantidad se encuentran. El material vegetal usado proviene de la colección de Todolí Citrus Fundació. Las extracciones de los aceites se han realizado por extracción sólido-líquido con diclorometano de las ralladuras del epicarpio y de las hojas trituradas. Las muestras obtenidas han sido analizadas por cromatografía de gases para un análisis cuantitativo con detector por ionización de llama (FID) y para uno cualitativo con detector de espectroscopía de masas (MS).

Una primera aproximación de los resultados alcanzados muestra que a pesar de que existe diferencia en la composición de los aceites esenciales del pericarpio y las hojas y entre las papedas y el pummelo seleccionado, se han obtenido una cantidad considerable de compuestos de potencial interés por sus importantes propiedades biológicas como es la antimicrobiana o propiedades sensoriales.

Palabras clave: Papeda, pummelo, aceites esenciales, compuesto, extracción, cromatografía de gases, espectrometría de masas, detector de ionización de llama.

Autora: Allison Melissa Lara Flores

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

Valencia, septiembre de 2023.

TITLE: Composition of essential oils from the rind and leaves of different Papedas and their hybrids.

ABSTRACT

Essential oils are concentrated extracts from aromatic, citrus, or alliaceous plants that contain volatile and semi-volatile compounds. These components are responsible for the plants' aroma and possess a wide range of properties such as antiseptic, antioxidant, or repellent qualities. They are found in various parts of the plant, such as the flowers, glandular hairs like those on the leaves, or in specific tissues such as the pericarp of citrus fruits.

There is significant practical interest in extracting compounds that make up essential oils, as these substances can be used for various important purposes within the cosmetic, food, or pharmaceutical industries. The idea of discovering what exotic varieties that have not been thoroughly studied yet can offer is also captivating.

Therefore, the objective of this work is to qualitatively and quantitatively characterize the chemical composition of essential oils located in the bark and leaves of different species and hybrids of Papeda, a group of citrus native to tropical Asia. These slow-growing citrus varieties generally produce bitter fruits with ornamental, culinary, or rootstock value. This group of citrus includes species that, along with Pummelo or Zamboa (*Citrus maxima* Merr.), Mandarin (*C. reticulata* Blanco), and Citron (*C. medica* L.), are the ancestors of most current citrus varieties. Thus, another interesting purpose is to compare papedas with pummelo, as they share a common geographical origin as well as a common morphological feature of winged petioles.

The decision to characterize these species qualitatively and quantitatively was made due to the limited studies available on them. It is essential to determine potentially useful substances and their quantities. The plant material used comes from the Todolí Citrus Fundació collection. The essential oils were extracted using solid-liquid extraction with dichloromethane from grated epicarp and crushed leaves. The obtained samples were analyzed by gas chromatography for quantitative analysis with a flame ionization detector (FID) and for qualitative analysis with mass spectrometry (MS).

A preliminary analysis of the results shows that despite differences in the composition of essential oils between the pericarp and leaves and among papedas and the selected pummelo, a considerable number of compounds with potential biological properties such as antimicrobial or sensory qualities has been obtained.

Keywords: Papeda, pummelo, essential oils, compounds, extraction, gas chromatography, mass spectrometry, flame ionization detector.

Author: Allison Melissa Lara Flores

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

Valencia, September 2023.

*A mis tutores Dr. Juan Antonio Llorens-Molina y Dr. Óscar Olivares-Fuster por su incondicional apoyo y dedicación. Ha sido un placer haber tenido la oportunidad de aprender de ellos.
Gracias por estar a todas horas.*

Al IAM por brindarme las instalaciones, equipamiento y lugar para desarrollar el trabajo.

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

A la Fundación Todolí Citrus por su colaboración.

A mis padres, por absolutamente todo. Esto es por y para ellos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Los cítricos. | 1 |
| 1.1.1. Origen y su historia..... | 2 |
| 1.1.2. Taxonomía de los cítricos. Especies ancestrales. | 2 |
| 1.2. Las Papedas..... | 4 |
| 1.2.1. Material vegetal estudiado..... | 4 |
| 1.3. Los aceites esenciales..... | 8 |
| 1.3.1. Definición..... | 8 |
| 1.3.2. Composición química..... | 8 |
| 1.3.2.1. Terpenos..... | 9 |
| 1.3.2.1.1. Monoterpenos..... | 9 |
| 1.3.2.1.2. Sesquiterpenos. | 10 |
| 1.3.2.1.3. Diterpenos. | 10 |
| 1.3.2.1.4. Otros. | 10 |
| 1.3.3. Propiedades físicas | 10 |
| 1.3.4. Funciones. Actividad biológica. | 11 |
| 1.3.5. Utilidades en la industria agroalimentaria | 11 |
| 1.3.6. Análisis de los aceites esenciales..... | 12 |
| 1.3.6.1. Cromatografía de gases (GC) | 12 |
| 1.3.6.2. Detector por espectroscopía de masas (MS) | 13 |
| 1.3.6.3. Detector de ionización de llama (FID) | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 2.1. Variedades para estudio en pericarpio. | 15 |
| 2.2. Variedades para estudio en hojas. | 15 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 3.1. Materiales..... | 16 |
| 3.1.1. Material para análisis en pericarpio | 16 |
| 3.1.2. Material para análisis en hojas..... | 16 |
| 3.2. Métodos..... | 16 |
| 3.2.1. Experimento previo | 16 |
| 3.2.2. Extracción de aceites esenciales en pericarpio | 18 |
| 3.2.3. Extracción de aceites esenciales en hojas..... | 19 |
| 3.2.4. Análisis de los compuestos obtenidos..... | 20 |
| 3.2.4.1. Análisis GC/MS..... | 20 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3.2.4.2. Análisis GC/FID..... | 21 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 21 |
| 4.1. RESULTADOS..... | 21 |
| 4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 31 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 35 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 36 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los cítricos.

Las especies vegetales que forman el grupo de los cítricos reciben esta denominación por pertenecer mayoritariamente al género *Citrus*, a pesar de que algunas especies del género *Fortunella* o *Poncirus*, así como muchísimos híbridos, se incluyen también bajo esta denominación.

Citrus es un género de árboles y arbustos de flor perteneciente a la familia de las *Rutáceas*, cuyos frutos tipo hesperidio poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, lo cual concede el gusto ácido tan característico. En botánica, un hesperidio es un tipo de baya modificada; un fruto carnoso con una cubierta más o menos endurecida, constituida por un epicarpio delgado y rico en esencias, un mesocarpio esponjoso y un endocarpio membranoso, tabicado y tapizado de células alargadas repletas de jugo entre las cuales se localizan las semillas. (Figura 1).

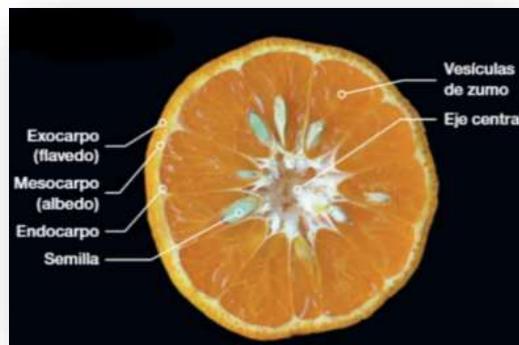


Figura 1: Sección transversal de un cítrico. Fuente: Monografías botánicas. Jardín Botánico de la Universitat de València.

Los cítricos son cultivos que en la actualidad se extienden por las regiones tropicales y subtropicales entre los paralelos 44°N y 41°S. Originalmente, son cultivos subtropicales, y pueden darse en zonas de clima termomediterráneo que se caracterizan por su altitud por debajo de los 700 metros, donde los veranos son cálidos y las heladas casi inexistentes en invierno. (Figura 2). Tienen una gran capacidad de adaptación al medio y por ello se acomodan bastante bien a climas tropicales, pero presentan un color de la corteza y calidades internas del fruto diferentes.



Figura 2: Zonas subtropicales del mundo. Fuente: MeteoBlue.

En la actualidad, los cítricos forman el grupo frutal de mayor producción en el mundo, localizándose la mayor parte de las grandes plantaciones comerciales casi exclusivamente en

las regiones subtropicales donde la temperatura es modulada por acción de los vientos marinos. (Agustí et al., 2020).

1.1.1. Origen y su historia.

Muchos estudios muestran que los cítricos que se conocen en la actualidad son el resultado de miles de años de evolución y de la hibridación entre cuatro especies ancestrales: una Papeda (*Citrus micrantha* Wester), el Pummelo o Zamboero (*C. máxima* Merr.), Mandarino ancestral (*C. reticulata* Blanco) y Cidro (*C. medica* L.), además de la acción humana. Estos estudios también apuntan que existe una gran complejidad para concretar el origen y la expansión de los cítricos en el mundo, puesto que dicha expansión está ligada a acontecimientos históricos que generaron inexactitudes y falseamiento de datos.

Hoy día, gracias a exhaustivas investigaciones genéticas como la publicada en el año 2018 (Gu et al., 2018) y llevada a cabo por el Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), el US Department of Energy Joint Genome Institute, junto a otros colaboradores de España y Francia, se sabe que los cítricos se originaron hace unos 8 millones de años en el piedemonte sureste del Himalaya, un área limitada por el este de la India, el norte de Myanmar y el oeste de Yunnan. (Figura 3).

Como se ha mencionado anteriormente, todos los estudios coinciden en que después de las primeras irradiaciones naturales, la expansión de los cítricos se debe también a razones históricas como son los conflictos bélicos, y políticas, así como a las exploraciones de nuevas tierras y rutas comerciales en las que acompañaron a los viajeros, como lo fue la Ruta de la Seda, emigrando con ella los cítricos a Medio Oriente y, eventualmente, a Europa.



Figura 3: Origen de los cítricos y antiguas posibles rutas de dispersión. Fuente: *The Genus Citrus*. (Talón et al., 2020)

1.1.2. Taxonomía de los cítricos. Especies ancestrales.

Los cítricos han sido clasificados taxonómicamente de diversas maneras a lo largo de la historia. Las razones que generan la falta de consenso son la facilidad de cruzamiento que hay entre los miembros del género *Citrus* que han producido descendencia fértil y además el hecho de que es frecuente la apomixis (híbridos propagados clonalmente a través de semillas). A todo esto, se le suma la alta tasa de mutaciones que se dan y la historia del cultivo, que han complicado el establecimiento de las relaciones taxonómicas.

Lo que siempre se ha tenido claro, y en lo que han coincidido todos los autores de las muchas clasificaciones taxonómicas que se han ido formando en el tiempo, es que los cítricos

pertenecen al orden *Geraniales*, suborden *Geraminae*, familia *Rutaceae* y subfamilia *Aurantioideae*.

Para la clasificación del género en la actualidad se aceptan las clasificaciones de Swingle (1946) y Takana (1977), así como la más reciente de Mabberley (2004, 2022). Las dos primeras incluyen dos tribus, *Citrae* y *Claustenae*. Dentro de la tribu *Citrae* se dividen tres subtribus *Triphasinae*, *Balsamocitrinae* y *Citrinae*. Los cítricos se encuentran dentro de la subtribu *Citrinae* y está compuesta por seis géneros *Clymenia*, *Citrus*, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* y *Microcitrus*.

Swingle dividió el género *Citrus* según la comestibilidad de los frutos en dos subgéneros *Papeda* y *Eucitrus*, los "cítricos verdaderos". Esta distinción de las especies del grupo de las Papedas como un subgénero no se mantiene en la actualidad, pero sin duda se trata de un grupo con caracteres morfológicos distintivos. Las Papedas dan frutos que contienen aceites esenciales que aportan un sabor acre y amargo, lo cual los hace prácticamente incomedibles. En cambio, las especies que Swingle incluyó como *Eucitrus* se caracterizan por producir frutos de jugo agradable, normalmente exento de aceites esenciales y de sabor amargo, dulce o ácido. Dentro del grupo de las Papedas se encuentran seis especies, *Citrus ichangensis* Swing. (papeda de Ichang), *C. latipes* (Swing.) Tan. (papeda de Kashi), *C. hystrix* D.C. (papeda de Mauricio), *C. micrantha* Wester (papeda de flor pequeña), *C. celebica* Koord. (papeda Célebes) y *C. macroptera* Montr. (papeda de Melanesia). Según la clasificación de Swingle, el resto de los cítricos se englobarían en un total de diez especies, entre las cuales se encuentran las de mayor valor comercial y son *Citrus medica* L. (cidros), *C. limon* (L.) Burn. F. (limoneros), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (limeros), *C. sinensis* (L.) Osb. (naranjos dulces), *C. reticulata* Blanco (mandarinos), *C. grandis* (L.) Osb. (pummelos o zamboas), *C. paradisi* Macf. (pomelos), *C. indica* Tan. y *C. tachibana* (Mak.) Tan., siendo éstas dos últimas especies silvestres de la India y Japón respectivamente (Federici et al. 1998) con poco interés comercial fuera de sus zonas de origen (Montalt, 2009).

Tanaka por otro lado reivindicó que los cítricos necesitaban una clasificación más amplia por lo que dividió el género *Citrus* en dos subgéneros *Archicitrus* y *Metacitrus*, ocho secciones, 15 subsecciones, 8 grupos, 2 subgrupos y 2 microgrupos, identificando un total de ciento cuarenta y cinco especies (Calabrese, 2009). Las críticas a esta clasificación se deben a que se considera algunos híbridos y mutaciones como especies.

Actualmente el criterio más generalizado es el de Swingle y el de Tanaka se acepta plenamente para algunas especies en concreto. Pero los estudios más recientes basados en la secuenciación de genomas completos proponen una reformulación del género *Citrus*, basada en la divergencia genética interespecífica resultante de la comparación entre genotipos diploides; esto permite analizar la composición de las especies y, en base a criterios objetivos, validar los sistemas taxonómicos existentes y enumerar las especies progenitoras (Agustí et al. 2020).

Cabe destacar la clasificación según el reconocido botánico y autor David J. Mabberley, para quien los cítricos se dividen en tres grupos principales basados en sus características botánicas y parentesco evolutivo, siendo el resto de especies híbridos de estas tres. El primer grupo es *Citrus medica* característicos por ser de forma ovalada o cónica con una corteza gruesa y rugosa, incluye a los cidros o a cítricos más comerciales como los limones. El segundo grupo es *Citrus reticulata* donde los frutos son de tamaño pequeño a mediano generalmente de forma redondeada con una cáscara delgada y fácil de pelar, aquí se encuentran los mandarinos y sus híbridos. El último grupo es *Citrus sinensis* que se distinguen de los otros dos por tener frutos de tamaño mediano a grande, de forma redondeada a ovalada, con cáscara gruesa y pulpa

jugosa y dulce, el grupo de las naranjas. Es importante tener en cuenta que esta clasificación es una simplificación que sirve para aclarar el género, por lo que es ampliamente aceptada y usada en botánica y horticultura.

Respecto a las especies ancestrales de las plantas del género *Citrus*, se acepta la hipótesis propuesta por Scora (1975) y Barret y Rhodes (1976) que se propuso en función de criterios bioquímicos y morfológicos, y fue corroborada más tarde mediante técnicas de biología molecular. Dicha hipótesis afirma que las especies originales de todos los cítricos que se conocen en la actualidad son la papeda micrantha (*Citrus micrantha*) el pummelo (*Citrus maxima*), el mandarino (*Citrus reticulata*) y el cidro (*Citrus medica*), y que el resto de especies son híbridos surgidos de los cruces de estas especies ancestrales.

1.2. Las Papedas.

Este trabajo se centra en el estudio de las Papedas. Como se ha expuesto en los anteriores apartados, estos cítricos son originarios de Asia tropical, desarrollándose de forma natural en la región del Monzón y partes de Japón y China.

Son plantas de crecimiento lento que producen unos frutos normalmente incomedibles por su pulpa poco jugosa y su sabor amargo y desagradable, de piel gruesa y espinosos. Suelen ser especies muy aromáticas, tanto en sus frutos como en sus hojas. Tienen poco valor comercial en Europa. Algunas de las especies del grupo de Papedas son usadas como aromatizantes o condimentos en la cocina asiática por sus propiedades culinarias, otras tienen valor ornamental e incluso algunas se usan como portainjerto o para la obtención de otras especies como la Lima Key, que es un cruce entre *Citrus micrantha* y el cidro.

Las partes más interesantes, desde el punto de vista de este trabajo, de estos cítricos son el epicarpio de sus frutos y las hojas, pues es donde se concentran casi la totalidad de los aceites esenciales.

1.2.1. Material vegetal estudiado.

Para este estudio investigación se han recogido muestras de diferentes especies y variedades de Papedas y una de pummelo o zamboa, las cuales provienen de la colección de Todolí Citrus Fundació, situada en Palmera, municipio de la Comunidad Valenciana, perteneciente a la provincia de Valencia, en la comarca de la Safor (X: 3894436, Y: -0,15387). Esta fundación tiene como objetivos fundamentales el estudio y divulgación de los cítricos y la citricultura. De esta misma fundación se ha extraído toda la información sobre el material usado.

***Citrus macroptera* Montr.**

Papeda de Melanesia o Satkara



Figura 4: Papeda de Melanesia. Fuente: Todolí Citrus Fundació.

Su nombre científico hace referencia a la morfología de sus **peciolos** cuya forma es parecida a unas grandes (*macro*) alas (*pteros*). Comúnmente es conocida como Satkara y su origen es el sudeste asiático. Se trata de una de las papedas que más se distribuyen de forma natural en Asia.

En esta planta se forman unas hojas grandes, anchas y lanceoladas con gran peciolo alado y emanan un distintivo aroma. El fruto es de tamaño mediano con un pequeño mamelón apical que casi no se distingue. La corteza es muy aromática, lisa, que pasa del verde brillante al amarillo en madurez y además está adherida a la pulpa. La pulpa es poco jugosa y muy aromática con un sabor muy amargo debido a la presencia de aceite acre.

El fruto está disponible de septiembre a febrero. Se consume verde en los meses de septiembre a noviembre. En algunas partes de Asia la corteza se consume fresca como cualquier vegetal, mientras que en Bangladesh se usa tanto el zumo del fruto para condimentación de platos como la corteza para la preparación de curry. También se usa en la producción de jabones.

***Citrus micrantha* Wester. var. microcarpa**

Papeda de flor pequeña o Samuyao



Figura 5: Papeda de flor pequeña. Fuente: Todolí Citrus Fundació

Es conocida como la Papeda de flor pequeña o Samuyao. Esta variedad fue descubierta para Occidente en el año 1915 por Peter J. Wester en las islas Filipinas Cebú y Bohol.

Se caracteriza por poseer flores y frutos muy pequeños de morfología esférica, corteza rugosa, muy aromática, de color amarillo en la madurez y una pulpa verdosa, jugosa y de sabor acre, muy ácido y amargo. Sus hojas tienen la forma típica de las hojas de Papeda, peciolo grande y alado. Los aceites esenciales contenidos en esta planta se caracterizan por poseer abundante cantidad de bergapteno, una furanocumarina que provoca fototoxicidad.

En este árbol el fruto está disponible durante todo el año. En cocina filipina se usa el zumo de este cítrico como condimento en diferentes *sawsawan* (salsas).

***Citrus hystrix* DC.**

Papeda de Mauricio o Combaya



Figura 6: Combaya. Fuente: Todolí Citrus Fundació.

Tradicionalmente se le ha llamado Lima Kaffir a pesar de no ser una lima. En la actualidad el nombre tradicional está en desuso por las connotaciones sociales groseras y despectivas del término *kaffir*. Esta variedad proviene del sudeste asiático, concretamente en la región Indo – Malaya, que va desde la India hasta el Sudoeste de China. La presencia de espinas en la planta

es la característica por la que se le otorgó su nombre científico, pues en griego *hystrix* significa erizo.

Las hojas son muy aromáticas, con un peciolo grande y alado característico de las papedas y de tamaño igual al del limbo lo cual da la impresión de poseer hojas dobles en forma de reloj de arena. El fruto es pequeño y posee una corteza muy rugosa y característica que va del verde oscuro al verde amarillento. La pulpa es ácida, amarga y poco jugosa.

El fruto está disponible en el árbol de septiembre a febrero. Es una planta muy aromática de la que se aprovecha la corteza del fruto que rallada se usa como condimentos en platos y bebidas alcohólicas y también para elaborar curry. Las hojas también se usan como aromatizantes o especia cítrica.

***Citrus sudachi* hort. ex Tan.**

Papeda sudachi



Figura 7: Sudachi. Fuente: © Jorma Koskinen
<http://citruspages.free.fr/papedas.php>

Es un híbrido natural de Yuzu con otro cítrico que probablemente esté relacionado con el mandarino Tachibana. El lugar de origen fue la isla de Shikoku en Japón y se sabe de su existencia desde principios del siglo XVIII.

Las hojas de esta planta tienen una morfología elíptica y un peciolo levemente alado. Los frutos son pequeños, con corteza que varía según la madurez del fruto y va desde granulada en las primeras fases hasta más abultada en las últimas, es aromática y contiene una proporción importante de aceites esenciales. La pulpa es jugosa y ácida pero suave y aromática, por lo que su zumo se consume más que su corteza.

La disponibilidad del fruto es de septiembre a febrero. Se emplea en la cocina asiática para dar sabor tanto a comidas como a bebidas pues su zumo posee un aroma picante y ácido.

***Citrus sphaerocarpa* hort. ex Tan.**

Kabosu.



Figura 8: Kabosu. Fuente: Todolí Citrus
Fundació

Se trata de un híbrido que posiblemente provenga de un cruce entre una Papeda y un Naranja Amargo. Su país de origen es China, pero está muy extendido en Japón. Árbol muy característico por su gran contenido en aceites esenciales en la corteza de sus frutos y por la fragancia ácida del jugo.

Sus hojas forman un peciolo alado en forma de corazón. El tamaño del fruto es mediano y suele presentar un pequeño mamelón apical, su corteza es muy aromática y algo granulada la cual en estado de maduración es amarilla. La pulpa del fruto contiene un jugo que es ácido, amargo y con una fragancia característica.

El fruto está disponible de agosto a enero y se puede consumir en verde de agosto a octubre, y después maduro. Se usa en la cocina japonesa la corteza como condimento y el zumo como sustitutivo del vinagre.

***Citrus macrophylla* Wester**

Alemow



Figura 9: Alemow. Fuente: © Gene Lester.
<http://citruspages.free.fr/papedas.php>

También conocida como Alemow, es originaria de la isla filipina de Cebú. Se solía pensar que es un híbrido entre el cidro (*Citrus medica*) y el pummelo (*Citrus maxima*), pero recientemente gracias a un estudio se ha descubierto que en realidad *Citrus macrophylla* es el resultado de una hibridación entre *Citrus micrantha* (o una especie cercana a la Papeda) y el cidro (Curk et al., 2016).

Esta planta ha sido muy usada como portainjertos para el cultivo de limón en zonas como California y desde hace pocos años en España y Marruecos, lugares donde el agua de riego contiene altos niveles de salinidad a los cuales son sensibles los limoneros (Lee et al., 2009).

Tiene hojas de tamaño grande con peciolo pequeños subtriangulares. El tamaño del fruto es bastante grande y varía entre los 8,5 cm hasta los 10 cm de diámetro, con una base más o menos estrechada y con una piel rugosa, corrugada transversalmente y delgada. La pulpa es agria y muy seca por lo que se considera no comestible incluso por los nativos.

El fruto está disponible entre finales de otoño y principios de invierno.

***Citrus maxima* (Burm.) Merr.**

Pummelo Chandler o Zamboa



Figura 10: Chandler. Fuente: Todolí Citrus Fundació.

El cultivar Chandler es el resultado de un programa de mejora llevado a cabo en California (EE.UU.), consistente en la hibridación controlada de dos pummelos tailandeses, el *Siamese* (pummelo sin ácido) y el *Siamese Pink* (pummelo pigmentado con ácido). Su comercialización comenzó en 1961.

El origen de *C. maxima* se sitúa en Indonesia y Malasia, donde se puede encontrar en estado salvaje. Es un fruto muy estimado en países del sudeste asiático. El nombre común de esta especie en inglés es pomelo o pummelo, lo cual puede llegar a confundir. Desde la tradición árabe, a nosotros nos ha llegado la denominación zamboa o zimboa.

Las ramas de esta variedad presentan espinas. Sus hojas son muy grandes, elípticas, de color verde oscuro y con el margen ligeramente dentado o entero. Las hojas presentan peciolo alado. Las flores nacen en racimos terminales y son las más grandes del género. (Ancillo & Medina, 2015). El fruto tiene forma redondeada y un tamaño que se considera medio entre los pummelos, con un peso medio en torno a 1 Kg. La corteza del fruto es lisa, fina, de color amarillo en la madurez y contiene un albedo grueso y rosado. La pulpa, de textura firme, es entre rosa y roja, dependiendo de las condiciones de cultivo; no es muy jugosa, pero es más dulce que otros pummelos, más ácida y menos amarga.

Este fruto está disponible de noviembre a abril.

1.3. Los aceites esenciales

1.3.1. Definición.

Según la definición de las normas sobre materias primas aromáticas de la Organización Internacional de Normalización, un aceite esencial es un “Producto obtenido a partir de una materia prima natural de origen vegetal, por destilación al vapor, por procesos mecánicos a partir del epicarpio de los cítricos, o por destilación en seco, después de la separación de la fase acuosa, en su caso, por procesos físicos” [ISO 9235:2013(en), término 2.11].

En cuanto a su composición, los aceites esenciales son mezclas complejas formadas por hasta cientos de componentes de diferente naturaleza química (Cerutti y Neumayer, 2004) y que son más o menos volátiles.

En la naturaleza se pueden encontrar en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, etc. Se localizan en cualquier órgano vegetativo de la planta como en flores (lavanda, rosa, clavo de olor, azahar, etc.), en hojas (hierbabuena, romero, albahaca, menta, cítricos, etc.), en raíces (azafrán, cúrcuma, jengibre, valeriana, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, papedas, etc.), en las semillas (anís, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), y en los frutos (nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (Martínez, 2003).

1.3.2. Composición química

Dentro de la propia categoría taxonómica de una planta puede existir gran variabilidad en la composición química de sus aceites esenciales. Esta variabilidad está condicionada por factores genéticos, ecológicos, la parte de la planta de la cual se extraen los compuestos y el método de extracción.

Cuantitativamente hablando, existe mucha variabilidad en el contenido de estos, pues es posible encontrarse con rendimientos del 0,1% (m/m) en hojas de cítricos hasta rendimientos más altos como en el caso de los aceites de semillas de alcaravea (*Carum carvi* L.) de un 6%. (Sedlakova et al., 2003). Se pueden distinguir dos fases diferentes en la composición de los aceites esenciales, una fracción volátil y otra no volátil.

La fracción volátil constituye entre un 85 – 99% del total de los compuestos que constituyen el aceite esencial. Las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles en numerosos tejidos vegetales y mediante distintos procesos metabólicos (Peñuelas 2008). Según su origen metabólico pueden distinguirse cuatro clases principales de compuestos volátiles: terpenos, fenilpropanoides, derivados de ácidos grasos y derivados de aminoácidos. (Negre-Zakharoz et al., 2009).

La fracción no volátil, que es la parte residual, representa entre el 1 y el 15% del total del aceite y la componen hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, cumarinas y flavonoides.

A continuación, se describen con más detenimiento el grupo de los terpenos y otros compuestos como los fenilpropanoides, compuestos alifáticos o cumarinas por ser los más destacables en la composición de los aceites.

1.3.2.1. Terpenos

En los frutos cítricos los terpenos son el grupo químico más abundante. Son una diversa clase de compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que, aunque tienen un origen biosintético común siendo el precursor el isopentenil difosfato, presentan estructuras químicas muy distintas. Estos compuestos estructuralmente derivan de la unión de moléculas de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, el isopropeno, a través de uniones 1,4.

Los terpenos se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, presentes, bien como hidrocarburos, bien como sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos y ésteres, tanto alifáticos como aromáticos.

En los aceites esenciales se encuentran mayoritariamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es muy elevada (monoterpenos y sesquiterpenos) (Bruneton, 2001). También existe una presencia notable de fenilpropanoides, así como diferentes compuestos no terpénicos alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos de cadena larga y sus ésteres, etc.

1.3.2.1.1. Monoterpenos

Son aquellos terpenos cuya estructura molecular puede representarse por la unión de dos moléculas de isopropeno (C₁₀). Se trata de una de las moléculas más abundantes en los aceites esenciales y pueden encontrarse como hidrocarburos o como sus derivados oxigenados (alcoholes, fenoles, aldehídos y cetonas, éteres, ésteres y epóxidos).

Habitualmente se encuentran en forma de monoterpenos regulares y pueden ser acíclicos (cital, mircenos, ocimenos), monocíclicos (D-limoneno, γ -Terpineno, *p*-Cimeno) o bicíclicos (pinenos, sabineno). Constituyen más del 90% de muchos aceites esenciales como es el caso de los obtenidos del exocarpo y las hojas de muchos cítricos (González-Mas et al.,

2019).

Por otro lado, también se pueden encontrar monoterpenos oxigenados que forman parte de los siguientes grupos funcionales como, por ejemplo:

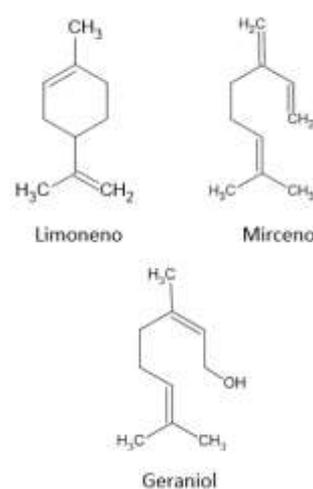


Figura 11: Monoterpenos

- Alcoholes:
 - Acíclicos: Geraniol, Linalol, Citronelol
 - Monocíclicos: α -Terpinelol
 - Bicíclicos: Borneol
- Aldehídos:
 - Alicíclicos: Geranial, Neral, Citronelal
- Cetonas:
 - Acíclicas: Tagetona
 - Monocíclicas: Mentona, Carvona
 - Bicíclicas:
- Ésteres
 - Acíclicos: Acetato de citronelilo
 - Monocíclicos: acetato de α -terpineol
- Fenoles: Timol, Carvacrol.

1.3.2.1.2. Sesquiterpenos.

Se trata de compuestos formados por la unión de tres unidades de isopreno (C₅). Se dividen en:

- Acíclicos (Bisaboleno, Farneseno)
- Monocíclicos (Curcumeno, α -Humuleno)
- Bicíclicos (Guaiazuleno, Valenceno)

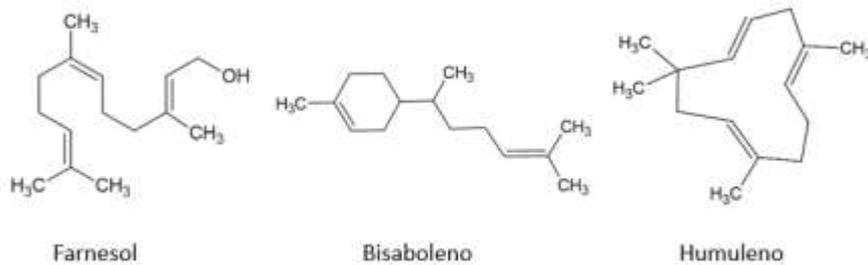


Figura 12: Sesquiterpenos

1.3.2.1.3. Diterpenos.

Estos terpenos están formados por cuatro unidades de isopreno (C₁₀). Un buen ejemplo de este tipo de compuesto puede ser el óxido de manool.

1.3.2.1.4. Otros.

Es destacable la presencia de otro grupo característico, los fenilpropanoides y como ejemplo el aldehído cinámico presente en la canela. Otro grupo importante son los compuestos alifáticos correspondientes a diferentes funciones, como, por ejemplo: los alcoholes de 8 carbonos (octan-3-ol, etc.) y sus ésteres (-ato), así como aldehídos como el hex-2-enal, el octanal y cetonas como la octan-3-ona (-ona).

Por último, cabe destacar también la presencia en algunos cítricos de cumarinas, flavonoides y compuestos de mayor masa molecular como ácidos grasos, hidrocarburos, carotenoides o ceras.

1.3.3. Propiedades físicas

Un aceite esencial se caracteriza por ser un elemento normalmente volátil y líquido a temperatura ambiente, cualidades que lo diferencian de los denominados "aceites fijos".

Pueden ser algo coloreados y generalmente su densidad es menor que la del agua. El índice de refracción de este tipo de sustancia es alto y la mayoría poseen actividad óptica. Son muy poco solubles en agua, pero se disuelven bien en lípidos y disolventes orgánicos y pueden ser destilados por arrastre de vapor de agua. De hecho, es éste su principal método de extracción.

1.3.4. Funciones. Actividad biológica.

Los aceites esenciales cumplen una función semioquímica muy importante en la planta que los posee. Las sustancias que los componen son a menudo parte de la defensa de las plantas frente a depredadores, pues intervienen en la comunicación de señales hormonales que la inician (Peñuelas, 2004). Algunos otros compuestos tienen una función tóxica para la germinación de plantas competidoras, otros actúan como atrayentes de insectos polinizadores o de enemigos naturales de las posibles plagas (Iriti y Faoro, 2009).

En definitiva, los aceites esenciales poseen un amplio espectro de actividades biológicas que están relacionadas principalmente con la medicina y el sector agroalimentario, pero también con el industrial como, por ejemplo, en el empleo de los aceites para la protección frente a la corrosión. (Llorens-Molina, 2021). Todas estas actividades están vinculadas a la presencia de determinadas moléculas, particularmente activas, que son el origen de las propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, insecticidas y repelentes. Además, existen algunos componentes minoritarios que pueden producir efectos sinérgicos con otras moléculas, lo que incrementa, por ejemplo, las propiedades antimicrobianas. (Ruiz, 2019).

1.3.5. Utilidades en la industria agroalimentaria

Desde la antigüedad se han venido usando los aceites esenciales en aplicaciones cosméticas y medicinales. Hoy en día no es difícil encontrarse con estos extractos aromáticos en el sector comercial, así como también con sus componentes químicos por separado, que pueden ser obtenidos del material vegetal o elaborados sintéticamente.

En las últimas décadas, la búsqueda de alternativas naturales a productos de síntesis química se ha incrementado considerablemente. Esta necesidad de cambio ha sido impulsada tanto por la implantación de normativas cada vez más restrictivas por el carácter nocivo o tóxico de muchas sustancias empleadas, como también debido a la creciente aceptación por los consumidores de los productos procedentes de la agricultura y ganadería ecológicas (Llorens-Molina, 2021).

Por todo ello, la Comisión Europea, así como la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense han registrado algunos de los componentes de los aceites esenciales que pueden emplearse como aditivos alimentarios al considerarlos seguros para la salud del consumidor. Dadas sus **propiedades antimicrobianas**, estos compuestos podrían ser también usados como conservantes alternativos a los conservantes químicos sintéticos tradicionales (Ruiz, 2019), entre otras muchas aplicaciones.

Algunas aplicaciones en la industria agroalimentaria que merecen destacarse son el empleo de ciertos aceites esenciales para la preservación y conservación de los alimentos aprovechando su **actividad antioxidante**, como es el caso de los compuestos fenólicos timol o carvacrol que pueden aplicarse como alternativa al butilhidroxianisol (BHA, E-320) y al butilhidroxitolueno (BTH, E-321), pues se consideran aditivos nocivos. En industrias productoras de bebidas azucaradas, salsas y en la industria cárnica se aprovechan los aceites por su **actividad antibacteriana y fungicida**, pues en el caso de las bebidas, salsas, etc. éstos sirven como alternativa a los conservantes químicos como el ácido benzoico (E-210) y el benzoato sódico (E-211); en el caso de la industria cárnica funcionan para sustituir a los nitratos y nitritos de

sodio y potasio (E-249, E-250, E-251, E-252) usados para prevenir el botulismo y estabilizar color, olores y sabores.

En la agricultura se aprovechan también los aceites esenciales y sus componentes, pues se les da uso como plaguicidas alternativos. También se está investigando de forma exitosa el empleo de éstos en el tratamiento de fitotoxicidad selectiva de malas hierbas, pues el carácter alelopático y fitotóxico de determinados aceites influye en la germinación, desarrollo o reproducción de otras plantas y, por tanto, serviría como una buena alternativa a productos con tanto impacto en el medio ambiente como es el glifosato (Mirmostafae et al., 2020).

Lo expuesto anteriormente ha sido avalado por estudios que han examinado las propiedades de diversos aceites esenciales y sus aplicaciones técnicas. En el caso de los aceites esenciales cítricos, entre dichas propiedades destacan las antimicrobianas, antioxidantes, repelentes y aromáticas.

En la industria alimentaria son fundamentales las dos primeras, pues se han estudiado sus beneficios como conservantes naturales o antioxidantes (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2018), también su posible aplicación en envases activos que prolongarían la vida útil de los alimentos y mantendrían su calidad (Tongnuanchan et al., 2012) y para aprovechar sus propiedades aromáticas se pretenden usar como aditivos y potenciadores del sabor (Miner y Buer, 2016). En el caso de aplicaciones agrícolas los componentes de los aceites cítricos son estudiados como sustitutivos de pesticidas químicos debido a su estatus biodegradable y respetuoso con el medio ambiente (Kupaei y Garmakhany, 2014).

1.3.6. Análisis de los aceites esenciales

El análisis de los compuestos de un aceite esencial tiene una cierta complejidad debido a la dificultad de separarlos, identificarlos y cuantificarlos. Entre otros motivos, porque, muchos de ellos poseen estructuras moleculares muy semejantes. En este trabajo se ha utilizado la metodología habitual para el análisis químico de los aceites esenciales, que es la cromatografía de gases (GC) con dos detectores, detector por ionización de llama (GC/FID) y detector de espectroscopía de masas (GC/MS).

1.3.6.1. Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía es un método físico de separación, donde los componentes de una mezcla disueltos en una fase móvil se van desplazando a diferentes velocidades a lo largo de una columna que contiene una fase estacionaria, hasta llegar a un detector. La adecuada elección de las fases y una adecuada programación de la temperatura puede permitir que tales diferencias se traduzcan en una separación efectiva de los compuestos, a la vez que éstos pueden identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance (Sgariglia et al., 2010). Así pues, si las condiciones de la columna y todas las condiciones de funcionamiento son constantes, un compuesto determinado siempre tendrá el mismo tiempo de retención, que es el tiempo que tarda el compuesto en atravesar la columna.

Cuando la fase móvil se encuentra en un estado gaseoso este método se denomina cromatografía de gases. El primer paso del proceso es suministrar uno o varios gases de alta pureza en el cromatógrafo. Uno de los gases llamado gas portador o "carrier" fluye hacia el interior del inyector, pasa por la columna y se introduce en el detector. A continuación, se introduce una muestra en el inyector, la cual se calienta hasta unos 150 - 250 °C, puesto que se requiere volatilizar previamente la muestra de modo que tanto fase móvil (gas portador) como

muestra estén en estado gaseoso (García- Segura et al. 1996). Posteriormente, los compuestos vaporizados pasan a través de la columna con el gas portador, manteniéndose la columna en un horno con control de temperatura. Los compuestos atraviesan la columna a velocidades variables por lo que sus tiempos de retención varían en función de sus presiones de vapor relativas y afinidades por la fase estacionaria utilizada, así como del programa de temperatura aplicado. (Figura 13). Una vez los compuestos ya separados son percibidos por los detectores se genera una señal electrónica cuya intensidad se envía a un sistema de datos (por ejemplo, el software ChemStation de Agilent), generando un cromatograma, un gráfico de señal vs. tiempo que, en un caso ideal, presenta picos con forma de curva de distribución gaussiana (Ettre y Hinshaw, 1993) que no se solapan.

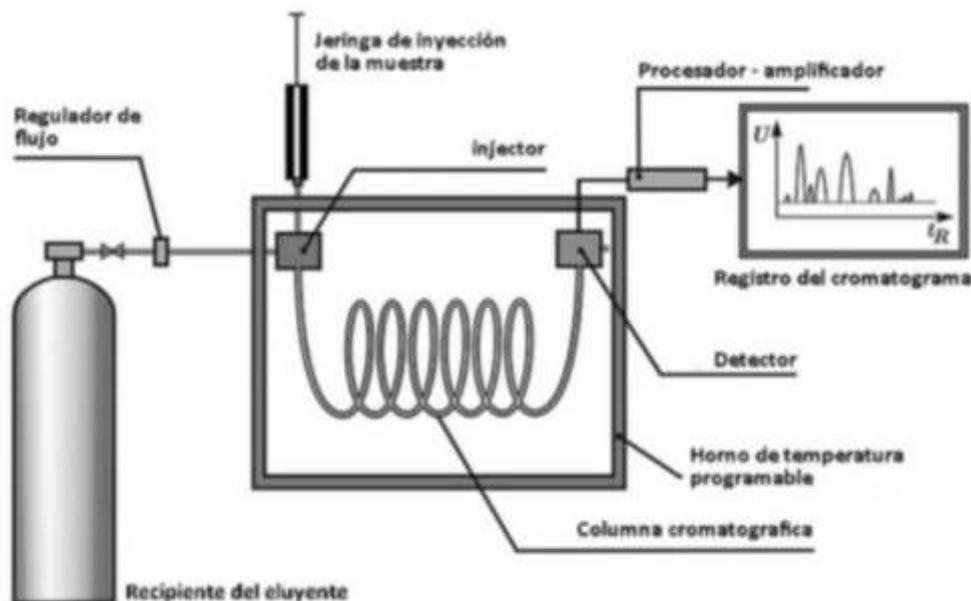


Figura 13: Esquema de un cromatógrafo de gases. Fuente: Aula Virtual UPV.

Existen diversos tipos de detectores, como los detectores másicos (espectrómetro de masas) cuya finalidad es la de reconocer e identificar los diferentes compuestos, o los detectores de ionización de llama, que se hacen cargo de la cuantificación de estos.

1.3.6.2. Detector por espectroscopía de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica basada en la producción de iones al someter a las moléculas de una sustancia, generalmente orgánica, a un impacto electrónico mediante un haz de electrones a 70 eV. Estos iones se separan según su relación masa-carga iónica, lo que resulta en la obtención de un espectro de masas característico de dicha sustancia. El método de identificación más frecuente y simple en este caso consiste en la comparación de los espectros de masas adquiridos con los existentes en una bibliografía de MS de referencia (Vekey, 2001).

La combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas se realiza conectando la salida del cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cuando se analizan estereoisómeros o terpenos que generan espectros de masas muy similares la identificación mediante la comparación automática con los espectros de masas registrados en una librería (figura 14) puede tener poca fiabilidad; es lo que ocurre, por ejemplo, con muchos compuestos sesquiterpénicos ampliamente representados en los aceites esenciales. Para aumentar la

precisión de los resultados y abordar la determinación cualitativa de los compuestos de muestras complejas por GC/MS, los índices de retención constituyen una herramienta efectiva (Zellner et al., 2010). Esta combinación de técnicas está reconocida como uno de los sistemas más eficaces para el estudio de mezclas complejas de productos orgánicos. Los índices de retención representan, en definitiva, un modo de normalizar los datos de los tiempos de retención de modo que, para un mismo tipo de columna, cada compuesto posea un determinado valor de dichos índices, contribuyendo así a su identificación. Cabe citar también el desarrollo más reciente de las denominadas columnas quirales, que permiten la caracterización de los estereoisómeros ópticos.

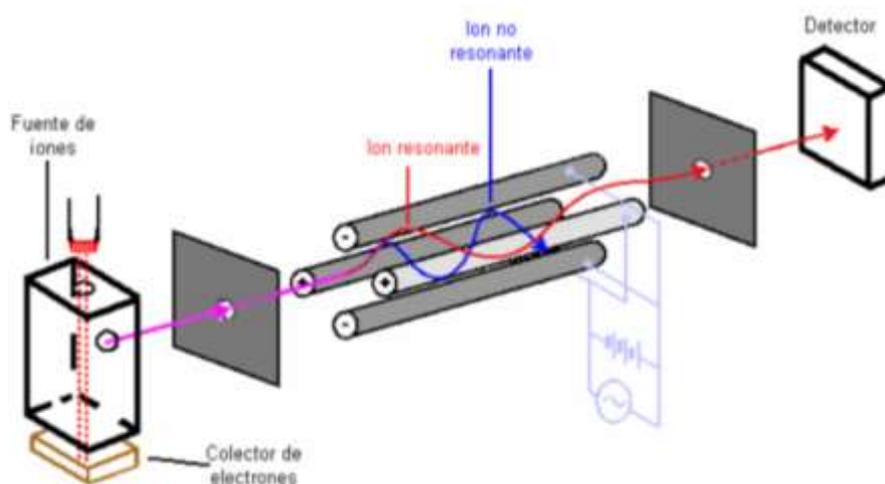


Figura 14: Esquema de un detector por espectroscopía de masas. Fuente: Artículo de investigación "Espectroscopía de masas" del Museo natural de ciencias naturales

1.3.6.3. Detector de ionización de llama (FID)

Se trata de un quemador de hidrógeno/oxígeno, en cuya entrada se mezclan el efluente de la columna cromatográfica (gas portador y analitos) con hidrógeno, se enciende esta mezcla con una chispa eléctrica y se queman los compuestos eluidos con una llama en un entorno rico en oxígeno. Los iones que resultan son detectados por un electrodo colector que se coloca sobre la llama. La magnitud de la corriente generada por estos iones está relacionada con la masa de carbono que alcanza el detector. La recolección de las cargas se logra aplicando cientos de voltios entre la punta del encendedor y el electrodo colector mientras que un amperímetro registra la corriente resultante (figura 15).

Esta sensibilidad a la cantidad de átomos de carbono transportados por unidad de tiempo hace que sea un dispositivo capaz de captar la masa, pero no la concentración. Por lo tanto, este detector tiene una ventaja importante, pues los cambios de velocidad de flujo de la fase móvil no afectan en su respuesta (Marín, 2014).

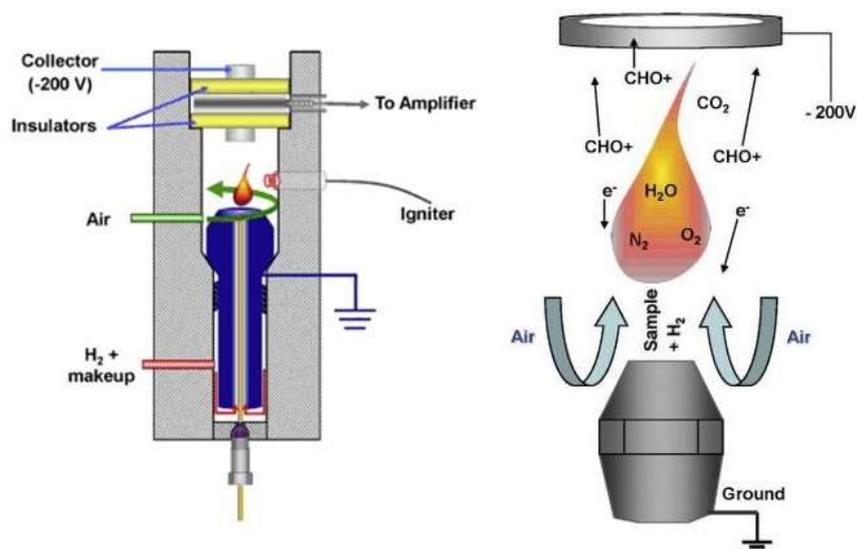


Figura 15: Esquema de un detector de ionización de llama. Fuente: Material docente de Universidad de València.

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivos los siguientes puntos:

1. Como objetivo principal el estudio cuantitativo y cualitativo de la composición de los aceites esenciales de cítricos que pertenecen al grupo Papedas, así como sus híbridos.
2. Otro propósito igual de importante es la aplicación de técnicas analíticas habituales en cualquier laboratorio agroalimentario, las cuales han sido también objeto de estudio en las asignaturas del grado en Ingeniería Agroalimentaria.
3. Puesta a punto de la metodología que mejor se adapte a las condiciones del trabajo, mediante experimentos previos.
4. Comparación de los datos de pericarpio (parte más exterior de la corteza) con los datos de hojas y comparación de los datos de papedas con los datos de pummelo, en el caso de las hojas. Se han estudiado dos órganos diferentes bajo la hipótesis de que las hojas y el pericarpio puedan tener perfiles de aceites esenciales distintos a nivel cualitativo y/o cuantitativo. Y se ha empleado el pummelo para comparar los compuestos con los de las papedas, pues tiene un origen geográfico común con algunas de ellas, así como también poseen un carácter morfológico común de hojas con peciolo alado

El análisis se ha realizado con los mismos métodos, pero de forma paralela, tanto del pericarpio de seis Papedas como de las hojas de dos Papedas y un pummelo o zambao.

Las muestras se recogieron de la colección de cítricos de Todolí Citrus Fundació que, junto con el Instituto Agroforestal del Mediterráneo (IAM), han colaborado en esta investigación.

2.1. Variedades para estudio en pericarpio.

Para las extracciones en el pericarpio de los frutos se han usado las variedades *Citrus macroptera*, *C. micrantha*, *C. hystrix*, *C. macrophylla*, *C. sudachi* y *C. sphaerocarpa*.

2.2. Variedades para estudio en hojas.

Para el estudio en hojas se han usado *Citrus hystrix*, *C. micrantha* y *C. maxima* cv. Chandler. En este caso se aborda también el estudio de una variedad de pummelo con el fin de analizar y comparar los resultados con los de las papedas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tanto para la extracción de los aceites esenciales en pericarpio como en hojas se ha usado el mismo método de extracción sólido-líquido, pero con ciertos cambios. En el caso de las hojas, debido a la presencia de compuestos como la clorofila, que interfieren en el análisis, se empleó carbón activado en polvo y se centrifugaron las muestras. En el caso de las cortezas no hubo necesidad de usar carbón activado ni centrifugar las muestras, pero sí se realizó un baño de ultrasonidos para favorecer la extracción. En los dos casos se realizaron los mismos análisis, el análisis por cromatografía de gases (GC) con detector por ionización de llama (FID) para un análisis cuantitativo y con detector de espectroscopía de masas (MS) para un análisis cualitativo.

3.1. Materiales

3.1.1. Material para análisis en pericarpio

- Agitador orbital Rotabit J.P. SELECTA®.
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Diclorometano CH_2Cl_2 (Scharlau)
- Equipo ultrasonidos Elma-S 30 Elmasonic
- Hexano (Sharlau)
- Lana de vidrio
- Parafilm
- Pipetas pasteur
- Rallador de cocina
- Sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4 (Merck k GaA)
- Tubos de ensayo
- Tubos de centrifuga
- Viales de inserto

3.1.2. Material para análisis en hojas

- Agitador orbital Rotabit J.P. SELECTA®.
- Arena de sílice
- Balanza analítica
- Carbón activado
- Diclorometano CH_2Cl_2 (Scharlau)
- Equipo de centrifugación - DIGICEN 20R Orto-Alresa
- Inserto para viales de cromatografía
- Mortero
- Hexano (Sharlau)
- Parafilm
- Pipetas pasteur
- Tubos de centrifuga
- Viales de inserto

El carbón activado es una forma sólida del carbono que posee una microestructura no gráfica desorganizada que le proporciona una estructura abierta superficial, la cual es responsable de su elevada capacidad de adsorción (Filippín et al., 2017) y gracias a su baja afinidad con el agua se aprovecha en muchas aplicaciones, tanto para sustancias líquidas como gaseosas, tan diversas como la purificación del agua potable, el uso como decolorante y desodorizante en la industria alimentaria o como catalizador y purificador en la industria química y farmacéutica.

Los productos comerciales de carbón activado se fabrican a partir de materiales orgánicos ricos en carbono, en particular carbón, lignito, madera, cáscaras de nuez, turba, breas y coques. (Baker et al., 2003).

3.2. Métodos

3.2.1. Experimento previo

Para elegir los métodos que se usarían con las muestras objetivo, se realizaron una serie de experimentos previos para la extracción de los aceites esenciales de la especie *Citrus australasica* F. Muell., conocida como lima dedo o caviar cítrico, material que fue obtenido del Banco de Germoplasma de Cítricos del IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Se usaron dos métodos, extracción sólido-líquido con centrifugación e hidrodestilación con rotovapor.



Figura 16: Caviar vegetal.

El *C. australasica* es endémico de Australia. En la actualidad tiene cierta relevancia por su uso en recetas de alta cocina y se le denomina popularmente “caviar cítrico” en referencia a las vesículas redondeadas del fruto que se separan fácilmente (Ruiz, 2016).

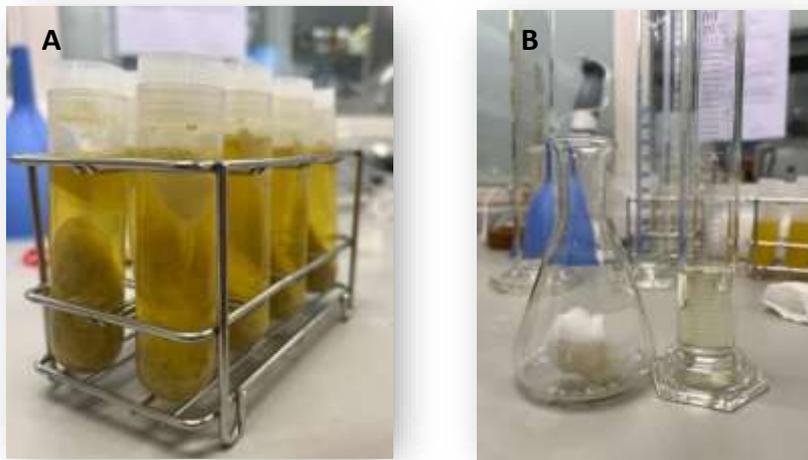


Figura 17: Método de extracción con centrifuga. (A) Resultado de muestra tras la centrifugación. (B) Obtención de muestra final tras filtrado con algodón y sulfato de sodio.

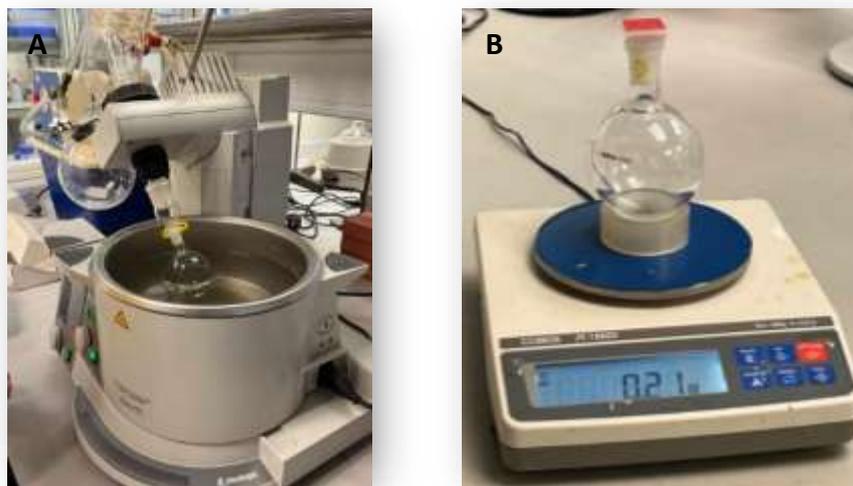


Figura 18: Método de hidrodestilación. (A) Muestra en rotavapor. (B) Cantidad de muestra final obtenida.

Finalmente, se optó por realizar una **extracción sólido-líquido** ya que es el método más adecuado para materiales vegetales que producen bajas cantidades de aceite esencial pues no requiere de altas temperaturas y por tanto no modifica ninguno de los componentes del aceite. Con este método además de los compuestos volátiles también se pueden aislar compuestos no volátiles. Esta técnica es comúnmente usada en la industria de perfumería y cosmética.

También se aceptó como adecuado el disolvente consistente en la mezcla **hexano-diclorometano**, puesto que los aceites son liposolubles y por tanto solubles en disolventes orgánicos como éstos dos. Convenía también que el disolvente tuviera algo de polaridad y que fuera menos denso que el agua, para que cuando la emulsión se rompiera y se diferenciara la fase orgánica (aceite esencial y disolvente orgánico) de la fase acuosa (sales inorgánicas y compuestos solubles en agua) no cayera al fondo de los tubos la fase orgánica de interés; por lo tanto el diclorometano, que es relativamente polar (constante dieléctrica $k = 9,1$) pero una mayor densidad que el agua ($1,33 \text{ g/cm}^3$), se compensa con el hexano que es menos denso ($0,655 \text{ g/cm}^3$) y prácticamente apolar ($k = 2,0$) haciendo que dicha fase orgánica se mantenga en la parte superior. Asimismo, estas dos sustancias tienen una temperatura de ebullición baja (diclorometano 40°C y hexano 68°C) por lo que son fáciles de separar con el rotovapor.

3.2.2. Extracción de aceites esenciales en pericarpio

El primer paso fue preparar una cantidad de 100 mL del disolvente hexano-diclorometano en proporción 75:25 por las características ya mencionadas.

Seguidamente se realizó un raspado en frío del flavedo de manera superficial, para no llegar al albedo, utilizando un rallador de cocina hasta obtener una cantidad de 1 g. Esta operación se realizó por triplicado para cada variedad.

Cada gramo de muestra se depositó en un tubo de ensayo al que se le añadieron 1,5 mL del disolvente hexano-diclorometano y posteriormente se sellaron los tubos de ensayo con Parafilm y se sumergieron en un baño de ultrasonidos con agua destilada fría durante 5 minutos con el objetivo de mejorar la eficiencia de la extracción.

Al finalizar ese tiempo, se sacaron las muestras del baño de ultrasonidos y se les añadió a cada una de ellas una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) ampliamente usado como desecante en laboratorios e industria para deshidratar las muestras. Luego se agitaron las muestras con el vórtex, se dejó reposar y se filtró por succión a través de lana de vidrio con el fin de eliminar todos los sólidos.

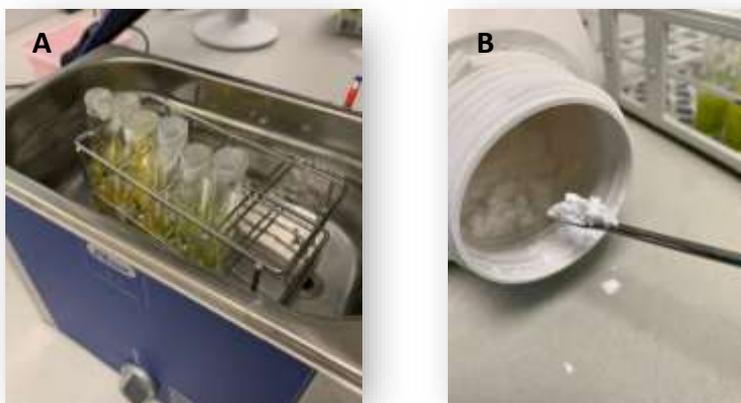


Figura 19: (A) Equipo de ultrasonidos. (B) Sulfato de sodio anhidrido.

Por último, el aceite esencial que se obtiene de la filtración se guarda en los viales cromatográficos sellados con Parafilm en nevera a 4°C.

3.2.3. Extracción de aceites esenciales en hojas

Como en la extracción efectuada con el pericarpio, el primer paso fue la preparación de 40 mL de la mezcla hexano-diclorometano en proporción 75:25.

Tras esto, se trituraron en un mortero con arena de sílice para facilitar el proceso, 1 g de muestra de hojas y se añadieron 6 mL del disolvente. Esta operación se realizó por triplicado para cada variedad.

Las suspensiones obtenidas de cada repetición se transfirieron a un tubo de centrifuga de 10 mL, añadiendo en cada tubo una cantidad aproximada de 50 mg de carbón activado por sus propiedades adsorbentes e hidrófobas.

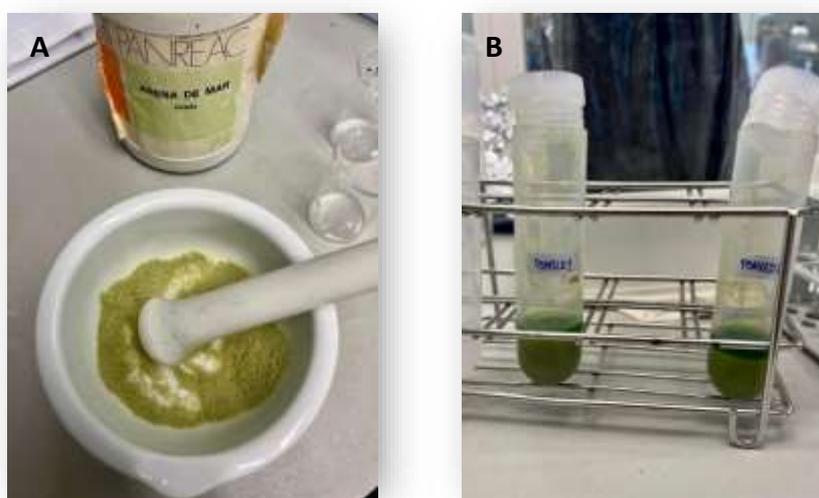


Figura 20: (A) Hojas trituradas con arena de sílice. (B) Tubos de centrifuga con muestras de Pummelo

Posteriormente, se llevaron los tubos al equipo de centrifugación durante 15 minutos a 10500 rpm y a una temperatura de 4°C para favorecer la separación entre fases.

Por último, tras este periodo se añadió sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) a la fase orgánica para eliminar las trazas de agua y se filtró succionando con pipetas Pasteur a través de algodón estéril. Se llevó el extracto obtenido a un vial cromatográfico de inserto, sellado con Parafilm y guardado en nevera a 4°C.

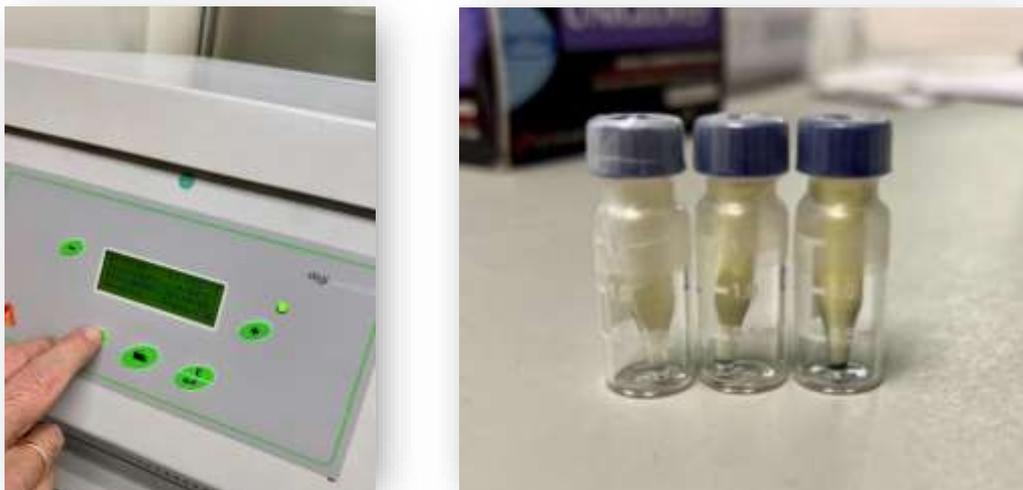


Figura 21: (A) Equipo de centrifugación. (B) Viales cromatográficos con aceite esencial.

3.2.4. Análisis de los compuestos obtenidos

3.2.4.1. Análisis GC/MS

La **identificación cualitativa** de los compuestos de los aceites esenciales se llevó a cabo por cromatografía de gases con detección por espectroscopía de masas (GC/MS). Para ello se usó un cromatógrafo Clarus 500 GC-MS (Perkin-Elmer Inc.) con una columna capilar ZB-5 (30 m × 0,25 mm de diámetro interior × 0,25 5 μm de espesor de película; Phenomenex Inc. Torrance. CA. EE.UU.) y helio como gas portador (1,2 mL min⁻¹) a una temperatura del inyector de 250 °C. La temperatura del horno se programó de forma que aumentara gradualmente a una velocidad de 3 °C /min en un gradiente de 50 °C hasta 250 °C. Para este detector se empleó el modo de ionización por impacto electrónico de 70 eV a una temperatura de fuente de ionización de 200 °C. Los espectros de masas fueron obtenidos mediante el modo de barrido de iones totales (TIC) con un rango de masas m/z 45-500 uma.

Tanto los cromatogramas como los espectros se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). La identificación de los picos se realizó combinando: la comparación del cálculo de los índices de retención lineal (LRI) de los compuestos con los valores experimentales descritos en Adams (2007), y el análisis de comparación automática de los espectros obtenidos con los de la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EE.UU.) mediante las aplicaciones informáticas Turbomass 2.0 y AMDIS. Los índices de retención lineales se calcularon a partir de los tiempos de retención de patrones puros de la serie de los n-alcenos (C8-C30), según la siguiente ecuación

$$IRL = \left(\frac{t_r(\text{desconocido})}{t_r(N) - t_r(n)} \right) (100 \times Z) + (100 \times n)$$

Donde:

n: número de átomos de carbono del n-alceno que eluye antes del compuesto analizado

N: número de átomos de carbono del n-alceno que eluye después del compuesto analizado

Z: a diferencia del número de átomos de carbono de n-alceno entre el que eluye antes del compuesto y el de después del compuesto.

$t_{r(\text{desconocido})}$: tiempo de retención del compuesto analizado

$t_{r(n)}$: tiempo de retención del n-alceno anterior al compuesto

$t_{r(N)}$: tiempo de retención del n-alcano posterior al compuesto

Estos índices, denominados también de Van Den Dool y Kratz se aplican cuando existe un programa de temperatura (rampa) asociado al funcionamiento del cromatógrafo, mientras que los índices de retención de Kovats se aplican cuando las condiciones de trabajo son isotermas.

3.2.4.2. Análisis GC/FID

La **identificación cuantitativa** de la composición química de los aceites esenciales se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC/FID). El aparato usado fue un Clarus 500 GC (Perkin-Elmer Inc. PA. EE.UU.) con una columna de las mismas características, mismo gas portador y mismas condiciones operativas que en las usadas para GC/MS y descritas en el apartado anterior. El volumen de inyección de muestra fue de 1 μ L, con una temperatura para el inyector y detector de 250 °C. Los cromatogramas obtenidos se procesaron con el *software* Total Chrome 6.2 (Perkin-Elmer Inc., Wellesley. OA. EE.UU.), obteniéndose composición porcentual de los aceites esenciales a partir de las áreas de los picos del cromatograma sin aplicar factores de respuesta.

Las muestras en FID se analizaron por triplicado para obtener una media teniendo en cuenta un error estándar (ES) para el que se tomó 1 decimal siguiendo el criterio de JEOR *-Journal of essential oils research-* que indica que con menos de cinco repeticiones se utiliza un solo decimal.

La identificación de los compuestos en FID se realizaron comparando los índices de retención con los obtenidos por espectroscopía de masas, lo cual se pudo realizar porque se usaron las mismas columnas y en las mismas condiciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

A continuación, se muestra en la Tabla 1 las abreviaturas utilizadas en las siguientes tablas, tabla de resultados obtenidos tras los análisis del pericarpio (Tabla 2) y de las hojas (Tabla 3). La Tabla 4 contiene datos bibliográficos recogidos de distintas investigaciones que sirven para realizar una comparación de las composiciones.

Tabla 1: Abreviaturas utilizadas.

| | Muestra | Abreviatura |
|------------|---|-------------|
| Pericarpio | <i>Citrus macroptera</i> | MPT |
| | <i>Citrus hystrix</i> | HX |
| | <i>Citrus micrantha</i> | MIC |
| | <i>Citrus macrophylla</i> | MPH |
| | <i>Citrus sudachi</i> | SUD |
| | <i>Citrus sphaerocarpa</i> - Kabosu | K |
| Hojas | <i>Citrus hystrix</i> | HX H |
| | <i>Citrus micrantha</i> | MIC H |
| | <i>Citrus maxima</i> – Pummelo Chandler | PUM H |

Tabla 2: Resultados de los análisis de los compuestos de los aceites esenciales en el estudio del pericarpio

| Compuesto | LRI Bibliográfico | VARIETADES PERICARPIO | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | HX | | K | | MIC | | MPH | | MPT | | SUD | |
| | | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| α-Tuyeno | 924 | 924 - 926 | 0,1±0 | - | - | - | - | 924 - 925 | 0,2±0 | 924 - 925 | 0±0 | 932 - 933 | 0,7±0,3 |
| 1R-α-Pineno | 935 ¹ | 932 - 934 | 2,2±0,1 | 931 - 932 | 0,4±0 | 931 - 933 | 1,7±0 | 931 - 933 | 0,8±0 | 931 - 933 | 0,6±0 | - | - |
| Canfeno | 946 | 948 - 950 | 0,1±0 | - | - | 948 - 949 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - |
| Sabineno | 969 | 974 - 976 | 20,6±0,6 | 971 - 972 | 0,1±0 | 971 - 973 | 4,8±0,2 | 970 - 972 | 0,1±0 | 973 - 974 | 6,5±0 | 971 - 972 | 0,3±0,1 |
| (E)-Iso-Limoneno | 980 | - | - | - | - | 978 - 981 | 32,6±1 | - | - | - | - | - | - |
| β-Pineno | 979 | 980 - 982 | 27±1 | 976 - 977 | 0,2±0 | - | - | 976 - 977 | 0,6±0 | 977 - 978 | 1,3±0 | 976 - 977 | 0,4±0,1 |
| Mirceno | 988 | 989 - 992 | 1,5±0,1 | 989 - 990 | 18,3±0,2 | 988 - 989 | 0,6±0 | - | - | 989 - 990 | 1,9±0 | 988 - 989 | 1,1±0,2 |
| Octanal | 998 | 1006 - 1007 | 0,1±0 | - | - | - | - | 1002 - 1004 | 0,1±0 | 1003 - 1006 | 0,1±0 | - | - |
| α-Felandreno | 1002 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1003 - 1007 | 1±0,2 |
| α-Terpineno | 1014 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1016 - 1017 | 0,1±0 |
| p-Cimeno | 1022 | - | - | 1024 - 1025 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - | 1024 - 1025 | 0,1±0 |
| Limoneno | 1024 | 1031 - 1033 | 15,8±0,2 | 1031 - 1033 | 73,3±0,2 | 1029 - 1032 | 8,3±0,6 | 1032 | 69,6±0,3 | - | - | 1030 - 1032 | 63±4,9 |
| (Z)-β-Ocimeno | 1032 | - | - | - | - | - | - | 1035 - 1037 | 0,8±0 | 1031 - 1041 | 86,8±0,1 | - | - |
| (E)-β-Ocimeno | 1044 | 1045 - 1047 | 0,1±0 | 1045 - 1046 | 0,1±0 | 1045 | 0,5±0,2 | 1045 - 1047 | 1,3±0 | - | - | 1045 - 1046 | 0,3±0 |
| γ-Terpineno | 1054 | - | - | 1057 - 1058 | 2,1±0 | - | - | 1058 - 1061 | 9,6±0 | - | - | 1057 - 1059 | 8,3±0,1 |
| (Z)-Hidrato de sabineno | 1065 | 1071 - 1072 | 1,3±0,1 | - | - | 1069 - 1070 | 0,1±0,1 | - | - | 1070 - 1072 | 0,2±0 | - | - |
| Terpinoleno | 1086 | 1084 | 0±0 | 1084 - 1085 | 0,1±0 | - | - | 1085 - 1086 | 0,1±0 | - | - | 1084 - 1085 | 0,4±0 |
| β-Linalol | 1095 | 1100 - 1102 | 1,3±0,1 | - | - | 1099 - 1100 | 0,5±0,3 | 1101 - 1104 | 0,2±0,1 | 1100 - 1001 | 0,1±0 | 1100 - 1101 | 0,6±0,1 |
| n-Nonanal | 1100 | 1104 - 1106 | 0±0 | - | - | - | - | 1105 | 0±0 | 1104 - 1106 | 0,2±0 | - | - |
| (Z)-Óxido de limoneno | 1132 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1129 - 1133 | 0±0 | - | - |
| Citronelal | 1148 | 1155 | 15,1±0,5 | - | - | - | - | 1151 - 1153 | 0,1±0 | - | - | 1152 - 1153 | 0,1±0 |
| Iso-Pulegol | 1156 | - | - | - | - | 1155 - 1158 | 27±1,5 | - | - | - | - | - | - |
| Borneol | 1165 | 1173 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-Terpineol | 1186 | 1196 - 1197 | 1,2±0,2 | - | - | 1195 - 1196 | 0,7±0 | - | - | 1195 - 1196 | 0,1±0 | 1196 | 0,1±0 |
| Decanal | 1201 | 1206 - 1207 | 0,1±0 | 1206 - 1207 | 0,2±0 | - | - | 1205 - 1207 | 0,1±0 | 1206 - 1207 | 0,1±0 | 1206 - 1207 | 0,1±0 |
| Citronelol | 1223 | - | - | - | - | 1227 - 1228 | 0,7±0,1 | - | - | - | - | - | - |
| Neral | 1235 | - | - | - | - | - | - | 1237 - 1239 | 0,7±0,1 | 1238 - 1239 | 0,1±0 | - | - |
| Geraniol | 1249 | - | - | - | - | 1250 - 1252 | 0,2±0 | - | - | - | - | - | - |
| Geranial | 1264 | - | - | - | - | - | - | 1267 - 1269 | 1±0,1 | 1268 - 1269 | 0,1±0 | - | - |

| | | VARIEDADES PERICARPIO | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | HX | | K | | MIC | | MPH | | MPT | | SUD | |
| Compuesto | LRI Bibliográfico | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| (E)-Acetato de pinocarveol | 1298 | - | - | - | - | 1294 - 1295 | 0,2±0 | - | - | - | - | - | - |
| Undecanal | 1308 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1307 - 1308 | 0±0 | - | - |
| Acetato de (E)-Carveol | 1338 ² | - | - | - | - | - | - | - | - | 1323 - 1325 | 0±0 | - | - |
| δ-Elemeno | 1335 | - | - | - | - | 1033 - 1035 | 0,7±0 | - | - | - | - | 1330 - 1335 | 2,5±0,6 |
| Acetato de citronelilo | 1350 | 1349 - 1350 | 1±0,1 | - | - | 1349 - 1351 | 2,6±0,5 | - | - | - | - | - | - |
| Acetato de nerilo | 1359 | 1357 - 1359 | 0±0 | 1358 - 1359 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-Copaeno | 1374 | 1374 - 1376 | 0,7±0,1 | 1374 - 1375 | 0,1±0 | 1374 - 1375 | 0,2±0 | - | - | 1374 - 1375 | 0,1±0 | 1374 - 1375 | 0,1±0 |
| Acetato de geranilo | 1379 | 1377 - 1379 | 1,4±0,2 | 1380 | 0±0 | 1377 - 1379 | 3±0,2 | 1377 - 1378 | 0,1±0 | 1378 | 0±0 | - | - |
| β-Cubebano | 1387 | 1386 - 1388 | 0,5±0,1 | 1386 - 1389 | 0,2±0 | 1385 - 1389 | 0,4±0 | 1386 - 1389 | 0,2±0 | 1386 - 1387 | 0±0 | 1380 - 1381 | 0,2±0 |
| β-Elemeno | 1389 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1387 - 1389 | 2,6±0,7 |
| Dodecanal | 1408 | - | - | 1400 - 1402 | 0±0 | - | - | - | - | 1410 | 0±0 | - | - |
| (Z)-α-Bergamoteno | 1411 | - | - | - | - | - | - | 1411 - 1412 | 0±0 | - | - | - | - |
| β-Cariofileno | 1417 | 1417 - 1419 | 0,6±0,1 | 1417 - 1419 | 0,1±0 | - | - | 1417 - 1419 | 0,5±0 | 1417 - 1419 | 0,1±0 | 1417 - 1419 | 0,3±0,1 |
| β-Copaeno | 1430 | 1428 - 1429 | 0±0 | - | - | 1427 - 1429 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - |
| (E)-α-Bergamoteno | 1432 | - | - | - | - | - | - | 1431 - 1436 | 0,9±0 | - | - | 1431 - 1436 | 0,5±0,1 |
| α-Guayeno | 1437 | 1432 - 1433 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1433 - 1435 | 0,1±0 |
| α-Humuleno | 1452 | 1454 - 1455 | 0,1±0 | - | - | 1453 - 1455 | 0,1±0 | 1451 - 1455 | 0,2±0 | 1453 - 1455 | 0±0 | - | - |
| (E)-β-Farneseno | 1454 | - | - | 1452 - 1453 | 0,9±0,1 | - | - | - | - | - | - | 1451 - 1455 | 1,7±0,5 |
| γ-Muuroleno | 1478 | 1473 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Germacreno D | 1480 | 1479 | 0,2±0,1 | - | - | 1473 | 0±0 | 1479 - 1481 | 1,6±0,1 | 1479 - 1480 | 0±0 | 1479 - 1481 | 1,9±0,5 |
| Valenceno | 1496 | 1493 - 1495 | 0,1±0 | 1493 - 1495 | 0±0 | 1487 - 1489 | 0±0 | 1493 - 1495 | 0,5±0 | - | - | - | - |
| Bicyclogermacreno | 1500 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1493 - 1495 | 0±0 |
| E-E-α-Farneseno | 1505 | - | - | - | - | 1503 - 1504 | 2±0 | 1502 - 1503 | 0,2±0 | - | - | - | - |
| β-Bisaboleno | 1505 | - | - | - | - | - | - | 1506 - 1508 | 1,3±0,1 | - | - | - | - |
| (Z)-α-Bisaboleno | 1506 | - | - | - | - | - | - | 1498 - 1500 | 0,1±0 | - | - | - | - |
| Germacreno A | 1508 | - | - | 1505 - 1507 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-Bulneseno | 1509 | 1503 - 1504 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1503 - 1504 | 0±0 |
| α-Farneseno | 1505 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1501 - 1507 | 3,3±1,9 |
| γ-Cadineno | 1513 | 1516 - 1518 | 0,8±0 | 1516 - 1518 | 0,1±0 | 1516 - 1518 | 0,2±0 | 1516 - 1518 | 0±0 | 1516 - 1518 | 0,1±0 | 1516 - 1518 | 0,1±0 |
| (E)-Iso-γ-Bisaboleno | 1528 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Germacreno B | 1559 | - | - | - | - | 1557 - 1558 | 0,6±0,1 | 1557 - 1558 | 0,1±0 | - | - | 1556 - 1558 | 2,7±0,7 |

| | | VARIETADES PERICARPIO | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|------------|
| | | HX | | K | | MIC | | MPH | | MPT | | SUD | |
| Compuesto | LRI Bibliográfico | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| (E)-Nerolidol | 1561 | 1561 - 1562 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | 1563 - 1564 | 0±0 | - | - |
| Germacreno D-4-ol | 1574 | 1576 - 1577 | 0±0 | - | - | - | - | 1576 - 1577 | 0,1±0 | - | - | - | - |
| 1-epi-Cubenol | 1627 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1623 | 0±0 |
| Hexadecanol | 1883 ³ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1891 - 1894 | 0±0 |
| Ácido hexadecanoico | 1959 | 1968 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1964 - 1966 | 0±0 |
| Citropteno | 1992,8 ⁴ | - | - | - | - | - | - | 1978 | 0±0 | - | - | - | - |
| Bergapteno | 2056 | - | - | - | - | 2049 - 2050 | 0,2±0 | - | - | - | - | - | - |
| Eicosanal | 2224 ⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | 2229 - 2230 | 0±0 | - | - |
| Docosanal | 2430,5 ⁶ | - | - | - | - | - | - | - | - | 2433 - 2435 | 0±0 | - | - |
| Tricosano | 2300 | - | - | 2299 - 2302 | 0,2±0 | - | - | 2299 - 2300 | 0,1±0 | - | - | 2300 - 2302 | 0,1±0 |
| Bergaptol | * | 2347 - 2351 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tetracosano | 2400 | 2396 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2395 - 2402 | 0±0 |
| Octadecanal | 2021 | 2423 | 0±0 | - | - | 2417 - 2419 | 0±0 | 2433 - 2434 | 0±0 | - | - | - | - |
| Prangenin | 2462,2 ⁷ | - | - | - | - | - | - | 2461 - 2462 | 0±0 | - | - | - | - |
| Oxypeucedanin | 2500,7 ⁸ | 2490 - 2492 | 0±0 | - | - | 2480 | 0±0 | 2476 - 2477 | 0,1±0 | - | - | - | - |
| Pentacosano | 2500 | - | - | 2492 - 2494 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | 2499 - 2501 | 0,2±0,1 |
| α-Amirin | 3376 ⁹ | - | - | - | - | 2596 - 2599 | 0,1±0,1 | - | - | - | - | - | - |
| Hexacosano | 2600 | 2599 - 2603 | 0±0 | - | - | - | - | 2599 - 2601 | 0,4±0,2 | - | - | 2598 - 2601 | 0,1±0 |
| Tetracosanal | 2632,4 ¹⁰ | 2624 | 1,2±0,6 | - | - | - | - | - | - | 2631 - 2638 | 0,2±0 | 2637 - 2638 | 0,8±0,2 |
| Aurapteno | 2634 ¹¹ | - | - | - | - | - | - | 2628 - 2633 | 0,3±0,2 | - | - | - | - |
| 9-[[3,3-Dimetil-2-oxiranil] metoxi]-4-metoxi-7H-furo[3,2-g]-cromen-7-ona | 2671,5 ¹² | - | - | - | - | - | - | 2636 - 2647 | 0,5±0,1 | - | - | - | - |
| Imperatorin | 2356 ¹³ | - | - | - | - | - | - | 2668 - 2670 | 0±0 | - | - | - | - |
| Heptacosano | 2700 | 2696 - 2697 | 0±0 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2699 | 0,2±0,1 |
| (+)-Oxipeucedanin hidrato | 2739 ¹⁴ | - | - | - | - | - | - | 2740 - 2742 | 0±0 | - | - | - | - |
| Escualeno | 2847,1 ¹⁵ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2805 - 2807 | 0±0 |
| Hexacosanal | 2852 ¹⁶ | - | - | - | - | - | - | 2837 - 2839 | 0±0 | - | - | 2823 - 2825 | 0,2±0,1 |
| Nonacosano | 2900 | 2902 - 2908 | 0±0 | 2891 | 0±0 | - | - | 2907 - 2909 | 0,1±0 | - | - | - | - |
| Heptacosanal | 2944,4 ¹⁷ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2948 - 2949 | 0,1±0 |
| Docosanoato de hexilo (MS, ion molecular) | 2966,35 ¹⁸ | - | - | 2979 - 2980 | 0,1±0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Triacotano | 3000 | 3006 - 3007 | 0±0 | - | - | - | - | 3014 | 0±0 | 3006 - 30007 | 0±0 | - | - |

| Compuesto | LRI Bibliográfico | VARIEDADES PERICARPIO | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|-----------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | | HX | | K | | MIC | | MPH | | MPT | | SUD | |
| | | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| ÁREA TOTAL IDENTIFICADA (%) | | 93,6 | | 96,8 | | 88,1 | | 92,7 | | 98,6 | | 97,8 | |
| HIDROCARBUROS MONOTERPÉNICOS | | 67,4 | | 94,7 | | 48,6 | | 83,1 | | 97,1 | | 79,1 | |
| MONOTERPENOS OXIGENADOS | | 21,3 | | 0,1 | | 35 | | 2,1 | | 0,8 | | 0,8 | |
| HIDROCARBUROS SESQUITERPÉNICOS Y SESQUITERPENOS OXIGENADOS | | 3 | | 1,4 | | 4,3 | | 5,7 | | 0,3 | | 16,3 | |
| ALDEHIDOS, ALCOHOLES Y ÉSTERES ALIFÁTICOS | | 1,4 | | 0,3 | | 0,0 | | 0,2 | | 0,4 | | 1,2 | |
| HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS | | 0,0 | | 0,2 | | 0,0 | | 0,6 | | 0,0 | | 0,6 | |
| CUMARINAS Y OTROS COMPUESTOS | | 0,0 | | 0,0 | | 0,3 | | 0,9 | | 0,0 | | 0,0 | |

*Identificado tentativamente mediante el programa AMDIS por similitud de espectro de masas.

LRI: Índice de Retención Lineal Experimental

ES: Error estándar

Referencia de LRI no obtenidos del libro de Adams (2007):

| | |
|---|---|
| 1. Webbook Nist: Zeller and Rychlik, 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7785708&Mask=2000#ref-3 |
| 2. Webbook Nist: Benzo, Gilardoni, et al. 2007 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1134958&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 3. Webbook Nist: Hazzit, Baaliouamer, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C36653824&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 4. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C487069&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 5. Webbook Nist: Lazari, Skaltsa et al., 2000 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C2400660&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 6. PubChem | https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docosanal#section=Computed-Properties |
| 7. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C2880491&Mask=2000#ref-1 |
| 8. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C737520&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 9. Webbook Nist: Todua, 2011 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C638959&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 10. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C57866087&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 11. Webbook Nist: Feger, Brandauer, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C495023&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 12. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C26091792&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 13. Webbook Nist: Feger, Brandauer, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C482440&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 14. Webbook Nist: Feger, Brandauer, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C2643858&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 15. Webbook Nist: Zhao C.X, Li, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C111024&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 16. Webbook Nist: Lazari, Skaltsa, et al., 2000 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C506525&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 17. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 | https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C72934033&Mask=2000#Gas-Chrom |
| 18. Webbook Nist: Stransky, Zarevucka, et al., 2006 | https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C26720376&Mask=2000#Gas-Chrom |

Tabla 3: Resultado de los análisis de los compuestos de los aceites esenciales en el estudio de las hojas.

| Compuesto | LRI Bibliográfico | VARIEDADES HOJAS | | | | | |
|-------------------------|-------------------|------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | HX H | | MIC H | | PUM H** | |
| | | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| α -Pino | 935 ¹ | 932 - 933 | 0,1±0,1 | 932 | 0,1±0,1 | 933 | 0,3±0,1 |
| Sabineno | 969 | 972 - 973 | 0,4±0,2 | 972 | 0,4±0,2 | 972 | 1,1±0,2 |
| β-Pino | 979 | 977 - 978 | 0,4±0,2 | 977 - 978 | 0,5±0,3 | 977 - 978 | 1,5±0,1 |
| Mirceno | 988 | 989 - 990 | 0,6±0,4 | 989 - 990 | 0,6±0,3 | 989 | 1,3±0,3 |
| α-Terpineno | 1014 | - | - | - | - | 1017 | 0,1±0 |
| p-Cimeno | 1022 | 1025 | 1,5±0,8 | 1025 - 1026 | 1,2±0,7 | 1025 | 3,3±0,7 |
| Limoneno | 1024 | 1029 - 1031 | 23,9±13,2 | 1030 - 1033 | 18,6±10,7 | 1030 - 1036 | 53,6±9,6 |
| (E)-β-Ocimeno | 1044 | - | - | - | - | 1046 | 0,1±0 |
| γ-Terpineno | 1054 | 1058 | 0,8±0,4 | 1058 | 0,5±0,3 | 1058 | 1,5±0,1 |
| Terpinoleno | 1086 | 1085 - 1086 | 0,3±0,2 | 1085 | 0,2±0,1 | 1085 | 0,5±0 |
| β-Linalol | 1095 | 1101 | 0,8±0,1 | 1100 - 1101 | 0,6±0,1 | - | - |
| 2,4,6-Trimetildecano | 1121 ² | - | - | - | - | 1100 | 0,1±0 |
| β-Tuyona | 1112 | - | - | - | - | 1105 - 1106 | 0±0 |
| Octanoato de metilo | 1123 | 1124 | 0,6±0,3 | 1124 | 0,4±0,1 | 1124 | 0,8±0 |
| Citronelal | 1148 | 1153 - 1155 | 15,3±2,3 | 1154 - 1157 | 31,4±6,8 | 1153 | 0,1±0,1 |
| β-Citronelol | 1228 ³ | 1228 - 1229 | 0,8±0,5 | 1228 - 1229 | 2,6±0,4 | - | - |
| Pulegona | 1233 | 1231 | 0,7±0,7 | - | - | 1240 | 0,1±0 |
| Piperitona | 1249 | 1239 | 0,1±0,1 | - | - | - | - |
| Geraniol | 1249 | - | - | 1252 | 0,4±0,1 | - | - |
| Acetato de citronelilo | 1350 | 1349 - 1352 | 0,6±0,3 | 1350 | 2,3±0,6 | - | - |
| α-Copaeno | 1374 | 1375 | 0,2±0,1 | 1375 | 0,3±0,1 | - | - |
| (Z)-Acetato de geraniol | 1379 | 1378 - 1380 | 0,2±0,1 | 1378 | 1,3±0,4 | - | - |
| (E)-β-Cariofileno | 1417 | 1419 | 1,6±0,4 | 1419 | 0,9±0,2 | 1419 | 0,4±0,2 |
| α-Humuleno | 1452 | - | - | 1455 | 0,2±0 | - | - |
| Germacreno D | 1480 | - | - | 1474 - 1475 | 0,2±0 | - | - |
| Valenceno | 1496 | 1494 - 1495 | 0,8±0,2 | 1490 | 0,3±0,1 | 1495 | 1±0,6 |
| (E)-(E)-α-Farneseno | 1505 | 1504 - 1506 | 0,3±0,1 | 1504 - 1506 | 2,2±0,3 | - | - |
| γ-Cadineno | 1513 | 1517 - 1518 | 0,7±0,2 | 1516 - 1517 | 0,3±0,2 | - | - |

| Compuesto | LRI Bibliográfico | VARIEDADES HOJAS | | | | | |
|---|----------------------|------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | HX H | | MIC H | | PUM H** | |
| | | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| (E)-Iso-γ-Bisaboleno | 1528 | - | - | 1518 | 0,4±0,2 | - | - |
| Germacreno B | 1559 | - | - | 1549 | 0,1±0,1 | - | - |
| Germacreno-D-4-ol | 1574 | - | - | - | - | 1577 | 0,1±0,1 |
| (E)-Nerolidol | 1561 | 1562 - 1564 | 0,6±0,3 | - | - | - | - |
| Farnesol isomero a | * | 1614 - 1616 | 0,3±0,2 | 1613 - 1614 | 0,3±0,1 | - | - |
| 4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol | 1609 ^{4*} | - | - | 1717 - 1720 | 0,1±0 | - | - |
| Hexadecanal | 1811 ⁵ | - | - | - | - | 1823 - 1824 | 0,1±0,1 |
| Ácido ftálico | 1871,8 ⁶ | 1865 - 1866 | 0,9±0,4 | 1865 | 0,8±0,6 | 1865 | 0,3±0,1 |
| Ftalato de dibutilo (plastificante) | 1967,4 ⁷ | 1955 | 0±0 | 1955 - 1960 | 1,1±0,4 | 1949 - 1955 | 0±0 |
| Ácido hexadecanoico | 1964 | 1968 - 1970 | 3,1±0,9 | 1968 - 1970 | 2,1±0,9 | 1959 - 1969 | 3,7±1,2 |
| Octadecanal | 2021 | 2025 - 2026 | 0,5±0,1 | - | - | 2024 - 2026 | 0,4±0,2 |
| (E)-(E)-Geraniil linalol | 2026 | - | - | 2025 - 2026 | 0,3±0,1 | - | - |
| Bergapteno | 2056 | - | - | 2050 - 2051 | 0,1±0,1 | - | - |
| Oleonitrilo | * | - | - | - | - | 2084 - 2086 | 0,1±0,1 |
| (E)-Fitol | 2122 ⁸ | - | - | 2113 - 2115 | 1,9±1 | - | - |
| Ácido α-linolénico | 2143 ⁹ | 2139 - 2140 | 1,1±0,3 | 2139 - 2140 | 0,7±0,3 | 2139 - 2141 | 0,5±0 |
| Ácido octadecanoico | 2124 | - | - | 2168 - 2170 | 0,5±0,3 | 2167 - 2169 | 0,3±0,1 |
| Hexadecanamida | 2182 ¹⁰ | 2182 | 0±0 | 2188 | 0,3±0 | 2184 - 2189 | 0,3±0,1 |
| Docosano | 2200 | 2196 - 2200 | 0,2±0,1 | - | - | 2199 - 2201 | 0,4±0,2 |
| Isopimpinellin | 2237 | - | - | 2233 | 0±0 | - | - |
| Tricosano | 2300 | 2299 - 2301 | 0,3±0,1 | - | - | 2299 - 2307 | 1,1±0,6 |
| Oleamida | 2375 | 2371 - 2378 | 4±1,2 | 2371 - 2379 | 2,6±0,3 | 2371 - 2381 | 4,1±1,2 |
| Octadecanamida | 2398 | 2382 - 2384 | 3,5±1,3 | 2393 - 2396 | 0,3±0,3 | 2395 - 2400 | |
| Tetracosano | 2400 | 2395 - 2400 | 1,4±0,5 | 2400 | 0,2±0,2 | 2400 | 2,2±0,9 |
| Oxipseucedanina | 2500,7 ¹¹ | - | - | 2492 - 2493 | 0,2±0,2 | - | - |
| Pentacosano | 2500 | 2499 | 0,3±0,3 | - | - | 2501 | 0±0 |
| (Z)-11-Eicosenamida | * | 2576 - 2579 | 0,1±0,1 | - | - | - | - |
| Hexacosano | 2600 | 2599 | 3±2,9 | 2598 - 2600 | 0,1±0,1 | 2600 | 0±0 |
| Heptacosano | 2700 | - | - | 2698 - 2699 | 0,3±0,1 | 2651 - 2665 | 0,3±0,1 |

| | | VARIEDADES HOJAS | | | | | |
|--|----------------------|------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | HX H | | MIC H | | PUM H** | |
| Compuesto | LRI Bibliográfico | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES | Rango LRI | Media ± ES |
| Octacosano | 2800 | 2805 | 0,8±0,4 | 2805 - 2806 | 0,4±0,2 | 2765 | 0,1±0,1 |
| Escualeno | 2847,1 ¹² | 2823 - 2824 | 0,4±0,1 | 2824 - 2825 | 0,2±0 | - | - |
| Nonacosano | 2900 | 2908 | 0,9±0,2 | 2905 - 2910 | 0,4±0,1 | 2896 - 2902 | 0±0 |
| Tetratetracontano | * | - | - | 3017 | 0±0 | 3014 | 0±0 |
| ÁREA TOTAL IDENTIFICADA (%) | | 72,1 | | 78,9 | | 79,8 | |
| HIDROCARBUROS MONOTERPÉNICOS | | 28 | | 22,1 | | 63,3 | |
| MONOTERPENOS OXIGENADOS | | 19,1 | | 40,1 | | 1 | |
| HIDROCARBUROS SESQUITERPÉNICOS Y SESQUITERPENOS OXIGENADOS | | 4,5 | | 5,2 | | 1,5 | |
| ALDEHIDOS, ALCOHOLES Y ÉSTERES ALIFÁTICOS | | 0,5 | | 0 | | 0,5 | |
| HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS | | 7,3 | | 1,6 | | 4,2 | |
| CUMARINAS Y OTROS COMPUESTOS | | 7,6 | | 3,5 | | 4,5 | |

* Identificado por el programa AMDIS por similitud de espectro de masas.

** Expresiones de datos de Pummelo con 2 repeticiones.

LRI: Índice de Retención Lineal Experimental

ES: Error estándar

Referencias bibliográficas de LRI no obtenidos del libro de Adams (2007):

1. Webbook Nist: Zeller and Rychlik, 2006 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7785708&Mask=2000#ref-3>
2. Webbook Nist: Sadashava, Sharanappa, et al., 2010 <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C62108274&Mask=2000#Gas-Chrom>
3. Webbook Nist: Hennig and Engewald, 1994 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106229&Mask=2000#Gas-Chrom>
4. PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-1E-Hydroxy-1-propenyl-2-methoxyphenol#section=Experimental-Properties>
5. Webbook Nist: Quijano, Salamanca et al., 2007 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C629801&Mask=2000#Gas-Chrom>
6. Webbook Nist: Zeng, Zhao et al., 2007 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C84695&Mask=2000#Gas-Chrom>
7. Webbook Nist: Zeng, Zhao et al., 2007 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C84742&Mask=2000#Gas-Chrom>
8. Webbook Nist: Hazzit, Baaliouamer et al., 2006 <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C150867&Mask=2000#Gas-Chrom>
9. Webbook Nist: Asuming, Beauchamp et al., 2005 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C463401&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom>
10. Webbook Nist: Lalel, Singh et al., 2003 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C629549&Mask=2000#Gas-Chrom>
11. Webbook Nist: Andriamaharavo, 2014 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C737520&Mask=2000#Gas-Chrom>
12. Webbook Nist: Zhao C.X, Li et al., 2006 <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1110324&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom>

Tabla 4: Recopilación de referencias bibliográficas

| Ref. | Variedad taxonómica | | Composición mayoritaria | | | | | | | | Observación / |
|------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|------|------------------------------|------|--------------------|------|------------------------------|------|---|
| | Hojas | Corteza | Compuesto | % | Compuesto | % | Compuesto | % | Compuesto | % | Localización y método de extracción |
| [1] | <i>Citrus hystrix</i> | - | Citronelal | 66,9 | Citronelol | 1,8 | Sabineno | 0,2 | (E)-2,5-Dimetil-1,6-octadina | 0,1 | Selangor (Malasia). Por hidroddestilación. |
| | | | β-Citronelol | 6,6 | Geraniol | 0,4 | β-Mirceno | 0,1 | | | |
| | | | Linalol | 3,9 | (Z)-2,6-Dimetil-2,6-octadina | 0,3 | Nerolidol | 0,1 | | | |
| [2] | <i>Citrus micrantha</i> | - | Citronelal | 76,1 | Linalol | 1,2 | (E, E)-α-Farneseno | 0,8 | δ-Elemeno | 0,3 | San Ghjulianu, Corsica, (Francia). Por hidroddestilación. |
| | | | Acetato de citronelilo | 5,1 | Geraniol | 1,2 | (E)-β-Ocimeno | 0,6 | Germacreno D | 0,2 | |
| | | | Citronelol | 4,4 | Isopulegol | 0,9 | β-Elemeno | 0,5 | Limoneno | 0,1 | |
| | | | Acetato de geraniolo | 2,9 | (E)-β-Cariofileno | 0,8 | Germacreno B | 0,5 | | | |
| [3] | <i>Citrus maxima</i> (Burm.) | - | Citronelol | 28,3 | α-Cadinol | 2,5 | β-Elemeno | 0,7 | | | Kanara, Karnataka (India). Por hidroddestilación |
| | | | β-Cariofileno | 16,9 | α-Cariofileno | 2,5 | 4-Terpeneol | 0,2 | | | |
| | | | (-)-Espatuleno | 9,3 | Humuleno | 1,0 | | | | | |
| | | | τ-Cadinol | 3,2 | α-Bergamopteno | 0,7 | | | | | |
| [4] | - | <i>Citrus hystrix</i> | β-Pineno | 23,5 | β-Citronelol | 3,3 | β-Bisaboleno | 1,2 | Nerolidol | 0,2 | Jerangau, Terengganu (Malasia). Por extracción Likens-Nikerson. |
| | | | Sabinene | 20 | Linalol | 1,8 | β-Mirceno | 1 | Guaiol | 0,1 | |
| | | | Citronelal | 12,6 | α-Pineno | 1,7 | δ-Cadineno | 0,6 | Óxido de cariofileno | 0,1 | |
| | | | Limoneno | 11,8 | Acetato de citronelilo | 1,7 | iso-Pulegol | 0,5 | | | |
| [5] | - | <i>Citrus micrantha</i> | β-Pineno | 33,4 | Acetato de citronelilo | 3,1 | Isopulegol | 1,5 | Geraniol | 1 | San Ghjulianu, Corsica, (Francia). Por hidroddestilación. |
| | | | Limoneno | 20,7 | α-Pineno | 2,4 | Citronelal | 1,5 | ρ-Mirceno | 0,8 | |
| | | | Citronelol | 6,8 | Linalol | 2,2 | Terpinoleno | 1,1 | α-Terpineno | 0,4 | |
| | | | α-Terpeneol | 6,6 | Acetato de geraniolo | 2,1 | Sabineno | 1 | (E)-β-Ocimeno | 0,4 | |
| | | | Terpine-4-ol | 3,8 | (E-E)-α-Farneseno | 1,7 | Mirceno | 1 | δ-Cadineno | 0,3 | |
| [6] | - | <i>Citrus macroptera</i> | Limoneno | 53,8 | β-Pineno | 3,9 | ρ-Cimeno | 1,1 | α-Terpeneol | 0,4 | San Ghjulianu, Corsica, (Francia). Por hidroddestilación. |
| | | | Sabinene | 12,4 | Mirceno | 2,1 | γ-Terpineno | 1 | α-Copaeno | 0,4 | |
| | | | Linalol | 11,8 | (E)-β-Cariofileno | 1,7 | δ-Cadineno | 0,5 | β-Elemeno | 0,4 | |
| | | | Terpine-4-ol | 4,3 | α-Pineno | 1,3 | β-Felandreno | 0,5 | α-Terpineno | 0,3 | |
| [7] | - | <i>Citrus macrophylla</i> | Limoneno | 81,4 | Mirceno | 1,6 | (E)-β-Ocimeno | 0,8 | Germacreno D | 0,6 | San Ghjulianu, Corsica, (Francia). Por hidroddestilación. |
| | | | γ-Terpineno | 5 | α-Pineno | 1 | β-Pineno | 0,6 | Neral | 0,5 | |
| | | | ρ-Cimeno | 2,6 | β-Bisaboleno | 0,9 | Geraniol | 0,6 | α-Tujeno | 0,3 | |
| [8] | - | <i>Citrus sphaerocarpa</i> | Limoneno | 75,5 | (6E)-β-Farneseno | 0,31 | β-Cariofileno | 0,26 | α-Copaeno | 0,13 | Kochi , Shikoku (Japón). Extracción con disolventes. |
| | | | Mirceno | 17,7 | Decanal | 0,28 | β-Pineno | 0,25 | Linalol | 0,13 | |
| | | | γ-Terpineno | 2,9 | β-Felandreno | 0,26 | Sabineno | 0,13 | ρ-Cimeno | 0,1 | |
| | | | α-Pineno | 0,7 | Octanal | 0,26 | Terpinoleno | 0,13 | | | |
| [9] | - | <i>Citrus sudachi</i> | Limoneno | 63,9 | (E-E)-α-Farneseno | 1,9 | α-Felandreno | 0,9 | Sabineno | 0,5 | Kochi , Shikoku (Japón). Extracción con disolventes. |
| | | | β-Felandreno | 8,3 | ρ-Cimeno | 1,7 | β-Elemeno | 0,8 | β-Pineno | 0,5 | |
| | | | γ-Terpineno | 5 | Mirceno | 1,6 | Germacreno D | 0,8 | Terpinoleno | 0,3 | |
| | | | Linalol | 2,4 | α-Pineno | 1,5 | (E)-β-Ocimeno | 0,7 | Octanal | 0,1 | |

Referencias de los LRI considerados

- [1] y [4] MD OTHMAN, S., HASSAN, M., NAHAR, L., BASAR, N., JAMIL, S., & SARKER, S. (2016). "Essential Oils from the Malaysian Citrus (*Rutaceae*) Medicinal Plants" en *Medicines*, vol. 3(2), 13. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines3020013> [Consulta: 7 de abril de 2023].
- [2], [5], [6] y [7] BACCATI, C., GIBERNAU, M., PAOLI, M., OLLITRAULT, P., TOMI, F., & LURO, F. (2021) "Chemical Variability of Peel and Leaf Essential Oils in the Citrus Subgenus *Papeda* (Swingle) and Few Relatives." en *Plants* 2021, vol. 10, 1117. <https://doi.org/10.3390/plants10061117>
- [3] PRASAD, A., PRASAD B. R., PRASAD D. K., SHETTY, P., KUMAR S. (2016) "GC-MS Compositional Analysis of Essential Oil of Leaf and Fruit Rind of Citrus maxima (Burm.) Merr. from Coastal Karnataka, India" en *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 6 (5), p. 68-72. https://www.researchgate.net/publication/303737924_GC-MS_Compositional_Analysis_of_Essential_Oil_of_Leaf_and_Fruit_Rind_of_Citrus_maxima_Burm_Merr_from_Coastal_Karnataka_India
- [8] y [9] TOMIYAMA, K., AOKI, H., OIKAWA, T., SAKURAI, K., KASAHARA, Y., & KAWAKAMI, Y. (2012) "Characteristic volatile components of Japanese sour citrus fruit: Yuzu, Sudachi and Kabosu" en *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 27 (5), p. 341-355. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.3104>> [Consulta: 5 de mayo de 2023]

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En primera instancia, lo que se puede advertir de las tablas de resultados, es que existe una diferencia significativa entre la composición de los aceites esenciales de las distintas papedas en los análisis del pericarpio, en cambio son más similares los resultados en los de hojas.

Respecto a los análisis del **pericarpio** se observa que la papeda con el menor porcentaje de área identificada ha sido *C. micrantha* con un 88,1 % y la que más *C. macroptera* con un 98,6%. El grupo de compuestos que se presentan en mayor cantidad son los hidrocarburos monoterpénicos (48,7 % - 98,1%). Estos compuestos son interesantes porque entre otras propiedades, han mostrado un gran potencial como agentes antiinflamatorios, aromatizantes o saborizantes como es el caso del limoneno, que a excepción de *C. macroptera* está presente en el resto de papedas en altas cantidades (8,3 % - 73,3%). También se observan pinenos, interesantes por sus propiedades fungicidas, además de ser usados para producir aromas e insecticidas naturales. Otro monoterpeno importante en estos resultados ha sido el mirceno que aparece en todas las variedades menos en *C. macrophylla*, y es ampliamente usado en cosméticos, jabones, detergentes o como aditivos en alimentos y bebidas, además de usarse como producto intermedio para generar alcoholes monoterpénicos como el geraniol, nerol o linalol los cuales a su vez sirven para la producción de aromatizantes y forman parte de los monoterpenos oxigenados. El siguiente grupo de compuestos mayoritarios son los anteriormente mencionados monoterpenos oxigenados que en el caso de *C. hystrix* representan un 20 %, en *C. micrantha* un 34,9 % y *C. macroptera* un 0,6 %. Para Kabosu, *C. macrophylla* y *C. sudachi* el segundo grupo más importante son los sesquiterpenos (1,4 %, 5,7 % y 16,3 %, respectivamente), grupo relevante por sus propiedades aromáticas y sus efectos cosméticos, medicinales y antimicrobianos, en el que se pueden encontrar compuestos como el bisaboleno, farneseno, germacreno o cariofileno en diferentes proporciones.

Las diferencias de composición de los aceites en el pericarpio de las papedas se pueden deber a factores genéticos, puesto que las plantas de donde se obtuvieron las muestras están cultivadas en las mismas condiciones físicas y en el mismo terreno. Los compuestos mayoritarios en porcentaje de los aceites esenciales del pericarpio de cada una de las papedas fueron los que se muestran en la tabla 5, donde se aprecia que los que más se repiten han sido los hidrocarburos limoneno, γ -terpineno y sabineno.

Tabla 5: Compuestos mayoritarios en porcentaje. Estudio de pericarpio (porcentajes >2%).

| | <i>C. Hystrix</i> | <i>Kabosu</i> | <i>C. micrantha</i> | <i>C. macrophylla</i> | <i>C. macroptera</i> | <i>C. sudachi</i> | | | | | |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|----------------------|---------------------|------|-----------------------|------|---------------------|------|
| β -Pino | 27 | Limoneno | 73,3 | (E)-Iso-Limoneno | 32,6 | Limoneno | 69,6 | (Z)- β -Ocimeno | 86,8 | Limoneno | 66,4 |
| Sabineno | 20,6 | Mirceno | 18,3 | Iso-Pulegol | 27 | γ -Terpineno | 9,6 | Sabineno | 6,5 | γ -Terpineno | 8,3 |
| Limoneno | 15,8 | γ -Terpineno | 2,1 | Limoneno | 8,3 | | | | | α -Farneseno | 3,6 |
| Citronelal | 15,1 | | | Sabineno | 4,8 | | | | | Germacreno B | 2,7 |
| Oxiceudanin | 8 | | | Acetato de geraniol | 3 | | | | | β -Elemeno | 2,6 |
| α -Pino | 2,2 | | | Acetato de citronelilo | 2,6 | | | | | δ -Elemeno | 2,5 |

En el caso de los análisis en **hojas**, hay más similitud en las composiciones, pero los porcentajes de áreas totales identificadas son más bajos, siendo *C. hystrix* la muestra que presenta el menor porcentaje con un 72,1 % y el pummelo Chandler la que presenta el mayor con un 79,8 %. Los hidrocarburos monoterpénicos se presentan en una cantidad importante,

sobre todo en el pummelo (63,3%) a excepción de la *C. micrantha* que contiene un 22,1 %, un valor parecido al de *C. hystrix* con un 28%, donde el compuesto que sobresale sigue siendo el limoneno (53,6 % - 18,6 %). Los monoterpenos oxigenados destacan más en *C. micrantha* (40,1 %) siendo el citronelal, un compuesto con la propiedad de repeler insectos y con fuerte actividad antifúngica, el mayoritario y presente en un 31,4 %. Los sesquiterpenos se encuentra en una cantidad considerable (1,5 % - 5,3 %) pero no tanto como los hidrocarburos alifáticos (1,6 % - 7,3%) o las cumarinas y otros compuestos (3,4 % - 7,6 %), en este último sobre todo predomina la oleamida (2,6 % - 4,1 %) compuesto considerado como tratamiento potencial para los trastornos del ánimo y sueño, además de tener una variedad de usos industriales como agente deslizante, lubricante e inhibidor de corrosión.

Muchos hidrocarburos monoterpénicos, por no decir la mayoría, que se aprecian en las papedas *hystrix* y *micrantha* también se encuentran en el pummelo como los pinenos, limoneno o p-cimeno. Las pocas diferencias que se pueden observar son por ejemplo en los porcentajes de limoneno pues para pummelo es más alto (53,6 %) que para papedas (*C. hystrix* 23,9 % y *C. micrantha* 18,6 %). Con el citronelal ocurre lo contrario, para pummelo 0,1 % mientras que para *C. hystrix* 15,3 % y *C. micrantha* 31,4 %. De igual manera, el pummelo presenta menos sesquiterpenos que las papedas como son farneseno, cadineno o bisaboleno, así como tampoco se ven muchos monoterpenos oxigenados. Es importante destacar el mayor contenido de monoterpenos oxigenados en las papedas, especialmente el citronelal, por sus propiedades antimicrobianas y aromáticas características, así como por su agradable olor dulce y afrutado,

Los componentes con un alto porcentaje presentes en estas papedas y pummelo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Compuestos mayoritarios en porcentaje. Estudio de hojas (porcentajes >2%).

| <i>C. Hystrix</i> | | <i>C. micrantha</i> | | <i>Pummelo Chandler</i> | |
|---------------------|------|-------------------------------|------|-------------------------|------|
| Limoneno | 23,9 | Citronelal | 31,4 | Limoneno | 53,6 |
| Citronelal | 15,3 | Limoneno | 18,6 | Oleamida | 4,1 |
| Oleamida | 4 | Citronelol | 2,6 | Ácido hexadecanoico | 3,7 |
| Octadecanamida | 3,5 | Oleamida | 2,6 | Tetracosano | 2,2 |
| Ácido hexadecanoico | 3,1 | Acetato de citronelilo | 2,3 | | |
| Hexacosano | 3 | (E)-(E)- α - Farneseno | 2,2 | | |

En hojas se ve claramente la diferencia entre papedas y pummelo, pues en papedas destacan en menor medida los hidrocarburos monoterpénicos con una media de un 20%, mientras que en el Pummelo Chandler aparece en un 53,6 % siendo el limoneno el principal y único hidrocarburo en todos los casos.

Así pues, atendiendo a los resultados de hojas, con los que se ha podido comparar papedas con pummelo se puede decir que *C. hystrix* es más similar al pummelo Chandler debido a la coincidencia de más compuestos y en unas cantidades más o menos parecidas, aunque no está demás apuntar que *C. micrantha* no se aleja mucho de la similitud.

Buscando **compuestos en común**, se puede ver que en todas las variedades de papedas estudiadas en el análisis del pericarpio se encuentran el hidrocarburo monoterpénico sabineno, y los sesquiterpenos β -cubebeno y γ -cadineno, aunque las cantidades de sabineno

varían significativamente. Por otro lado, las hojas de las papedas estudiadas en comparación con las del pummelo Chandler contienen una cantidad considerable de compuestos similares con alguna pequeña diferencia en los porcentajes, todo lo cual se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7: Compuestos comunes.

| PERICARPIO | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|-------------------|--------|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
| | Compuestos | C. <i>hystrix</i> | Kabosu | C. <i>micrantha</i> | C. <i>macrophylla</i> | C. <i>macroptera</i> | C. <i>sudachi</i> |
| Hidrocarburos monoterpénicos | Sabineno | 20,6 | 0,1 | 4,8 | 0,1 | 6,5 | 0,3 |
| Sesquiterpenos | β-Cubebeno | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,0 | 0,2 |
| | γ-Cadineno | 0,8 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,1 |
| HOJAS | | | | | | | |
| | Compuestos | C. <i>hystrix</i> | | C. <i>micrantha</i> | | Pummelo Chandler | |
| Hidrocarburos monoterpénicos | α-Pineno | 0,1 | | 0,1 | | 0,3 | |
| | Sabineno | 0,4 | | 0,4 | | 1,1 | |
| | β-Pineno | 0,4 | | 0,5 | | 1,5 | |
| | Mirceno | 0,6 | | 0,6 | | 1,3 | |
| | p-Cimeno | 1,5 | | 1,2 | | 3,3 | |
| | D-Limoneno | 23,9 | | 18,6 | | 53,6 | |
| | γ-Terpineno | 0,8 | | 0,5 | | 1,5 | |
| | Terpinoleno | 0,3 | | 0,2 | | 0,5 | |
| Monoterpenos oxigenados | Octanoato de metio | 0,6 | | 0,4 | | 0,8 | |
| | Citronelal | 15,3 | | 31,4 | | 0,1 | |
| Sesquiterpenos | (E)-β-Cariofileno | 1,6 | | 0,9 | | 0,4 | |
| | Valenceno | 0,8 | | 0,3 | | 1 | |
| Ácidos grasos | Ácido ftálico | 0,9 | | 0,8 | | 0,3 | |
| | Ácido hexadecanoico | 3,1 | | 2,1 | | 3,7 | |
| | Ácido α-Linoleico | 1,1 | | 0,7 | | 0,5 | |
| Cumarinas y otros compuestos | Hexadecanamida | 0,0 | | 0,3 | | 0,3 | |
| | Oleamida | 4 | | 2,6 | | 4,1 | |
| Hidrocarburos alifáticos | Tetracosano | 1,4 | | 0,2 | | 2,2 | |
| | Hexacosano | 3 | | 0,1 | | 0,0 | |
| | Octacosano | 0,8 | | 0,4 | | 0,1 | |
| | Nonacosano | 0,9 | | 0,4 | | 0,0 | |

Por otro lado, comparando los datos obtenidos con datos de **otros estudios recopilados** en la tabla 4, se observa que la similitud de los componentes presentes no es muy alta.

Prestando atención a los tres primeros compuestos mayoritarios de cada variedad estudiada, se puede decir que en pericarpio para *C. hystrix* hay coincidencia con los dos compuestos principales (β-pineno y sabineno), para *C. macrophylla* coinciden de igual manera los dos primeros (limoneno y γ-terpineno) y para Kabosu coinciden los tres principales (limoneno, mirceno y γ-terpineno). En cambio, para el resto de las variedades no hay tantas coincidencias. Teniendo en cuenta que en los estudios recogidos para *C. hystrix* se usó extracción Likens-Nikerson (Md Othman et. al., 2016), en Kabosu se aplicó un método de extracción con disolventes (Tomiyama et. al., 2012) y en los otros casos se empleó hidrodestilación, y que en el presente estudio se ha usado extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico, hace pensar que posiblemente el tipo de método de extracción empleado sea una de las razones de las diferencias/similitudes encontradas.

Tabla 8: Comparación con datos bibliográficos. Estudio pericarpio.

| | Datos experimentales | | Datos bibliográficos | |
|-------------------|----------------------|------|----------------------|------|
| C. hystrix | β-Pineno | 27 | β-Pineno | 23,5 |
| | Sabineno | 20,6 | Sabineno | 20 |
| | Limoneno | 15,8 | Citronelal | 12,6 |
| Kabosu | Limoneno | 73,3 | Limoneno | 75,5 |
| | Mirceno | 18,3 | Mirceno | 17,8 |

| | | | | |
|-----------------------|-----------------------|------|---------------------|------|
| C. micrantha | γ -Terpineno | 2,1 | γ -Terpineno | 2,9 |
| | (E)-Iso-Limoneno | 32,6 | β -Pino | 33,4 |
| | Iso-Pulegol | 27 | Limoneno | 20,7 |
| | Limoneno | 8,3 | Citronelol | 6,8 |
| C. macrophylla | Limoneno | 69,6 | Limoneno | 81,4 |
| | γ -Terpineno | 9,6 | γ -Terpineno | 5 |
| | Germacreno D | 1,6 | p -Cimeno | 2,6 |
| C. macroptera | (E)- β -Ocimeno | 86,8 | Limoneno | 53,8 |
| | Sabineno | 6,5 | Sabineno | 12,4 |
| | Mirceno | 1,9 | Linalol | 11,8 |
| C. Sudachi | Limoneno | 66,4 | Limoneno | 63,9 |
| | γ -Terpineno | 8,3 | β -Felandreno | 8,3 |
| | δ -Elemeno | 2,5 | γ -Terpineno | 5 |

En el caso de las hojas no hay coincidencia de los datos recogidos experimentalmente con los datos recopilados de los otros estudios. Esto también puede deberse al tipo de método de extracción de los aceites esenciales, pues los otros estudios se hicieron con hidrodestilación, pero no hay que descartar el efecto que las condiciones climáticas y de cultivo de las muestras pueda tener en la composición de los aceites esenciales de hojas.

Tabla 9: Comparación con datos bibliográficos. Estudio hojas.

| | | Datos experimentales | Datos bibliográficos | |
|---------------------|---------------------|----------------------|------------------------|------|
| C. hystrix | Limoneno | 23,9 | Citronelal | 66,9 |
| | Citronelal | 15,3 | β -Citronelol | 6,6 |
| | Oleamida | 4 | Linalol | 3,9 |
| C. micrantha | Citronelal | 31,4 | Citronelal | 76,1 |
| | Limoneno | 18,6 | Acetato de citronelilo | 5,1 |
| | β -Citronelol | 2,6 | β -Citronelol | 4,4 |
| Pummelo | Limoneno | 53,6 | β -Citronelol | 28,3 |
| | Oleamida | 4,1 | β -Cariofileno | 16,9 |
| | Ácido hexadecanoico | 3,7 | Espatulenol | 9,3 |
| | | | | |

También es importante hacer referencia al total identificado en función de la metodología de extracción empleada. Tras los análisis de los aceites esenciales en pericarpio y hojas de las seis papedas y pummelo mediante cromatografía de gases con detector por espectroscopía de masas (MS) y detector de ionización de llama (FID) se han detectado en el pericarpio de *C. hystrix* un 93,6 % del área total, en *C. sphaerocarpa* (Kabosu) un 96,8 %, en *C. micrantha* un 88,1 %, en *C. macrophylla* un 92,7 %, en *C. macroptera* un 98,6 % y en *C. sudachi* un 94,6 %. En el caso de hojas los porcentajes identificados son más bajos, donde en *C. hystrix* se detectaron el 72,1 % del área total, en *C. micrantha* el 78,9 % y del pummelo Chandler *C. maxima* el 79,8 %.

La razón de las diferencias entre las áreas totales identificadas se debe a que, si las hojas hubieran sido destiladas con el aparato Clevenger o si la cutícula se hubiera eliminado tratando previamente las hojas con éter y destilando después, se hubieran obtenido cromatogramas típicos de los aceites esenciales con LRI de hasta, más o menos, 2000. Al llevar a cabo la extracción sólido-líquido se recuperan muchos compuestos de masa molecular más elevada, que no estarían aplicando destilación, pero que son compuestos de interés. En contra partida en el extracto se encuentran compuestos que no son detectados por el cromatógrafo usado en los análisis (se ha usado la técnica de cromatografía de gas, que no tiene tanta eficacia en muestras líquidas como la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC), por esto los totales identificados pueden ser bajos.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se han llegado en este trabajo se pueden resumir en los siguientes cinco puntos:

1. En cuanto a la proporción total de compuestos identificados se ha observado una clara diferencia entre el pericarpio (88,1 % - 98,6%) y las hojas (72,1% - 79,8%). La explicación más razonable de esta diferencia es la presencia en la cutícula de las hojas de compuestos de elevada masa molecular que siendo extraídos con la metodología utilizada son más difíciles de detectar por cromatografía de gases.

2. La composición de los aceites esenciales analizados, tanto en pericarpio como en hojas, muestra la presencia de compuestos de potencial interés en cuanto a sus diversas formas de actividad biológica, principalmente en la fracción monoterpénica, tanto hidrocarbonada como oxigenada. Ello es de particular interés si se tiene en cuenta que se trata generalmente de compuestos valiosos desde el punto de vista sensorial. Actualmente todas estas aplicaciones están siendo estudiadas en ciertas investigaciones con la ayuda de la nanotecnología, mediante el microencapsulado/nanoencapsulado de compuestos.

Desde la perspectiva de aplicación práctica, en todas las variedades de pericarpio se observó la presencia de un alto contenido en hidrocarburos monoterpénicos y oxigenados, alrededor de un 60% de media, los cuales poseen propiedades antibióticas y aromáticas (esta última se da especialmente en los alcoholes monoterpénicos como el citronelol o geraniol). Dichas propiedades pueden servir para la industria alimentaria como conservantes naturales en alimentos y cosméticos, y aditivos y potenciadores de sabor en la industria de bebidas gaseosas, lácteas o alcohólicas. Sin embargo, pese a la elevada versatilidad y la potencialidad de su actividad biológica, su baja solubilidad, alta volatilidad y su sensibilidad a la luz, temperatura y concentración de oxígeno limitan la exploración de sus beneficios, lo cual hace necesaria la búsqueda de nuevos modos de aplicación como los ya citados, basados en la nanotecnología.

3. Las diferencias entre papedas y pummelo son también un aspecto de interés, sobre todo por la mayor presencia de monoterpenos oxigenados en pummelo frente a los hidrocarburos monoterpénicos en las papedas, con elevadas concentraciones de compuestos como el citronelal, interesante por sus propiedades sensoriales y su reconocida actividad antimicrobiana.

4. La extracción sólido-líquido mediante la metodología introducida en este trabajo, basada en el empleo de la mezcla hexano-diclorometano, ha permitido la extracción e identificación de numerosos compuestos de interés no detectados ni cuantificados en anteriores trabajos basados en la aplicación de métodos de hidrodestilación. Esto ha sido posible, a pesar de la muy escasa bibliografía específica relativa a las especies estudiadas, por la posibilidad de utilizar la instrumentación analítica del Centro de Ecología Química Agrícola (CEQA) que ha puesto al servicio de esta investigación un detector de GC/MS de muy buena calidad que ha permitido ampliar la identificación hasta compuestos de índice de retención muy elevado.

Cabe destacar la importancia del método de extracción usado en este estudio, pues a diferencia de los resultados que dan investigaciones basadas en la hidrodestilación, se ha podido incorporar a los datos los componentes de la cutícula (alcanos, aldehídos y alcoholes alifáticos de cadena larga, ácidos grasos o amidas) así como cumarinas, psoralenos y flavonoides.

5. Es necesario resaltar también la relevancia y utilidad de instituciones como Todolí Citrus Fundació, por la posibilidad de disponer de taxones bien identificados, procedentes de todo el mundo, siendo un punto de partida y motor imprescindible en el desarrollo de la citricultura valenciana.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy*. 4.1ª edición. Carol Stream, IL.: Allured Pub. Corporation.
- AGUSTÍ, M. y FONFRÍA, M. A (2010) *Fruticultura*. Madrid: Ed. Mundi-Prensa.
- AGUSTÍ, M., MESEJO, C. y REIG VALOR, C. (2020). *Citricultura*. 3ª edición. Madrid: Ed. Mundi-Prensa.
- ANCILLO, G. & MEDINA, A. (2015). “Los cítricos” en *Monografías Botánicas*. València: Universitat de València.
- AUMEERUDDY-ELALFI, Z., LALL, N., FIBRICH, B., VAN STADEN, A. B., HOSENALLY, M., & MAHOMOODALLY, M. F. (2018). “Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro.” en *Journal of food and drug analysis*, vol. 26, p. 232–243.
- BAKER, F.S., MILLER, C. E., REPIK, A. J., TOLLES, E. D. (2003). “Activated carbon” en *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (Ed.)
<<https://doi.org/10.1002/0471238961.0103200902011105.a01.pub2>> [Consulta: 17 de mayo de 2023]
- BANDONI, A. L., RETTA, D., Di LEO LIRA, P. M., y BAREN, C. M. (2009). “¿Son realmente útiles los aceites esenciales?” en *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), p. 317-322.
- BERHOW, M., FONG C. Y HASEGAWA S. (1996). “Limonoid and flavonoid composition in varieties of Papeda and Papedocitrus” en *Biochemical systematics and ecology*, vol. 24 (3), p. 237-242.
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305197895001093>> [Consulta: 2 de septiembre de 2022]
- BONELLS, J. (2017) “Los cítricos ornamentales en Europa y América” en *Jardines sin fronteras*.
<<https://jardinessinfronteras.com/2017/10/18/los-citricos-ornamentales-en-europa-y-america/#:~:text=Los%20Citrus%20es%20un%20g%C3%A9nero,%2C%20pomelos%2C%20pomelo%20y%20limas.>> [Consulta: 11 de septiembre de 2022].
- ETTRE, L.S. y HINSHAW, J.V. (1993). *Basic Relationships of Gas Chromatography*, Cáp. 4, 1st ed. Cleveland: Advanstar Data. <<https://doi.org/10.1002/jhrc.1240180310>> [Consulta: 17 de mayo de 2023]

- FEDERICI, C., FANG, D., SCORA, R. y ROOSE, M. (1998) "Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD análisis" en *Theoretical and Applied Genetics* 96: 812-822
- FILIPPÍN, A., LUNA, N., POZZI, M., PÉREZ, J. (2017) "Obtención y caracterización de carbón activado a partir de residuos olivícolas y oleícolas por activación física" en *Avances en Ciencias e Ingeniería* 2017, vol. 8 (3), p. 59-71
<<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323652916007>> [Consulta 17 de septiembre de 2022].
- GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTINEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M. VIVANCO, F. Eds. (1996). *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.
- GONZÁLEZ-MAS, M. C., RAMBLA, J. L., LÓPEZ-GRESA, M. P., BLÁZQUEZ, M.A., Y GRANELL, A. (2019). "Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review" en *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00012> [Consulta: 8 de enero de 2023]
- GRANT, B. (2018) "¿Qué son las Papedas? Identificación y cultivo de frutos de Papeda" en *Gardening*. <<https://www.diversegarden.com/edible/fruits/citrus/papeda-citrus-trees.htm>> [Consulta: 22 de abril de 2022].
- IBANEZ, V., GARCÍA USACH, A., CARBONELL CABALLERO, J., ALONSO, R., TEROL, J., DOPAZO, J. y TALÓN, M. (2015). *El origen de las especies cultivadas de cítricos*. Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos, (426), p. 74-79.
- IRITI, M.Y FAORO, F. (2009). "Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution" en *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10 (8), pp 3371- 3399. <<https://doi.org/10.3390/ijms10083371>> [Consulta: 12 de febrero de 2023]
- KUPAEI, M. A., & GARMAKHANY, A. D. (2014). "Effect of microencapsulated essential oils on the storage life of mango fruit (*Mangifera indica*. L, cv Chaunsa)" en *Minerva biotecnologica*, vol. 26, p. 49–55.
- LLORENS-MOLINA J. A. (2021). "Los aceites esenciales y su actividad biológica. Una propuesta didáctica." en *Anales de la química de la RSEQ*, vol. 117 (2), p. 165-170.
- LLORENS-MOLINA, J. A. (2016). *Composición química de los aceites esenciales. Material docente*. Valencia: Universitat Politècnica de València,
<<https://riunet.upv.es/handle/10251/65075>> [Consulta: 22 de abril de 2022].

- LÓPEZ LUEGON, M. (2004). "Los aceites esenciales" en *Offarm*, vol. 23 (7), p. 88-91.
<<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>> [Consulta: 22 de abril de 2022]
- MARÍN BELTRÁN, M. (2014). *Aplicació de la tècnica d'extracció de Likens-Nickerson (SDE) a productes naturals: poma Fuji i poma Golden*. Trabajo final del grado. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya.
<<http://upcommons.upc.edu/pfc/handle/2099.1/21979>> [Consulta: 19 de mayo de 2023]
- MARTÍNEZ, A. (2003). *Aceites esenciales*. Profesor de la facultad de química farmacéutica. Material docente. Medellín: Universidad de Antioquia.
- MINER, K., & BAUER, W. (2016). "Consumer Acceptability of Lemon Essential Oil as a Lemon Juice Substitute or Flavor Enhancer: A Pilot Study" en *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, vol. 116, A46. <<https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.06.151>>
- MIRMOSTAFEE, S., AZIZI, M., & FUJII, Y. (2020). "Study of Allelopathic Interaction of Essential Oils from Medicinal and Aromatic Plants on Seed Germination and Seedling Growth of Lettuce." *Agronomy*, vol. 10 (2), 163. <<https://doi.org/10.3390/agronomy10020163>>
- MONTALT RESURRECCIÓN R. (2009). *Partenocarpia en cítricos. Estudio preliminar para la caracterización del banco de germoplasma de cítricos del IVIA*. Tesis de máster. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- NEGRE-ZAKHAROV F., LONG M.C., y DUDAREVA N. (2009). "Floral scents and fruit aromas inspired by nature" en *Osborn A.E. and Lanzotti*, vol. 258 (eds.). Plant-derived natural products: synthesis, function, and application. US: Springer, p: 405-431.
- PEÑUELAS, J. (2004). "Plant VOC emissions: making use of the unavoidable" en *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 19 (8), pp. 402-404.
<<https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.06.002>> [Consulta: 12 de enero de 2023].
- PERIS RODRIGO J. (2020) *Ecología de los terpenos volátiles de la piel de la naranja: Comunicación planta-frugívoro*. Tesis doctoral. Valencia: Universitat Politècnica de València. <<https://riunet.upv.es/handle/10251/135827>> [Consulta: 16 de diciembre de 2022].
- RUIZ RICO, M. (2019) *Aceites esenciales, ¿una alternativa a los conservantes artificiales en alimentos?* Valencia: Universitat Politècnica de València,
<<https://theconversation.com/aceites-esenciales-una-alternativa-a-los-conservantes-artificiales-en-alimentos-124667>> [Consulta: 23 de abril de 2022].

- RUIZ, M. (2016). *Identificación de caracteres fisiológicos y moleculares para la tolerancia a estreses abióticos en portainjertos de cítricos tetraploides*. Tesis de Doctorado. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 285 p.
- SGARIGLIA, M. A., SOBERÓN, J. R., SAMPIETRO, D. A. y VATTUONE M.A (2010) “Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones” en *Revista Arakuku*, vol. 2 (1), p. 1-6.
<https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655_a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?Sequence=2&isallowed=y> [Consulta: 17 de mayo de 2023]
- SHARMEEN JUGREET B., SHANOO SUROOWAN, KANNAN RENGASAMY R.R., FAWZI MAHOMOODALLY M. (2020) “Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils” en *Trends in Food Science & Technology*, vol. 101 (2020), p. 89-105. < <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025>> [Consulta: 21 de junio de 2023]
- TALÓN, M., CARUSO, M. Y GMITTER, F.G. JR. (2020) *The Genus Citrus*. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing.
- TOMIYAMA, K., AOKI, H., OIKAWA, T., SAKURAI, K., KASAHARA, Y. y KAWAKAMI, Y. (2012) “Characteristic volatile components of Japanese sour citrus fruit: Yuzu, Sudachi and Kabosu” en *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 27 (5), p. 341-355.
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.3104>> [Consulta: 5 de mayo de 2023]
- TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S., & PRODPRAN, T. (2012). “Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils” en *Food Chemistry*, vol. 134, p. 1571–1579.
- VEKEY, K. (2001). “Mass spectrometry and mass-selective detection in gas chromatography” en *Journal of Chromatography A*, vol. 921 (2), pp. 227-236.
<[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00825-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00825-1)> [Consulta: 19 de mayo de 2023]
- VISAKH, N.U., PATHROSE, B., NARAYANANKUTTY. A., ALFARHAN, A. Y RAMESH, V. (2022). “Utilization of Pomelo (*Citrus maxima*) peel waste into bioactive essential oils: Chemical composition and insecticidal properties” en *Insects 2022*, vol. 13 (5), p. 480.
<https://www.mdpi.com/2075-4450/13/5/480> [Consulta: 5 de mayo de 2023].
- WU, G., TEROL, J., IBANEZ, V. et al. (2018) “Genomics of the origin and evolution of Citrus” en *Nature* 554, p. 311–316. <<https://www.nature.com/articles/nature25447>> [Consulta: 18 de marzo de 2023]