

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Análisis no dirigido del aceite esencial de las variedades de mandarino Clemenules y Clemenpons

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

ALUMNA: **María Luisa Gómez Torrente**

TUTORA ACADÉMICA: Dra. M^a Pilar López Gresa
TUTORES EXTERNOS: Dra. M^a Carmen González Mas
Ing. José Luis Rambla Nebot

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, Junio 2015



Datos personales

Nombre y Apellidos: María Luisa Gómez Torrente

Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFG:	Análisis no dirigido del aceite esencial de las variedades de mandarino Clemenules y Clemenpons
Titulación:	Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural
Lugar de realización:	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.
Tutora:	M ^a Pilar López Gresa
Tutores externos:	M ^a Carmen González Mas José Luis Rambla Nebot

Resumen

Los frutos de las variedades de clementinas Clemenules y Clemenpons, ambas de gran interés comercial, son morfológicamente indistinguibles, ya que son muy semejantes en cuanto al tamaño, peso, diámetro, relación diámetro/altura, tamaño de la corteza, color, porcentaje de zumo y ausencia de semillas. Su periodo de cosecha también es muy similar, aunque la variedad Clemenpons es un poco más temprana.

El presente trabajo se centró en el estudio metabólico de los compuestos volátiles que integran el aceite esencial del flavedo de los frutos de estas dos variedades, con el objetivo de intentar identificar diferencias entre ambos aceites que permitieran distinguir ambos tipos de frutos.

La extracción de los aceites de ambas variedades se realizó mediante el sistema de destilación Clevenger, a partir de muestras recogidas durante todo el periodo de campaña, en dos campañas diferentes y en dos parcelas independientes. Posteriormente estos aceites se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A continuación se realizó un análisis no dirigido de todos los compuestos volátiles detectados en los cromatogramas y estudios estadísticos multivariantes (PCA y PLS-DA) de todos los datos obtenidos, que permitieron detectar diferencias cuantitativas entre los perfiles volátiles de ambas variedades, es decir, ambos tipos de aceite mostraron los mismos compuestos pero no en la misma concentración.

Finalmente se procedió a intentar identificar los compuestos volátiles responsables de estas diferencias, mediante el estudio de sus espectros de masas así como de sus propiedades cromatográficas (tiempo de retención). Quince compuestos, todos ellos de tipo terpénico, se encontraron en mayor concentración en el flavedo de frutos de la variedad Clemenpons que en el de los frutos de la variedad Clemenules. Diez de ellos eran monoterpenos (C₁₀), tres de ellos hidrocarbonados (3-careno, α -terpineno y γ -terpineno), y los siete restantes oxigenados, de los cuales solo se identificaron sin ambigüedad el *trans*-carveol y el acetato de α -terpinilo. Los cinco compuestos restantes resultaron ser sesquiterpenos (C₁₅), entre ellos el α -

humuleno y el α -sinensal. A su vez, el aceite esencial de la variedad Clemenules resultó más rico en compuestos alifáticos de cadena superior a 7 átomos de carbono, tales como el alcohol 1-octanol y el aldehído dodecanal.

En conclusión, con este trabajo se ha demostrado que los aceites esenciales de los flavedos de las variedades de Clemenules y Clemenpons presentan diferencias significativas que permiten distinguir los frutos de ambas variedades, los cuales no se pueden diferenciar desde el punto de vista morfológico.

Palabras clave

Aroma, *Citrus*, Clemenules, Clemenpons, cromatografía de gases, espectrometría de masas, aceite esencial, extracción de Clevenger, compuestos volátiles, monoterpenos, sesquiterpenos, análisis de datos multivariante, análisis de componentes principales (PCA), proyección de estructuras latentes (PLS),

Datos personales

Nombre y Apellidos: María Luisa Gómez Torrente

Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFG:	Análisis no dirigido del aceite esencial de las variedades de mandarino Clemenules y Clemenpons
Titulación:	Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural
Lugar de realización:	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.
Tutora:	M ^a Pilar López Gresa
Tutores externos:	M ^a Carmen González Mas José Luis Rambla Nebot

Abstract

The fruits belonging to the clementine varieties Clemenules and Clemenpons, are of great commercial interest. They are morphologically indistinguishable, since they have a very similar size, weight, diameter, ratio diameter/height, size of the rind, colour, juice yield and absence of seeds. Their harvesting period is also very similar, although, in the case of the Clemenpons variety, it begins a bit earlier.

The present study focuses on the metabolomic analysis of the volatile compounds that make up the essential oil of flavedo from the fruits of both clementine varieties, with the aim of identifying differences between both kinds of oil that may distinguish both types of fruits.

The oil extraction of both varieties was done by using the Clevenger distillation system, from samples taken during the whole harvesting period, in two different harvesting periods and in two independent plots. Subsequently, these oils were analysed by using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Afterwards, a non-directed analysis of all volatile compounds found in chromatograms and multivariate statistical studies (PCA and PLS-DA) were conducted. That enabled the identification of quantitative differences among the volatile profiles of both varieties, that is to say, both oil kinds showed the same compounds, but in a different concentration.

In the end, we tried to identify the volatile compounds responsible for these differences by studying their mass spectra and their chromatographic properties (retention time). Fifteen compounds, all of them belonging to the terpenic type, were found in a higher concentration in the flavedo of fruits belonging to the variety Clemenpons than in fruits belonging to the variety Clemenules. Ten of them were monoterpenes (C₁₀), three of them were hydrocarbons (3-carene, α -terpinene and γ -terpinene), and the other seven were oxygenated. Only three of those seven compounds were clearly identified: *trans*-carveol and α -terpinyl acetate. The other five compounds were sesquiterpenes (C₁₅), among them, α -humulene and α -sinensal. In the same way, the essential oil of the variety Clemenules had a higher level of aliphatic compounds of a chain superior to 7 carbon atoms, such as 1-octanol alcohol

and dodecanal aldehyde.

As a conclusion, this study proves that the essential oils of flavedos belonging to the varieties Clemenules and Clemenpons present significant differences that enable the identification of the fruits of both varieties, which cannot be distinguished from a morphological point of view.

Key words

Aroma, *Citrus*, Clemenules, Clemenpons, gas chromatography, mass spectrometry, essential oil, Clevenger extraction, volatile compounds, monoterpene, sesquiterpene, multivariate analysis, principal component analysis (PCA), projection to latent structures (PLS)

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a Aurelio Buj y a Juan Platero por la recolección de los frutos en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

A mis directores M^a Pilar, José Luís por toda ayuda prestada durante la realización de este trabajo y por haberme transmitido su capacidad de trabajo y esfuerzo.

Muy especialmente a mi directora y amiga Mari Carmen por haberme ayudado tanto durante todo este trabajo, por los grandes y duros momentos que hemos vivido juntas y por todo lo que me ha ido enseñando tanto profesional como personalmente.

También quiero agradecer a Antonio Granell por permitir el análisis de las muestras en el servicio de Metabolómica del IBMCP.

A la química Clara Lahore por integrar los picos de algunos compuestos en los cromatogramas de este trabajo.

A Nacho por todo el apoyo que me ha dado durante tantos años y los que nos quedan.

A mis hermanos, Aurelio, Mariló, Esther y Paco y a mis sobrinos Claudia y Mario por todo el amor y grandes momentos que me han dado y todos los que nos quedan por pasar...Y a mi inseparable compañera Tris!

Muy especialmente a mis padres por todo lo vivido junto a ellos, por todo lo que me han enseñado, por todo lo que me han querido y me siguen queriendo. Esto va por ti PAPA.

ABREVIATURAS

BG	Banco de Germoplasma
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
<i>EIC</i>	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS	Espacio en cabeza (<i>headspace</i>)
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
P5	Parcela 5
PCA	Análisis de componentes principales
PLS-DA	Proyección de estructuras latentes- Análisis discriminante
SIR	<i>Selected Ion Resolution</i>
SPME	Microextracción en fase sólida
TIC	Cromatograma total de iones
Tr	Tiempo de retención

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CLEMENTINAS.....	1
1.1.1. Origen de los cítricos.....	1
1.1.2. Taxonomía y morfología.....	1
1.1.3. Distribución geográfica e importancia económica.....	2
1.1.4. Requerimientos edafoclimáticos.....	3
1.1.5. Tipos varietales.....	3
1.1.5.1. Grupo Clementino. Variedades.....	4
1.1.6. Partes del fruto de los cítricos.....	4
1.2. ACEITES ESENCIALES.....	5
1.2.1. Concepto de aceite esencial.....	5
1.2.2. Distribución, localización y función de los aceites esenciales.....	6
1.2.3. Propiedades físicas de los aceites esenciales.....	6
1.2.4. Composición química de los aceites esenciales.....	6
1.2.4.1. Terpenos.....	7
1.2.4.2. Compuestos aromáticos.....	8
1.2.4.3. Compuestos de orígenes diversos.....	8
1.2.4.4. Caso concreto: Composición del aceite esencial de clementinas. Papel en la diferenciación de variedades.....	9
1.2.5. Influencia de factores extrínsecos en los aceites esenciales.....	9
1.2.6. Actividades biológicas de los aceites esenciales.....	10
1.3. TÉCNICAS PARA AISLAR COMPUESTOS VOLÁTILES.....	10
1.3.1. Extracción con disolvente.....	10
1.3.2. Destilación.....	11
1.3.3. Técnicas de espacio en cabeza.....	13
1.3.3.1. Técnica de espacio en cabeza estático.....	13
1.3.3.2. Técnica de espacio en cabeza dinámico.....	14
1.3.3.3. Técnica de espacio en cabeza-microextracción en fase sólida.....	14

1.4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	18
1.4.1. Detector de masas.....	20
1.4.2. Detector Olfactométrico.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. Material Vegetal.....	25
3.2. Toma de muestras.....	25
3.3. Obtención del aceite esencial.....	26
3.4. Condiciones del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas.....	26
3.5. Identificación de los compuestos.....	27
3.6. Cuantificación de los compuestos.....	27
3.7. Análisis estadístico.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Extracción y análisis cromatográfico de los compuestos volátiles del aceite esencial de la variedad Clemenules y Clemenpons.....	29
4.2. Análisis de Componentes Principales (PCA).....	30
4.3. Proyección de Estructuras Latentes y Análisis Discriminante (PLS-DA).....	33
4.4. Identificación de los compuestos diferenciales entre la variedad Clemenules y Clemenpons.....	36
4.4.1. Compuestos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules.....	36
4.4.2. Compuestos más abundantes en Clemenules que en Clemenpons.....	40
5. CONCLUSIONES.....	43

6. BIBLIOGRAFÍA.....	44
-----------------------------	-----------

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN:

Figura 1.1. Citrus clementina.....	1
Figura 1.2. Árbol clemenules.....	2
Figura 1.3. Partes del fruto de cítricos.....	5
Figura 1.4. Estructuras monoterpenos.....	7
Figura 1.5. Estructuras sesquiterpenos.....	8
Figura 1.6. Columna de extracción con disolvente.....	11
Figura 1.7. Extracción de tipo Clevenger.....	12
Figura 1.8. Columna destilación fraccionada.....	12
Figura 1.9. Inyección de la muestra aislada por espacio en cabeza estático.....	13
Figura 1.10. Desorción del analito por la trampa fría en el interior del CG.....	14
Figura 1.11. Técnica de inmersión directa. Técnica de espacio en cabeza Desorción en CG.....	15
Figura 1.12. Tipos de fibras comercializadas por Supelco.....	17
Figura 1.13. Clasificación de fibras según la extracción.....	18
Figura 1.14. Esquema de un cromatógrafo de gases.....	19
Figura 1.15. Esquema de un detector de masas.....	21
Figura 1.16. Esquema de un olfactómetro.....	22
Figura 1.17. Panelista.....	23

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3.1. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.....	26
---	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras de 2009 y 2010.....	30
Figura 4.2. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009.....	31
Figura 4.3. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010.....	32
Figura 4.4. Análisis de PCA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010 del Banco de Germoplasma.	33
Figura 4.5. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del 2009 y del 2010.....	34

Figura 4.6. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009.....	35
Figura 4.7. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010.....	36
Figura 4.8. Monoterpenos hidrocarbonados identificados.....	38
Figura 4.9. Monoterpenos oxigenados identificados.....	38
Figura 4.10. Información proporcionada por la NIST sobre el compuesto con $t_r = 31.47$ min.....	38
Figura 4.11. Información proporcionada por la NIST sobre el compuesto con $t_r = 28.16$ min.....	39
Figura 4.12. Sesquiterpenos identificados.....	39
Figura 4.13. Aldehídos alifáticos identificados.....	40

INDICE DE TABLAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Compuestos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules.....37

Tabla 2. Compuestos más abundantes en Clemenules que en Clemenpons.....40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CLEMENTINAS

1.1.1. Origen de los cítricos

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre (Infoagro Systems S.L, 2015; Wu y col., 2014).

La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios: conquistas de Alejandro Magno, expansión del Islam, cruzadas, descubrimiento de América, etc (Infoagro Systems S.L, 2015).



Figura 1.1. *Citrus clementina*

1.1.2. Taxonomía y morfología

- Familia: *Rutaceae*.
- Subfamilia: *Aurantioidea*.
- Género: *Citrus*.
- Especie: *Citrus reticulata*. Esta es la especie de las mandarinas. Siempre se ha considerado que las clementinas son una variedad de las mandarinas (Soler-Aznar y col., 2006). Actualmente se considera que las clementinas son un híbrido de mandarinas con otros *Citrus* (Wu y col., 2014).
- Porte: menor que el naranjo y algo más redondeado (Figura 1.2.)
- Raíz: sólida, blanca y bajo condiciones de cultivo, posee gran cantidad de pelos radicales.
- Hojas: unifoliadas y de nerviación reticulada, con alas rudimentarias pequeñas.
- Flores: solitarias o en grupos de 3 ó 4.

-Fruto: Tienen forma esférica o ligeramente achatada, de tamaño pequeño a mediano. De fácil pelado. Existen variedades muy semilladas y otras partenocárpicas (Infoagro Systems S.L, 2015; Agustí, 2002).



Figura 1.2. Árbol Clemenules

1.1.3. Distribución geográfica e importancia económica

Las clementinas se cultivan por sus frutos de agradable sabor, sin semillas y muy fáciles de pelar, lo que hacen que sean muy atractivos para el consumidor. Han alcanzado su máximo desarrollo en las áreas subtropicales (30-40° latitud N y S). En estas áreas la producción es estacional y la calidad del fruto para el consumo en fresco es excelente. La producción de mandarinas muestra un ritmo creciente más acusado que el de las naranjas. En las regiones tropicales (desde el ecuador hasta 23-24° latitud N y S) la calidad del fruto es muy variable, dependiendo de los microclimas y de la altitud. La producción es casi continua a lo largo del año y generalmente los frutos no alcanzan su color característico, aunque son jugosos, muy dulces, poco ácidos y se destinan principalmente al mercado local (Infoagro Systems S.L, 2015).

Actualmente los cítricos son los frutos de mayor producción en el mundo. España es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea y quinto en el mundo con una producción anual superior a 5 millones de Tm durante la última década, de las cuales cerca del 80% se comercializan para el consumo en fresco y el 60% se exportan a otros países, sobre todo dentro de la UE (datos del Ministerio de Agricultura). La Comunidad Valenciana es la principal región cítrica a nivel nacional, tanto por la superficie dedicada a este cultivo (aproximadamente 182.000 Ha, cerca del 60% del total nacional) como por producción (más de 3 millones de toneladas anuales, casi un 60% de la producción nacional). La citricultura española, y en particular la valenciana, tiene una fuerte vocación exportadora (el 75% de la exportación cítrica nacional es valenciana), fundamentalmente de productos destinados al consumo en fresco y con unos elevados estándares de calidad. De acuerdo a la FAO, España es el principal exportador de cítricos en el mundo, destinando más de la mitad de su producción a la exportación. En la Comunidad Valenciana se producen mayoritariamente mandarinas y naranjas (50% y 45% de la producción total de cítricos, respectivamente) y en menor medida limones (menos del 1%) (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 2015). Actualmente se cultivan en torno a 35 variedades con cierta importancia comercial, de las cuales destacan las naranjas Navelina, Navelate y Valencia Navel y la mandarina Clementines. A pesar de la excelente estructura varietal

de la que se dispone en la Comunidad Valenciana, se están dirigiendo constantes esfuerzos hacia la obtención de nuevas variedades de cítricos que permitan una mejor adaptación del sector cítrico a las condiciones del mercado. Algunos de los aspectos sobre los que se está incidiendo son la ampliación del periodo de producción, la mejora de la calidad, el aumento de la producción, etc. (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 2014). Hay un gran interés por las variedades precoces (Marisol, Clemenpons...) y tardías (Moncada) de clementina y en general por las clementinas de calidad (Clemenules).

1.1.4. Requerimientos edafoclimáticos

El árbol de mandarina más resistente al frío y más tolerante a la sequía que el naranjo, pero los frutos son sensibles. El factor limitante es la temperatura mínima, ya que no tolera las inferiores a 3 °C; pues la temperatura determina el desarrollo vegetativo, floración, cuajado y calidad de los frutos. Las temperaturas altas constantes mantienen altos niveles de clorofilas y su color es persistentemente verde.

Necesitan suelos permeables y poco calizos y un medio ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Se recomienda que el suelo sea profundo para garantizar el anclaje del árbol, una amplia exploración para garantizar una buena nutrición y un crecimiento adecuado. Los suelos deben tener una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos (textura), para garantizar una buena aireación y facilitar el paso de agua, además de proporcionar una estructura que mantenga un buen estado de humedad y una buena capacidad de cambio catiónico.

No toleran la salinidad y son sensibles a la asfixia radicular. En general la salinidad afecta al crecimiento de las plantas mediante alteraciones hídricas producidas por sus efectos osmóticos, y también por acumulación de iones tóxicos y por Interferencias con la absorción de elementos nutritivos esenciales, que provocan desequilibrios en el balance de elementos minerales. En los cítricos los efectos dañinos de las sales se combaten con estrategias de riego, uso de material vegetal tolerante y la utilización de sales de calcio. (Legaz Paredes y Primo Millo, 1995)

1.1.5. Tipos varietales

Las variedades de mayor interés entre las mandarinas (Soler-Aznar y col., 2006) son:

Clementinas: son las de menor tamaño y mejor calidad gustativa. Destaca la variedad Clemenules. En general la recolección es desde principios de octubre hasta finales de enero, dependiendo de la variedad.

Satsumas: son las más precoces, con frutos de mayor tamaño y peor calidad gustativa, sin semilla. Destaca la variedad Clausellina. Recolección desde mediados de septiembre hasta mediados de noviembre

Otros tipos: ornamentales, mandarino Cleopatra, híbridos Nova, Citrover, etc.

1.1.5.1. Grupo Clementino. Variedades

Clemenules: Se originó por una mutación de clementina fina, originada en Nules (Castellón). El árbol tiene vigor medio, poca espinosidad y alguna agalla multiyema. Tiene forma redondeada con ramas inclinadas. Las hojas son grandes de color verde claro. La floración puede presentarse escalonada en el tiempo. El polen posee alto poder germinativo. Es partenocárpica y autoincompatible (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 2014). El fruto es de tamaño grande (80-100 gramos), con forma algo achatada y de corteza de color naranja intenso. La pulpa es jugosa de muy buena calidad. Es fácil de pelar y prácticamente no tiene semillas. La recolección es de principios de noviembre a finales de enero, después que Oroval. Es una variedad productiva y de rápida entrada en producción. Los frutos se mantienen relativamente bien en el árbol.

Clemenpons: Se originó por una mutación espontánea de Clemenules, detectada en Pego (Alicante). El árbol y el fruto son muy similares a los de la variedad de la que procede, pero se adelanta 15 días la maduración respecto a éste. El árbol es vigoroso, de crecimiento abierto, algo más bajo y con presencia de espinas en las ramas vigorosas que desaparecen con el tiempo. Presenta una característica proliferación de yemas vegetativas en la zona inmediatamente por encima del injerto. El fruto, sin semillas, es muy parecido a Clemenules, de forma redondeada y aplanada por los polos. Desarrolla buen calibre, se pela fácilmente y alcanza los índices de calidad interna unas dos semanas antes de Clemenules. Requiere ser cosechada rápidamente. La variedad es partenocárpica y autoincompatible. Es productiva y con muy buen desarrollo de calibre. La recolección es de primeros de octubre a mediados de noviembre.

Marisol: El árbol es muy vigoroso, con hábito de crecimiento ascendente, frondoso. El color de la madera es relativamente oscuro con entrenudos cortos. La madera de las ramas es muy frágil y se rompe con facilidad. Tiene espinas en ramas vigorosas. Es de recolección temprana. La recolección es de finales de septiembre a finales de octubre.

Oronules: El árbol tiene un crecimiento abierto y forma esférica. Las hojas son lanceoladas, coriáceas y pequeñas que recuerdan a las del olivo, con tendencia a curvarse hacia el envés. Tiene yemas múltiples en las axilas de las hojas. Las ramas no presentan espinas. Los frutos tienen una coloración naranja-rojiza muy intensa y son sensibles al golpe de sol. Tienen tendencia al bufado. La recolección es de finales de septiembre a principios de noviembre.

1.1.6. Partes del fruto de los cítricos

El fruto de los cítricos es una clase especial de baya llamado Hesperidio (Figura 1.3.) (un hesperidio es un fruto dividido en varias secciones, las cuales están envueltas en una membrana). Se origina del desarrollo del ovario y está formado por unos diez carpelos unidos alrededor de un eje floral, formando así los lóculos donde crecen los sacos de zumo y las semillas. Entre dos lóculos vecinos aparece un tejido que constituye el septo, que se rompe muy fácilmente y permite la separación de los lóculos o gajos del fruto maduro (Agustí, 2002).

El pericarpio, la corteza del fruto, constituye la parte más externa del mismo y a partir del cual se extraen los aceites esenciales. Está formado por tres capas. El exocarpo o flavedo es la parte más externa del pericarpio y está formado por una epidermis compuesta de células parenquimáticas, de forma tabular y muy estrechamente unidas entre sí que continúan dividiéndose hasta que el fruto madura. Contienen también los cloroplastos, que le proporcionan el color verde a los frutos inmaduros; con la maduración se va perdiendo clorofila y aumentado el contenido de carotenoides que le proporcionan al fruto su color característico (en las naranjas sanguinas son los antocianos los responsables de su color rojizo). Una capa cuticular cubre toda la superficie del flavedo e incluso se introduce entre los resquicios que dejan entre sí las células epidérmicas. El espesor de esta capa es variable y depende de la edad de las células, aumentado con ella. Por debajo de estas células parenquimáticas aparecen varias capas de células subepidérmicas, de formas más o menos globosas, que constituyen las glándulas de aceites esenciales. La capa intermedia del pericarpio es el mesocarpo o albedo, que está formado por un tejido parenquimático de varias filas de células, con grandes espacios intercelulares y de aspecto esponjoso, normalmente de color blanco, de ahí su nombre. La capa más interna del pericarpio es el endocarpo, que ya forma parte de la membrana de los lóculos y que está formada por varias capas de células que forman un parénquima compacto y una epidermis, que ya está en contacto con los lóculos). Cuando el fruto madura, la corteza puede separarse del endocarpo, quedando solo constituida por el flavedo y el albedo (Agustí, 2002).

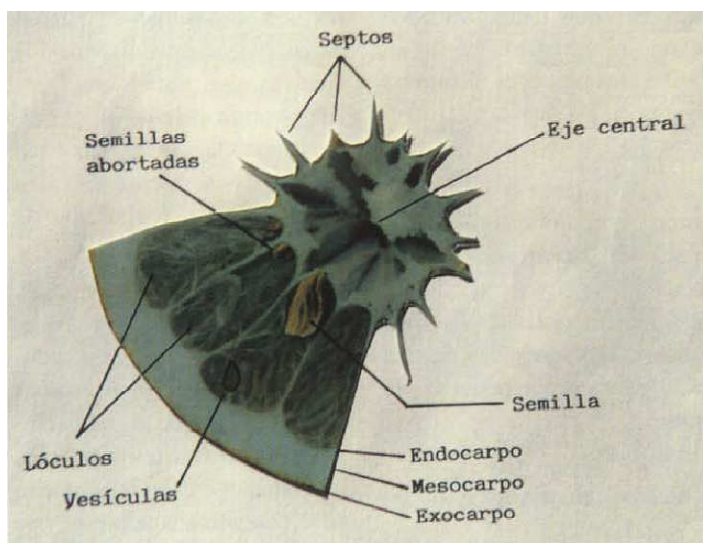


Figura 1.3. Partes del fruto de cítricos

1.2. ACEITES ESENCIALES

1.2.1. Concepto de aceite esencial

Los aceites esenciales son “productos de composición generalmente muy compleja que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación” (Bruneton, 2001). Estos aceites son de gran importancia en la industria farmacéutica, así como en industria cosmética y de perfumería y también en la industria agroalimentaria.

1.2.2. Distribución, localización y función de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se extraen casi en su totalidad de vegetales superiores. Se han identificado más de 17.000 especies aromáticas. Los géneros capaces de proporcionar los aceites esenciales pertenecen a un número limitado de familias, como *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*, etc (Bruneton, 2001).

Los aceites esenciales pueden almacenarse en todos los órganos vegetales. Así se pueden obtener de las flores (bergamota, nardo), igualmente de hojas (melisa, eucalipto, laurel) y, aunque sea menos frecuente, a partir de cortezas (canela), leños (leño de rosa, sándalo), rizomas (cúrcuma, jengibre), frutos (anís verde, anís estrellado, cítricos), semillas (nuez moscada). Aunque todos los órganos de una especie pueden contener aceite esencial, la composición de éste varía el órgano del que proceda. Así por ejemplo, en el caso del naranjo amargo (*C.aurantium L. ssp. Aurantium*, *Rutaceae*) el flavedo (la corteza sin el albedo) proporciona el aceite esencial de naranja amarga, la flor produce *esencia de Neroli* y la hidrodestilación de la hoja, ramitas y pequeños frutos da lugar a la *esencia de petit grain*, siendo diferente la composición de estos tres aceites. Cuantitativamente, los rendimientos en aceite esencial son más bien bajos, frecuentemente inferiores a 10 mL/kg (Bruneton, 2001).

Normalmente, los aceites se sintetizan y se acumulan en estructuras especializadas, casi siempre situadas sobre o cerca de la superficie de la planta como por ejemplo los pelos secretores de las *Laminaceae*, glándulas secretoras de las *Myrtaceae* o las *Rutaceae* (cítricos) o canales secretores de las *Apiaceae* o las *Asteraceae* (Bruneton, 2001).

En cuanto a su función fisiológica, se cree que los aceites esenciales tienen funciones de defensa contra patógenos (insectos, hongos) y herbívoros y de atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas (Bruneton, 2001; Carrera y col., 2007).

1.2.3. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, normalmente incoloros. En general, su densidad es inferior a la del agua (los aceites esenciales de clavo o canela constituyen excepciones). Son liposolubles y, por tanto, solubles en los disolventes orgánicos como hexano o diclorometano. Pueden ser arrastrados por corrientes de vapor de agua, siendo muy poco solubles en ella, pero aún así pueden proporcionarle olor al agua (Bruneton, 2001).

1.2.4. Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de compuestos volátiles que pertenecen casi en su totalidad a dos grupos que se sintetizan a partir de dos rutas metabólicas diferentes. Un grupo lo forman los terpenoides, que derivan de la vía del ácido mevalónico, y el otro, normalmente menos abundante, está constituido por compuestos aromáticos derivados del fenilpropano

1.2.4.1. Terpenos

En los aceites esenciales se encontrarán únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos de masa molecular más pequeña, formados por dos o tres unidades isoprénicas. Son los monoterpenos (diez átomos de carbono) y sesquiterpenos (quince átomos de carbono). Se han descrito varios millares de compuestos en estas dos series.

Monoterpenos. (Figura 1.4.) Casi siempre se encuentran como hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos (mirceno, ocimenos), monocíclicos (limoneno, α - y γ -terpineno, *p*-cimeno) o bicíclicos (pinenos, 3-careno, canfeno, sabineno). A veces constituyen más del 90% del aceite esencial, como es el caso de los aceites esenciales de cítricos (González-Mas y col., 2010).

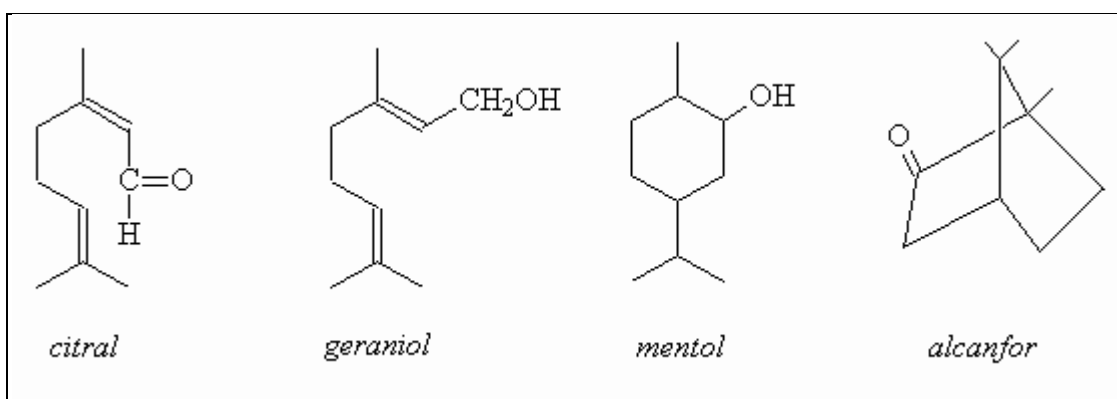


Figura 1.4. Estructuras de monoterpenos

Los monoterpenos presentan muchas veces funciones oxigenadas en su estructura, debido a la reactividad de los cationes intermediarios. Así podemos encontrar monoterpenos con las siguientes funciones:

- alcoholes: acíclicos (geraniol, linalol, citronelol), monocíclicos (mentol, α -terpinol, 1-terpinen-4-ol), bicíclicos (borneol, fenchol);
- aldehídos: generalmente acíclicos (geraniol, neral, citronelal);
- cetonas: acíclicas (tagetona), monocíclicas (mentona, isomentona, carvona, pulegona), bicíclicas (alcanfor, fenchona);
- ésteres: acíclicos (acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo), monocíclicos (acetato de mentilo, acetato de α -terpinilo), bicíclicos (acetato de isobornilo);
- éteres: 1,8-cineol (llamado también eucaliptol); igualmente éteres cíclicos, tetrahidrofuránicos o di- y tetrahidropiránicos que, para algunos, juegan un papel principal en el aroma de los frutos (óxidos de linalol, óxidos de rosa);
- fenoles: timol, carvacrol.

Sesquiterpenos. (Figura 1.5.) Normalmente se suelen encontrar en forma de hidrocarburos y también formando alcoholes o cetonas o aldehídos. El alargamiento de la cadena (C_{15}) aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí su mayor variedad de estructuras con respecto a los monoterpenos (se han descrito más de una centena de esqueletos diferentes). Algunos sesquiterpenos característicos de aceites esenciales son hidrocarburos mono y policíclicos (β -bisaboleno, β -cariofileno), alcoholes (farnesol, carveol), cetonas (nootkatona) y aldehídos (sinensales).

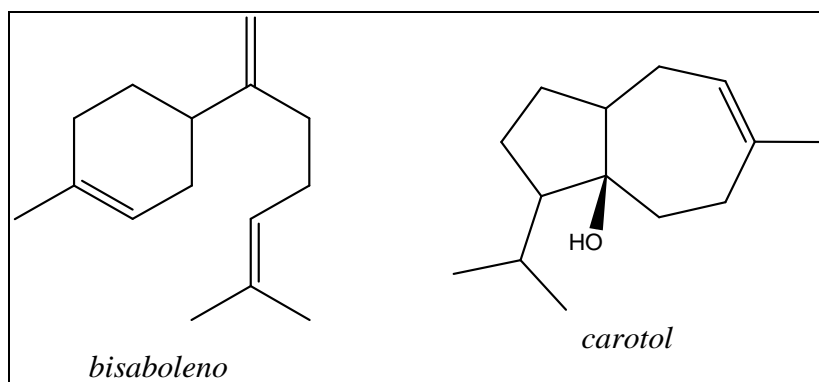


Figura 1.5. Estructuras de sesquiterpenos

1.2.4.2. Compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano (C_6-C_3) y son generalmente mucho menos abundantes que los de origen terpénico en los aceites esenciales. Se trata habitualmente de alil- y propenilfenoles, a veces de aldehídos, característicos de determinados aceites esenciales de *Apiaceae* (por ejemplo anís, hinojo y perejil, en los que se han identificado los sesquiterpenos anetol, anisaldehído y apiol, respectivamente). También son característicos los sesquiterpenos del clavo, nuez moscada, albahaca, canelas (eugenol, safrol, asaronas, cinamaldehído, etc). Igualmente se pueden encontrar en los aceites esenciales compuestos fenólicos C_6-C_1 como la vainillina.

1.2.4.3. Compuestos de orígenes diversos

Se trata de compuestos que resultan de la transformación de compuestos no volátiles. Podemos encontrar de varios tipos según su origen:

Compuestos procedentes de la degradación de ácidos grasos. La peroxidación de los ácidos linoleico y α -linolénico induce su ruptura, la formación de ácidos en C_9 o C_{12} y, posteriormente la de alcoholes, aldehídos y ésteres de pequeña masa molecular, como 3-(*Z*)-hexen-1-ol, 2-hexenales y sus isómeros responsables del olor herbáceo de las hojas, octanal, decanal, acetato de hexenilo, etc.

Compuestos procedentes de la degradación de terpenos:

- C_{13} -norisoprenoides. Los principales constituyentes de este grupo son las iononas, que provienen de la auto-oxidación de los carotenos. Están ampliamente distribuidos en numerosos géneros y se encuentran con frecuencia en los aceites de

los frutos. Las damascenonas (rosa, geranio) y las damasconas tienen un origen semejante.

- Ironas. Estas cetonas en C₁₄ son igualmente productos de degradación de triterpenos bicíclicos. Son características del rizoma del lirio (*Iris florentina* L., *Iris pallida* Lamk. *Iris germanica* L.) y se van sintetizando durante el envejecimiento del rizoma.

1.2.4.4. Caso concreto: Composición del aceite esencial de clementinas. Papel en la diferenciación de variedades

El perfil volátil del aceite esencial de clementinas es semejante cualitativa y cuantitativamente a otros cítricos como naranjas (*Citrus sinensis*) (Viuda-Martos y col. 2009), aunque hay que tener en cuenta que sólo se pueden comparar variedades cultivadas en condiciones similares (Fanciullino y col., 2006). Las mandarinas, de donde proceden las clementinas, están clasificadas en más de 30 especies, de acuerdo con el sistema establecido por Tanaka (1961). Estas especies están compuestas por una o varias decenas de variedades, en ocasiones muy difíciles de diferenciar morfológicamente. Dado que la variabilidad química del aceite esencial de la corteza de los cítricos depende de los factores genéticos, el estudio químico de dicho aceite ayuda a diferenciar estas variedades (Ruberto y col., 1997; Merle y col., 2004).

Los compuestos más abundantes del aceite esencial de las clementinas son los monoterpenos (Ruberto y col., 1997; Dugo y col., 2002; Merle y col., 2004). Representan aproximadamente el 95% de todo el aceite esencial, siendo el limoneno el compuesto mayoritario (alrededor del 92% del total) (Merle y col., 2004; González-Mas y col., 2010). Otros monoterpenos hidrocarbonados importantes en el aceite esencial de mandarinas son α - y β -pineno, α - y γ -terpineno, camfeno, sabineno, β -mirceno, α -felandreno, 3-careno, etc. También destacan otros monoterpenos con funciones oxigenadas, como el alcohol linalool o *trans*-carveol, los aldehídos citronellal o neral y la cetona carvona.

Otros compuestos que forman parte de los aceites esenciales de cítricos son sesquiterpenos hidrocarbonados (por ejemplo α -copaeno o α -humuleno) o con algún grupo funcional tipo cetona, alcohol o aldehído como *cis*-nerolidol o α - y β -sinensal. También se suelen identificar algunos compuestos no pertenecientes al grupo de los terpenos, como compuestos alifáticos de más de cinco átomos de C; ejemplos de estos últimos son el 2-(*Z*)-hexenal, muy frecuente en el aceite esencial de los cítricos y responsable del aroma a hierba fresca (González-Mas y col., 2010) o los aldehídos octanal y decanal, que le proporcionan un aroma a grasa (Cornell University, 2004). También se ha descrito en estos aceites el compuesto α -ionona que pertenece al grupo de los norisoprenoides (Viuda-Martos y col., 2009).

1.2.5. Influencia de factores extrínsecos en los aceites esenciales

Los factores ambientales influyen en la composición de los aceites esenciales. La temperatura, la humedad relativa, la luminosidad y los vientos ejercen una influencia directa, sobre todo en especies que poseen estructuras histológicas de almacenamiento superficiales (por ejemplo los pelos secretores de las *Laminaceae*). Cuando la localización es más profunda la calidad es mucho más constante. En ciertos *Citrus*, el contenido es tanto más importante cuanto más elevada es la temperatura.

Las prácticas de cultivo son también determinantes en el rendimiento y la calidad del aceite. El aporte de abonos, el régimen hídrico y la influencia de las variaciones de N, P, K se ha estudiado en diversas especies. La experiencia demuestra que hay reglas generales aplicables en todos los casos (Bruneton, 2001).

El proceso de obtención también influye en la composición de los aceites esenciales. La labilidad de los constituyentes de los aceites esenciales explica que la composición del producto obtenido por hidrodestilación, sea generalmente diferente de la mezcla de constituyentes inicialmente presente en los órganos secretores del vegetal. Durante la hidrodestilación, el agua, la acidez y la temperatura pueden inducir la hidrólisis de los ésteres pero también reagrupamientos, isomerizaciones, racemizaciones, oxidaciones, etc.

Por último, es necesario señalar también la influencia del estado de la materia prima en la composición del aceite esencial. En algunas *Lamiaceae*, es suficiente el almacenamiento durante 24 horas para inducir cambios sensibles en su composición. Hay que señalar finalmente que la cinética de la destilación no es igual para todos los componentes de un aceite esencial (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc.), por lo que la composición del destilado varía en función de la duración y condiciones de la extracción (Bruneton, 2001).

1.2.6. Actividades biológicas de los aceites esenciales

Se han descrito muchas actividades biológicas para los aceites esenciales (Calo y col. 2015). En el caso de los cítricos, se ha demostrado que tienen actividades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (O'Bryan y col., 2008; Chutia y col., 2009; Malhotra y col., 2009).

1.3. TÉCNICAS PARA AISLAR COMPUESTOS VOLÁTILES

Estas técnicas son usadas para el análisis de compuestos volátiles de una gran variedad de muestras, desde el aroma de las flores (Báez y col., 2012), hasta el aroma de algunas frutas como por ejemplo la papaya (Flath y col., 1990) o la manzana (Hern y Dorn, 2003). Entre dichas técnicas las más importantes son:

1.3.1. Extracción con disolvente

La extracción con disolventes se realiza mediante una cromatografía de adsorción en columna (Martínez y Csáky, 1998). Este método consiste en hacer pasar la muestra, previamente extraída con un disolvente apolar a partir del material vegetal y posteriormente concentrada, por una columna de vidrio rellena de un material adsorbente que constituye la fase estacionaria. La muestra se añade por la parte superior de la columna, quedando retenida sobre el material adsorbente. A continuación se le añaden los disolventes orgánicos (la fase móvil), de tal manera que los componentes de la muestra se desplazan arrastrados por estos disolventes y, dependiendo de la adsorción selectiva que posea cada compuesto por la fase estacionaria, lo harán a velocidades diferentes, efectuándose así la separación. La longitud y la anchura de la columna son factores determinantes para la correcta separación de los

componentes de la muestra, así como la elección de la fase móvil y la fase estacionaria (Figura. 1.6.).

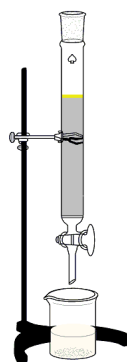


Figura 1.6. Columna de extracción con disolvente.

El tipo de adsorción depende de la naturaleza del enlace que se establece entre la fase estacionaria y los compuestos de la muestra. Puede ser por fisisorción, que es la forma más simple de adsorción, y es debida a fuerzas de unión débiles, (fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrógeno o las interacciones hidrofóbicas) o puede ser por quimisorción, que ocurre cuando se establece un enlace químico entre ambos. El grado de intercambio depende de los materiales involucrados.

Normalmente para la separación de compuestos volátiles se utiliza una fase estacionaria que retiene a estos compuestos por fisisorción. Como los compuestos volátiles son de muy baja polaridad (con muy pocos grupos hidroxilos y de bajo peso molecular), sólo se puede utilizar una fase estacionaria de carácter apolar que sea capaz de retenerlos mediante interacciones hidrofóbicas (Gómez y col., 1995). Una vez el relleno haya retenido todos los compuestos volátiles, los únicos disolventes orgánicos que van a ser capaces de arrastrar estos volátiles adheridos a la resina serán los disolventes de baja y media polaridad (hexano, pentano, diclorometano, acetato de etilo, etc).

1.3.2. Destilación

La destilación se emplea para separar los compuestos volátiles de una mezcla líquida, siempre y cuando sus puntos de ebullición difieran en menos de 100 °C. Puede ser sencilla (Clevenger) o puede ser fraccionada, la cual equivale a varias destilaciones sencillas (Martínez y Csáky, 1998; González-Mas y col., 2010).

En la extracción tipo Clevenger la muestra se coloca en el interior de un matraz de vidrio donde también se añade un determinado volumen de agua, que nunca debe superar la mitad del volumen del matraz, el cual se calienta a una temperatura no superior a 60 °C gracias a una manta calefactora. A este matraz se le acopla una columna ladeada por donde se evaporan los compuestos volátiles. La muestra se ha de calentar lentamente para evitar la succión del líquido hacia la cabeza de destilación. Al final de la columna está acoplado el refrigerante, que hace condensar los aceites esenciales, los cuales caen en un pequeño tubo, que es una ramificación perpendicular de la columna principal (cuatro veces más estrecho que la misma) y que está situado en la

parte superior de dicha columna, justo por debajo del refrigerante, lo que facilita la condensación de los aceites esenciales en el interior de este tubo. Estos aceites se recuperan fácilmente, ya que este tubo secundario tiene en su extremo inferior una llave que puede abrirse y así recoger el aceite en un vial (González-Mas y col., 2010) (Figura 1.7.).



Figura 1.7. Extracción de tipo Clevenger

En la destilación fraccionada también se dispone de una manta eléctrica y un el matraz de destilación de fondo redondo, donde se introduce la muestra a destilar (Martínez y Csáky, 1998). Acoplado a esta matraz se debe colocar una columna, normalmente tipo Vigreux, donde entran los vapores procedentes de la muestra (Figura 1.8.); este tubo proporciona una gran superficie para el intercambio de calor entre el vapor ascendente y el condensado descendente, lo que hace posible una serie completa de evaporaciones y condensaciones parciales a lo largo de los distintos platos de la columna, donde se van separando, con un alto grado de pureza, los diferentes compuestos volátiles dependiendo de su punto de ebullición. En la parte superior del tubo va unido la cabeza de destilación, que es la pieza que ensambla el matraz y el tubo con el termómetro y el refrigerante. Éste último debe ser recto y se coloca siempre en la salida lateral de la cabeza de destilación, con el ángulo dictado por ella, evitando tensiones. Finalmente, unido al refrigerante por su parte inferior se coloca un colector de fracciones acoplado a varios matraces, lo que permite ir cambiando de matraz en función de la temperatura de destilación, de manera rápida, por simple giro del sistema, aislando los compuestos volátiles.



Figura 1.8. Columna destilación fraccionada

1.3.3. Técnicas de espacio en cabeza

El espacio en cabeza es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de analitos volátiles a partir de muestras sólidas o líquidas (Rouseff y Cadwallader, 2001). Se basa en el calentamiento de un líquido o un sólido en un recipiente cerrado herméticamente y parcialmente lleno, normalmente un vial, de modo que queda un espacio libre en la parte superior del recipiente, el denominado espacio en cabeza. Los compuestos volátiles son liberados desde la matriz y pasan a la fase gaseosa, estableciéndose un equilibrio entre ambas fases. Según como se realice la toma de muestra desde este espacio en cabeza podemos distinguir las siguientes técnicas:

1.3.3.1. Técnica de espacio en cabeza estático

Con esta técnica, en los sistemas más clásicos, una vez se alcanza el equilibrio entre la matriz y el espacio en cabeza, se toma la muestra de este espacio mediante una jeringa biselada, típica de cromatografía de gases, que luego se inyecta en el cromatógrafo. En instrumentos más modernos este vial está colocado en un automuestreador, el cual está diseñado para calentar la muestra y una vez que se alcanza este equilibrio, presuriza el espacio en cabeza mediante una columna colocada sobre el vial que le inyecta el gas portador, normalmente helio. Para tomar la muestra se cierran las válvulas de paso del helio al muestreador y el vial actúa como un reservorio de este gas, de tal manera que la muestra sale del vial por diferencias de presión a través de esta columna y se ve obligada a atravesar la línea de transferencia (un capilar) que es el único espacio por donde la muestra puede discurrir. Al final de esta línea hay una trampa fría donde la muestra queda retenida (Rouseff y Cadwallader, 2001) (Figura 1.9.).

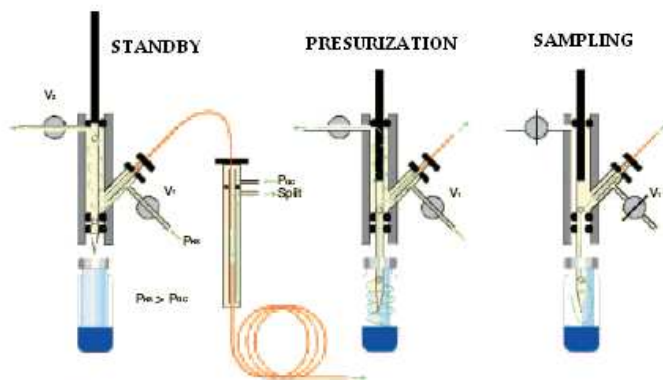


Figura 1.9. Inyección de la muestra aislada por espacio en cabeza estático

Al final de cada toma de muestra, las válvulas de helio son reabiertas y el flujo de gas se normaliza a través de todo el equipo. La muestra puede concentrarse en la trampa fría, repitiendo este proceso tantos ciclos como sea necesario hasta acumular una cantidad suficiente para ser detectada, lo cual incrementa enormemente la sensibilidad del equipo. Esta trampa fría está herméticamente unida a un cromatógrafo de gases, de tal manera que cuando

se quiere introducir la muestra en el mismo se ha de calentar esta trampa rápidamente a altas temperaturas esta trampa, así se desorben al mismo tiempo todos los componentes retenidos y son arrastrados por el helio al cromatógrafo de gases (Figura 1.10.).

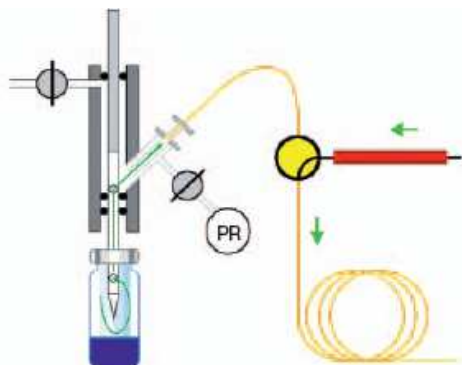


Figura 1.10. Desorción del analito por la trampa fría en el interior del CG

1.3.3.2. Técnica de espacio en cabeza dinámico

Cuando la mezcla de compuestos volátiles presentes en el espacio en cabeza del vial son barridos directamente por un gas portador, helio normalmente, sin esperar a alcanzar un equilibrio entre la matriz y el espacio, hablamos de espacio en cabeza dinámico. El flujo de helio suele ser alto, del orden de 80 mL/min y se hace pasar por el espacio en cabeza durante 10-20 minutos. En esta técnica el gas de arrastre con los analitos debe luego atravesar un sólido adsorbente (Chromosorb[®], Tenax[®] u otro), para la fijación de los mismos y su elusión posterior de forma súbita, antes de ser introducidos en el cromatógrafo de gases (Mateo y Jiménez, 2000; Kolb y Ettre, 1997).

1.3.3.3. Técnica de espacio en cabeza-microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica extractiva que permite concentrar y aislar los analitos de la matriz de la muestra (Pawliszyn, 1997). Éstos se adsorben o absorben a unas fibras de sílice fundida con un determinado recubrimiento que, en la mayoría de los casos, es polimérico. Hay que tener en cuenta que en realidad existen dos formas de realizar la extracción en SPME, una es la extracción por inmersión directa, donde la fibra se introduce en el seno de la disolución, y la otra es la técnica de espacio en cabeza o *headspace*, en la que la fibra se introduce en la zona superior del vial y sin que se sumerja en la disolución (Figura 1.11.). Ésta última es la que se ha utilizado en este proyecto.

Debido al pequeño tamaño y la geometría cilíndrica de la fibra utilizada en SPME, ésta se puede incorporar a una jeringa de acero inoxidable, así se facilita su manipulación y al mismo tiempo queda protegida cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. La transferencia de los compuestos contenidos en la fibra al sistema de análisis permite la identificación y cuantificación de los mismos.

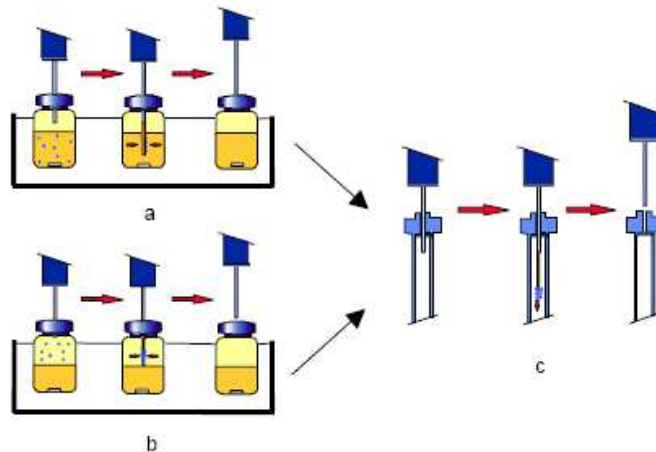


Figura 1.11. ^aTécnica de inmersión directa. ^bTécnica de espacio en cabeza. ^cDesorción en CG

Al margen de las dos formas posibles de extracción, el proceso consta de dos etapas: una primera etapa de adsorción (o absorción) y una segunda etapa de desorción.

- Primera etapa: Etapa adsorción/absorción

En esta etapa la fibra se introduce en el vial pinchando el septum del vial con la aguja donde está escondida la fibra. Una vez dentro del vial, se empuja el émbolo de la jeringa, de tal manera que la fibra sale de la aguja y queda expuesta a la muestra (bien en el espacio en cabeza o dentro de la propia matriz). A partir de este momento se produce una migración de los compuestos desde la solución a la fibra, hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los compuestos hacia la superficie de la fibra. La cantidad de compuesto extraído viene determinado por su coeficiente de partición entre la muestra y el material que recubre las fibras. La extracción se considera completa cuando la concentración del compuesto ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

Los parámetros que pueden afectar a este proceso son el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra y las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o solventes orgánicos). Ahora se procede a describir cómo afectan estos parámetros a la extracción.

Tiempo: El tiempo de extracción es un parámetro a tener muy en cuenta, ya que viene determinado por el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, en el cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante. Este tiempo es característico de cada compuesto-fibra. Para obtener un correcto análisis debemos asegurarnos que el tiempo de extracción sea suficiente para alcanzar el estado de equilibrio, ya que pequeñas oscilaciones pueden variar de manera considerable la cantidad de analito extraído.

Temperatura de extracción. Este parámetro contribuye de dos formas completamente opuestas en el proceso. Por un lado, los coeficientes de difusión de los compuestos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de compuesto extraído. Al aumentar la temperatura, aumenta la concentración de los analitos en el

espacio de cabeza por lo que la extracción es más rápida. Por otro lado, un aumento excesivo de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del compuesto entre la muestra y la fibra, por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente. Por lo tanto, según el tipo de analitos a analizar tendremos que seleccionar la temperatura adecuada para realizar la extracción.

Concentración de sal en la muestra y la modificación del pH. La presencia de sales en la muestra, generalmente cloruro de sodio, aumenta el coeficiente de distribución de los compuestos que están presentes en forma no ionizada, por lo que la cantidad de compuesto extraída generalmente aumenta. Sin embargo, si los compuestos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. En consecuencia, el pH de la muestra es otro factor a tener en cuenta en la optimización del proceso de SPME ya que los analitos deb en estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción.

Volumen de muestra. Es otro parámetro a tener en cuenta al desarrollar un método analítico basado en SPME. Se debe seleccionar en función de los coeficientes de distribución de los compuestos.

- Segunda etapa: Etapa desorción

En la segunda etapa la desorción se realiza térmicamente (cuando la toma de muestra se ha hecho por espacio en cabeza) o bien por adición de un solvente orgánico (cuando la toma de muestras se ha realizado por inmersión de la fibra en la propia matriz). En el primer caso se utilizará un cromatógrafo de gases y para la segunda se utilizará un cromatógrafo líquido (HPLC).

Si la desorción se realiza térmicamente, los parámetros a optimizar en el cromatógrafo de gases son la temperatura y el tiempo de desorción, de tal manera que la temperatura de desorción debe ser la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa.

Si la desorción se realiza mediante el uso de un solvente orgánico, los parámetros a optimizar en el HPLC son el tipo de solvente orgánico y el volumen de solvente. Así, el tipo de disolvente debe ser compatible con la fibra y debe utilizarse el menor volumen posible, de tal manera que la concentración de los compuestos sea lo más alta posible y sean más fáciles de detectar.

- Tipos de fibras en SPME

Debido a la gran expansión de las técnicas de SPME existen muchos tipos de fibras. Se pueden encontrar 50 recubrimientos químicos diferentes de fibra, por lo que se consiguen fibras muy selectivas para determinados tipos de compuestos. El espesor del recubrimiento puede oscilar entre 7 μm y 100 μm y el material sobre el que se deposita el recubrimiento suele ser sílice fundida, aunque también se han comercializado fibras preparadas con el material StableFlex[®], constituido por núcleos de fibras de aleación metálica, que le

proporcionan una mayor resistencia. Existen dispositivos de fibra para uso manual o con automuestreador. Las agujas donde queda escondida la fibra pueden ser de calibre 24, el estándar, o bien 23; la longitud de las fibras suele ser de 1 cm pero también las hay de 2 cm.

Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA), pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones (Figura 1.12.), siendo la naturaleza de los analitos a analizar lo que determina la fibra a utilizar. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y, en cambio, se usan recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno). También cuando se pretenden analizar compuestos apolares de alto peso molecular (los menos volátiles) es mejor usar fibras con un espesor de 7 o 30 μm de PDMS, porque estos compuestos son más fáciles de desorber a partir de estas fibras que a partir de las de 100 μm de espesor del mismo recubrimiento.

Fase estacionaria / espesor	T ² máxima de uso	Polaridad ³	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 μm , fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Bipolar	HPLC
65 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
Poliacrilato (PA)			
85 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)			
75 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Bipolar	GC
85 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320 °C	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenzene (CW/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)			
50 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)			
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC

¹ Fibras *Stableflex*: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible.

² Longitud especial de 2 cm.

³ Extraído de la referencia [3].

Figura 1.12. Tipos de fibras comercializadas por Supelco (2015)

La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción, al igual que en las fibras de PA. Por el contrario, en las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo las de PDMS/DVB o CW/DVB, la principal interacción entre la fibra y los compuestos se produce por adsorción, por lo que son más adecuadas para la determinación de compuestos volátiles, ya que al ser analitos de bajo peso molecular, quedan retenidos con más facilidad en los poros de estos polímeros sólidos (Figura 1.13.).

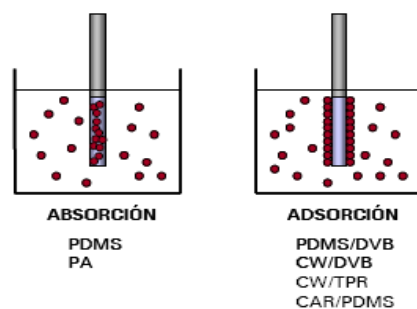


Figura 1.13. Clasificación de fibras según la extracción

1.4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Las diferentes técnicas para el análisis de los volátiles se basan en una cromatografía de gases acoplada a diferentes detectores, que normalmente es un detector de masas (GC-MS) (Flath y col., 1990; Wirth y col., 2001) y/o un olfactómetro (GC-O) (Högnadóttir y Rouseff, 2003; Brattoli y col., 2013).

La cromatografía de gases es una técnica en la cual los componentes de una mezcla se separan a partir de las diferencias de velocidad a la que son transportados a través de una fase fija (la llamada fase estacionaria) gracias a una fase móvil gaseosa, normalmente un gas inerte como el helio o el argón. La muestra o en el caso de este proyecto la fibra, se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y se volatiliza por las altas temperaturas del inyector. La elución se produce por el flujo de la fase móvil sobre la fase estacionaria líquida o sólida (Figura 1.14.).

Esta técnica permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas sin que la fase móvil interactúe con las moléculas del analito. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto en las mismas condiciones de análisis y su espectro de masas. Para la determinación de análisis cuantitativos se emplea la comparación de áreas o alturas de picos de un analito frente a las de los patrones.

Cuando la fase estacionaria es un sólido, la retención de los analitos se produce como consecuencia de la adsorción física. Esta cromatografía gas-sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas muy significativas (como consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular.

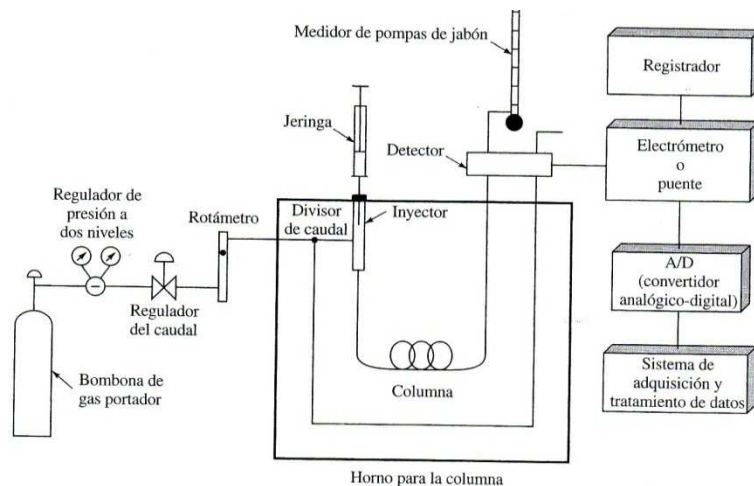


Figura 1.14. Esquema de un cromatógrafo de gases

Actualmente la cromatografía gaseosa más empleada es aquella en la que la fase estacionaria es un líquido, donde la distribución del analito se produce entre la fase móvil gaseosa y la fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

En la cromatografía de gases, la fase estacionaria (un líquido inmovilizado) está en el interior de una columna que suele ser una columna capilar. La longitud de estas columnas capilares es variable, de 2 a 60 metros, y están construidas normalmente en acero inoxidable. Suelen estar rellenas de sílice fundida especialmente pura, sin apenas contenido de óxidos metálicos. En el mismo proceso de obtención de la columna se recubre con una capa de poliimida, de forma que toda ella puede enrollarse en una forma helicoidal con un diámetro de unos pocos centímetros (10-30 cm) y puede introducirse en un horno. Tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320 μm (para columnas normales) y 150-200 μm para columnas de alta resolución. Las propiedades necesarias para una adecuada fase estacionaria líquida inmovilizada son: baja volatilidad, baja reactividad, estabilidad térmica y capacidad de separar los diferentes compuestos de la mezcla a analizar. Existen como mucho una docena de disolventes con estas características. Para elegir uno debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria. Las fases estacionarias de sílice fundida utilizadas actualmente son:

Polidimetilsiloxano ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi}$)_n, fase no polar de uso general para hidrocarburos, compuesto volátiles, drogas, esteroides y policlorobifenilos.

Poli(fenilmetildifenil)siloxano (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.

Poli(fenilmetil)siloxano (50% fenilo), para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.

Poli(trifluoropropildimetil)siloxano, para compuestos aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos.

Poli(dicianoalildimetil)siloxano, para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. El grosor de la película varía entre 0.1 y 5 μm ; un analito muy volátil requerirá una capa gruesa para aumentar el tiempo de interacción y separarlo más efectivamente. Para columnas típicas (diámetros internos de 0.25 o 0.32 mm) se emplean grosores de 0.25 μm .

La temperatura del horno es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición de los compuestos y, por lo general, se adapta a un valor igual o ligeramente superior a él. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas y siempre irá de menor a mayor temperatura. Así, el tiempo de elución (el tiempo del análisis) debe ser suficiente para que finalice la rampa de temperaturas y suele oscilar entre 2 y 30-40 minutos.

Los diferentes detectores que habitualmente van acoplados al cromatógrafo de gases para la determinación de compuestos volátiles son los siguientes:

1.4.1. Detector de masas

Actualmente es el que con más frecuencia se acopla al cromatógrafo de gases. La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones en fase gaseosa que se producen a partir de los compuestos de la muestra, bien por impacto de electrones o por ionización química, gracias a una fuente de ionización. Las fuentes de ionización utilizadas tienen energía suficiente para romper los enlaces químicos en la molécula de la muestra, pero no para descomponer esas moléculas en sus átomos. Éstas producen fragmentos, que también se pueden ionizar. Por lo tanto, de la fuente de iones salen los iones de las moléculas de la muestra (iones moleculares), fragmentos ionizados y moléculas no ionizadas. Los fragmentos y moléculas sin carga normalmente son eliminados de la fuente de iones por las bombas de vacío utilizadas para producir el ambiente de baja presión. Los iones, en cambio, pasan al detector multiplicador de iones donde se separan basándose en la proporción masa/carga (m/z) de la especie iónica (Figura 1.15.). Posteriormente los el sistema de análisis de datos genera una gráfica de la intensidad de los iones frente al valor m/z .

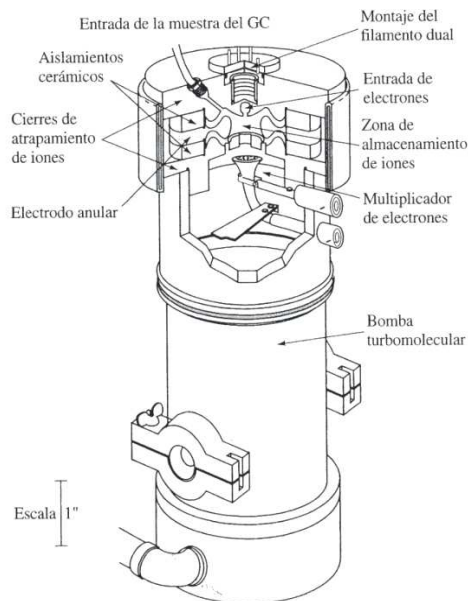


Figura 1.15. Esquema de un detector de masas

Los detectores espectrométricos de masas tienen generalmente varias formas de presentación de datos. Así encontramos los cromatogramas que registran la intensidad de todos los iones (una representación de la suma de las intensidades de todos los iones en función del tiempo), los cromatogramas que registran la intensidad de un ión seleccionado (una representación de la intensidad para uno o unos pocos iones en función del tiempo) y los espectros de masas de cada pico. Algunos instrumentos están equipados además con colecciones de espectros de masas para la identificación de los compuestos.

En este equipo se puede trabajar de dos modos diferentes para detectar los compuestos presentes en la muestra:

- *Full scan*: Esta forma de trabajo consiste en analizar un amplio rango de masas, dando como resultado un cromatograma de iones totales (*TIC*). A partir de este cromatograma se puede obtener el espectro de masas completo de cada pico, permitiendo la identificación del compuesto. Es una función útil cuando se desea información de compuestos no esperados y no se precisa gran sensibilidad. Se utilizan en análisis cualitativo. A partir de este cromatograma se puede aplicar la función *EIC* (*Extracted Ion Chromatogram*), que ayuda a optimizar la integración de los picos, evitando integrar picos donde aparezcan solapadas las señales de varios compuestos. Así, tras obtener el cromatograma *TIC*, como cada compuesto tiene un ión característico, se seleccionará este ión sobre el cromatograma *TIC* y así obtendremos un cromatograma donde sólo aparecerán los picos correspondientes a este ión (*EIC*).

- *SIR* (*Selected Ion Resolution*): Cuando buscamos un compuesto determinado y conocido en una mezcla, esta técnica permite analizar un rango de masas muy estrecho o bien, una única masa, de forma que se obtiene un cromatograma en el cual los picos que detecta son únicamente aquéllos que contiene la masa seleccionada. La función *SIR* aumenta considerablemente la

sensibilidad del equipo frente al *full scan*, ya que el espectrómetro de masas puede focalizarse durante más tiempo sobre un rango de masas menor (Alfaro, 2006).

Es importante señalar que no se debe confundir la función *SIR* con la función *EIC* (*Extracted Ion Chromatogram*). Con la función *SIR* es imposible obtener el cromatograma *TIC*, mientras que con la función *EIC* es necesario tener previamente el cromatograma *TIC*. En algunos casos, como en este proyecto, no se utilizará la función *SIR* porque se quiere detectar todos los compuestos presentes en las muestras.

1.4.2. Detector Olfactométrico

La olfactometría se basa en la identificación de un olor o del compuesto responsable del mismo por parte de un panelista entrenado (Brattoli y col. 2013). En la técnica de Cromatografía de Gases-Olfactómetro (CG-O) se consigue una separación previa de los compuestos responsables del olor mediante un cromatógrafo de gases antes de que lleguen al olfactómetro, consiguiendo que dichos compuestos se puedan oler uno a uno y descomponiendo el olor original de la muestra en múltiples olores. La identificación de compuestos mediante técnicas espectrométricas es muy común, pero conocer cuál de los compuestos es el que proporciona a la muestra un tipo de olor característico es un hecho diferente y en muchas ocasiones la nariz humana tiene una sensibilidad muy diferente a la de cualquier detector artificial. Comparando la respuesta del detector (MS) con la respuesta del panelista es fácil saber qué compuestos son y cómo huelen.

La parte más importante del olfactómetro es el dispositivo que permite al panelista percibir el olor, el llamado *sniffer port*, el cual tiene que proporcionar suficiente humedad al aire para impedir la sequedad de la nariz del panelista, manteniendo intacta su sensibilidad. La interfase entre el cromatógrafo de gases y el *sniffer port* debe estar a una temperatura suficientemente alta para impedir la condensación de los compuestos y el cono de salida debe ser cómodo para el panelista, pudiendo ajustarse el flujo de salida (Figura 1.16.).

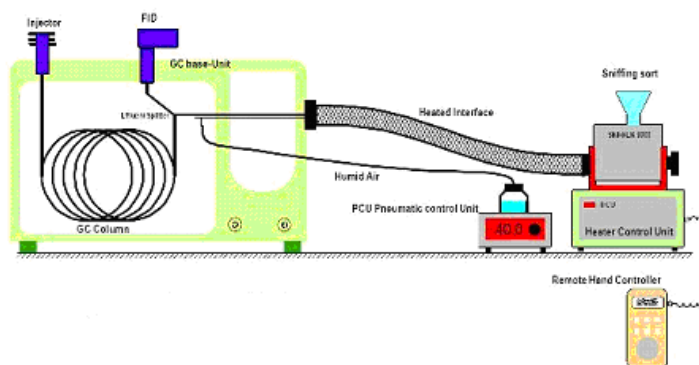


Figura 1.16. Esquema de un olfactómetro

Para que un olfactómetro sea seguro para el panelista, nunca se deben analizar muestras desconocidas. Así, antes de analizar una muestra mediante CG-O se debe conocer al menos el perfil de los principales componentes de la misma. El equipo debe estar colocado en un laboratorio de poco tránsito,

aislado de olores y ruidos, de tal manera que el panelista pueda estar concentrado. Cuando éste percibe los diferentes olores debe enviar una señal a un detector externo del sistema de datos del CG, que los va registrando hasta que al final del análisis se genera una gráfica similar a un cromatograma (odorograma). Los compuestos son fácilmente identificados superponiendo el cromatograma proporcionado por el detector FID y el odorograma.

Existen equipos en los que las señales sólo indican la presencia de un compuesto detectado por el panelista y otros en los que la intensidad de la señal es proporcional a la intensidad del olor percibido. En este último caso la señal procede de un generador progresivo de señales tipo *Fingerspan*, en el cual el panelista extiende los dedos sobre un cursor según la intensidad del olor, de tal manera que cuando los extiende completamente se considera el 100 % de intensidad (Figura 1.17.).



Figura 1.17. Panelista

En el CG-O existen varios tipos de procesado de datos, uno de ellos es el AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*). Este tipo de método requiere preparar la muestra en sucesivas diluciones. El panelista tiene que evaluar todas las diluciones y determinar en cada análisis el tiempo de salida de cada olor específico. Los resultados dependen del nivel de detección e identificación del panelista.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se centra en el estudio comparativo de los compuestos volátiles que integran el aceite esencial del flavedo de los frutos de dos variedades de clementinas, la variedad Clemenules y la variedad Clemenpons. Ambas son variedades cuyos frutos son morfológicamente indistinguibles, ya que son muy semejantes en cuanto al tamaño, peso, diámetro, relación diámetro/altura, tamaño de la corteza, color, porcentaje de zumo y ausencia de semillas. Su periodo de cosecha también es muy semejante, aunque Clemenpons es más temprana, ya que suele adelantarse quince días respecto a Clemenules y su campaña finaliza también dos o tres semanas antes. Hasta el momento no es posible distinguir los frutos de ambas variedades.

Los objetivos de este trabajo fueron:

1- Saber si es posible diferenciar los aceites esenciales de los frutos de Clemenules y Clemenpons mediante un estudio metabolómico no dirigido del perfil volátil de estos aceites, empleando muestras recogidas durante todo el periodo de campaña de dos años consecutivos y en dos localizaciones diferentes.

2- Si se demostrara que es posible diferenciar ambos aceites y, por lo tanto, diferenciar los frutos de ambas variedades, se procedería a la identificación de los compuestos volátiles responsables de esa diferencia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

En 2009 los frutos fueron recogidos a partir de árboles de Clemenules y Clemenpons (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) situados en la parcela número 5 (P5) de la Estación Experimental del *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA), situada en Moncada, Valencia. En el segundo año del ensayo, 2010, los frutos fueron recogidos a partir de la misma parcela del año anterior, así como a partir de otra parcela perteneciente a la colección de germoplasma (BG) del IVIA. Esta Estación Experimental tiene un clima Mediterráneo (lluvia total de 72.7 y 82.4 mm y una temperatura media de 14.8 y 12.5 °C entre octubre y diciembre de 2009 y 2010, respectivamente). Los árboles de ambas variedades crecieron bajo las mismas condiciones ambientales, de suelo y de prácticas agrícolas y de orientación, ya que ambas presentan la orientación de las filas de árboles N-S y la de las caras de los árboles E-O. No obstante, en el banco de Germoplasma los árboles están más separados entre sí, con lo cual la influencia de la orientación en el desarrollo del árbol y sus frutos es menos importante para esta parcela que para la P5.

3.2. Toma de muestras

En 2009, los frutos de Clemenules y Clemenpons fueron recogidos durante ocho días diferentes a partir de la parcela 5: 7/10/2009, 20/10/2009, 27/10/2009, 3/11/2009, 10/11/2009, 18/11/2009, 25/11/2009 y 2/12/2009 (para esta última fecha solo se tomaron muestras de Clemenules, porque ya se había acabado la campaña para Clemenpons). Los frutos de Clemenules y Clemenpons en 2010 fueron recogidos durante siete días diferentes, tanto en la parcela 5 como en el banco de germoplasma: 21/10/2010, 28/10/2010, 3/11/2010, 11/11/2010, 18/11/2010, 25/11/2010 y 2/12/2010. Cada día de recogida se tomaban aproximadamente 15 frutos por variedad y por localización, procedentes de tres árboles por variedad para la Parcela 5 y de dos árboles por variedad para el Banco de Germoplasma.

Una vez en el laboratorio, se preparaban dos muestras por cada variedad y también, solo en 2010, por cada localización. Para la obtención de cada muestra se tomaban cinco frutos de cada variedad de un peso medio de 80 g, sin ningún daño aparente y de manera aleatoria. A partir de estos cinco frutos se cortaban cerca de 50 gramos de corteza, en trozos de aproximadamente 4 cm², a los cuales se les eliminaba el albedo con ayuda de una cuchilla, quedando solo el flavedo, que a continuación se introducía en un frasco de plástico para su congelación a -80 °C hasta la extracción del aceite esencial, que se realizaba como máximo en los seis días siguientes a su recogida. Cada frasco pasaba a ser considerado ya una muestra. Así pues, durante 2009 se obtuvieron 30 muestras, cuatro muestras (dos de cada variedad) por día de recogida (8 días), menos el último día que solo se recogieron dos muestras para Clemenules. Durante 2010 se obtuvieron 56 muestras, ocho muestras (cuatro de cada variedad) por día de recogida (7 días), ya que procedían de dos localizaciones diferentes.

3.3. Obtención del aceite esencial

En el momento de la extracción del aceite esencial el material de cada frasco fue descongelado a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se introdujo en un matraz redondo de 250 mL. Se añadieron 150 mL de agua destilada a cada matraz, que se acopló a un sistema de destilación Clevenger (Figura 1.7). Cada matraz se calentó a 60 °C durante tres horas. Al cabo de este periodo se recogió la muestra del aceite, normalmente de 0.9 mL de volumen. El rendimiento de todas las extracciones osciló entre el 1.0-1.1 % (mL/100g de peso fresco). Estas muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta el momento de su análisis. Se realizaron 86 análisis en total, uno de cada una de las muestras.

3.4. Condiciones del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas

El análisis del aceite esencial de cada muestra fue realizado en un equipo de Cromatografía de Gases 6890N acoplado a un Espectrómetro de Masas 5975B (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) equipado con un automuestreador COMBI-PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) (Figura 3.1).



Figura 3.1. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas

Las muestras fueron inicialmente diluidas 1:100 con diclorometano, para lo cual se diluyeron 4 μL de aceite esencial en 396 μL de diclorometano. A continuación se tomaron 10 μL de esta solución y se introdujeron en un vial de espacio de cabeza de 10 mL con tapón de rosca junto con 990 μL de agua mili-Q. La concentración final de aceite esencial fue, por tanto, de 100 nL/mL, esto es, 100 ppm. Los compuestos volátiles se capturaron por microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza (*HS-SPME*) con las condiciones que se detallan a continuación. Inicialmente se incubaron las muestras a 50 °C durante 10 min en agitación (500 rpm). A continuación

se introdujo en el vial la fibra de SPME (con un recubrimiento de 65 μm de grosor de una mezcla de divinilbenceno y polidimetilsiloxano) durante 20 min, en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Finalmente, los volátiles adsorbidos en la fibra se desorbieron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 250 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. Posteriormente a la desorción, la fibra se introdujo en una estación de acondicionamiento a 250 $^{\circ}\text{C}$ durante otros 5 min a fin de evitar contaminaciones cruzadas. Para el cromatógrafo de gases se utilizó una columna capilar J&W Scientific DB-5ms de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 1 μm de espesor de la fase estacionaria constituida por un 5 % de fenilpolisiloxano y un 95 % de dimetilpolisiloxano (Agilent Technologies, USA). El tiempo de análisis fue de 49 min, con una temperatura inicial del horno de 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, luego se aumentó la temperatura 5 $^{\circ}\text{C}$ por min hasta alcanzar los 250 $^{\circ}\text{C}$, manteniéndose así durante 5 min. El flujo de Helio fue de 1.2 mL/min. En cuanto al detector de Masas, se trabajó en modo impacto electrónico, con 70 eV de energía de ionización y 230 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura de la fuente de ionización. La adquisición fue llevada a cabo en modo *scan*, haciéndose un barrido entre las masas de 35 a 220 m/z (siete *scans* por segundo). Considerando que el peso molecular del compuesto identificado con mayor masa (nootkatona) fue de 218 Da, no fue necesario ampliar el rango de masas. Los cromatogramas y los espectros de masas fueron registrados mediante el software *Enhanced ChemStation Data Analysis* para CG-EM (Agilent). La totalidad de los picos cromatográficos fueron procesados mediante un análisis no dirigido con el software *MetAlign* (desarrollado en Wageningen UR, Holanda). Dicho procesamiento consistió en el alineamiento de todos los cromatogramas y posterior cuantificación mediante la altura de cada uno de los picos del cromatograma, tanto conocidos como desconocidos. Posteriormente al análisis estadístico multivariante de estos datos, para aquellos picos que se consideraron de particular interés, es decir, los más diferentes entre ambas variedades, se hizo una segunda cuantificación más precisa en base al área de estos picos mediante el software *Enhanced ChemStation Data Analysis* con posterior revisión manual de cada pico.

3.5. Identificación de los compuestos

Los compuestos se consideraron identificados de forma inequívoca cuando su espectro de masas se correspondía al de ese compuesto en la base de datos de espectros de masas NIST 05 (*National Institute of Standards and Technology*) y además su tiempo de retención fue el mismo que el del patrón comercial inyectado en las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. Los patrones fueron comprados a las empresas Sigma-Aldrich Química (Madrid) y Extrasynthese (Francia). Algunos compuestos fueron exclusivamente identificados por la homología de su espectro de masas con el de los compuestos en la base de datos NIST 05 (ver Tabla 1 y Tabla 2), ya que son productos que no están disponibles comercialmente; por lo tanto su identificación debe ser considerada como tentativa.

3.6. Cuantificación de los compuestos

Como es habitual en trabajos de metabolómica, se hizo una cuantificación relativa de los compuestos, esto es, los resultados de una muestra en particular se expresan como la razón de los niveles de cada uno de los metabolitos detectados en esa muestra respecto a los niveles de cada uno de ellos en una muestra de referencia analizada en el mismo ensayo. Para las muestras de 2009 se tomó como referencia la muestra Clemenules P5-1 (la réplica biológica n $^{\circ}$ 1 de Clemenules recolectada más temprana en la parcela 5 de ese año, eso es, el día 7/10/2009). Para las de 2010 se tomó como referencia la muestra Clemenules BG-1 (la réplica biológica n $^{\circ}$ 1 de Clemenules recolectada más temprana en la parcela Banco de Germoplasma de ese

año, eso es, el día 21/10/2010). Esta muestra de referencia se inyectó regularmente cada 5-6 muestras a lo largo de todo el ensayo, y fue utilizada para corregir los sesgos debidos a las oscilaciones en la sensibilidad por deriva del detector y, sobre todo, las debidas al envejecimiento de la fibra.

Para el análisis del cromatograma con *MetAlign* se utilizaron todos los iones del espectro de masas de cada compuesto. Para el análisis con *Enhanced ChemStation Data Analysis* de los picos seleccionados se escogió un ión con relación carga/masa (m/z) específico para cada compuesto. Se seleccionó aquel ión que fuera lo suficientemente específico como para permitir una buena integración en esa región del cromatograma y que tuviera la mejor relación señal/ruido.

3.7. Análisis estadístico

Dada la gran complejidad de la información extraída de los cromatogramas mediante el abordaje no dirigido (más de 11000 datos para cada cromatograma), para su interpretación se recurrió a análisis multivariante. Inicialmente se realizó un análisis de componentes principales (PCA), tanto de todas las muestras juntas como de cada año por separado. Posteriormente también se hicieron tres análisis PLS-DA (análisis de mínimos cuadrados parciales o proyección de estructuras latentes-análisis discriminante), uno incluyendo todas las muestras del 2009 y del 2010, otro incluyendo todas las muestras del 2009 y el último con todas las muestras del 2010. En ambos tipos de análisis, la razón de los niveles de cada uno de los metabolitos detectados en cada muestra respecto a los niveles de cada uno de ellos en la muestra de referencia fue transformada con el logaritmo en base 2. La normalización para los análisis PCA y PLS-DA fue *Pareto*. Para todos estos análisis se usó la versión SIMCA-P version 11 (Umetrics, Umea, Suecia). Una vez identificados mediante estos análisis los metabolitos diferenciales entre las dos variedades, se hizo un análisis estadístico *t* de Student para ver la significación estadística de las diferencias encontradas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los frutos de las variedades Clemenules y Clemenpons son indiferenciables desde el punto de vista morfológico. Ambas tienen un peso, diámetro, forma, grosor de corteza y color muy semejante. Hasta ahora, ninguna investigación realizada había permitido distinguir los frutos de ambas variedades. A nivel popular, los agricultores siempre han afirmado que los frutos de la variedad Clemenpons tienen un aroma anisado que no logran percibir en los de la variedad de Clemenules. En un trabajo previo de los directores de este trabajo se consiguió diferenciar el aroma del aceite esencial de Clemenules y Clemenpons del de otras variedades de mandarinas como Arrufatina y Clemensol, pero fue imposible distinguir entre estas dos primeras variedades. Para dicho trabajo se comparó el aceite esencial de los frutos de todas estas variedades durante una sola campaña y en una sola localización (González-Mas y col., 2010). Se pudo apreciar que los aceites esenciales de Clemenules y Clemenpons tenían un alto porcentaje del monoterpeno limoneno, de alrededor de un 94%. Además ambos tipos de aceites contenían otros terpenos, principalmente monoterpenos, con porcentajes inferiores al 1.5%, destacando el sabineno, otro monoterpeno hidrocarbonado.

Con el fin de saber si existen diferencias entre el aceite esencial de Clemenules y Clemenpons, se ha diseñado otro experimento que aborda un número mucho mayor de muestras, ya que incluye el análisis de muestras de ambas variedades procedentes de dos campañas consecutivas. Además en la segunda campaña se tomaron muestras de árboles en dos localizaciones diferentes, la parcela 5 y el banco de Germoplasma, ambas situadas en el IVIA (Moncada, Valencia). Los resultados de dicho estudio se describen en este trabajo.

4.1. Extracción y análisis cromatográfico de los compuestos volátiles del aceite esencial de la variedad Clemenules y Clemenpons

La extracción de los compuestos volátiles de los aceites se llevó a cabo mediante la técnica de microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*: SPME) sobre el espacio en cabeza (*head space*: HS). En esta técnica dichos compuestos quedan atrapados en una fibra, que posteriormente se inyecta en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Actualmente, la técnica HS-SPME es la más utilizada para la extracción de los compuestos volátiles del zumo de cítricos (González-Mas y col., 2011; Rambla y col., 2014), mientras que los aceites esenciales se suelen inyectar directamente en el cromatógrafo de gases, diluidos en un disolvente orgánico (Fanciullino y col., 2006; Viuda-Martos y col., 2009). Tan solo Elmaci y Onogur (2012) han utilizado una técnica de espacio en cabeza para el estudio del aroma de la corteza de mandarinas. Sin embargo, en el presente trabajo se decidió emplear la técnica extractiva HS-SPME, debido tanto a los excelentes resultados obtenidos en la extracción de compuestos volátiles de zumos de cítricos como a las ventajas derivadas de no inyectar la muestra disuelta en un disolvente orgánico, el cual podría causar interferencias con los analitos de interés al ser introducido en el sistema cromatográfico.

Con el objetivo de obtener y comparar los perfiles metabólicos de los compuestos volátiles de los frutos Clemenules y Clemenpons se realizó la extracción y el análisis cromatográfico de 86 muestras procedentes de los aceites esenciales del flavedo de ambas variedades. El abordaje del estudio de los 86 cromatogramas correspondientes se llevó a cabo mediante un análisis no dirigido de todos los picos

cromatográficos (más de 11000 datos *-features-* por cromatograma) con el programa informático *MetAlign* (Wageningen, UR). Este programa es una herramienta muy eficaz para el análisis, la alineación y la comparación de conjuntos de datos cromatográficos *full-scan* basados en la espectrometría de masas. El término “no dirigido” significa que todos los datos y, por lo tanto, todas las señales (picos) detectados en los cromatogramas de ambas variedades fueron tenidos en cuenta, sin ningún tipo de discriminación previa ni descarte, independientemente de la posibilidad o no de identificar los compuestos correspondientes a estas señales. Este estudio permite generar una tabla de datos con la abundancia de cada uno de los picos en todos cromatogramas, corrigiendo pequeñas oscilaciones de los tiempos de retención de los picos en cada una de las muestras, ya que este programa se encarga de alinear los cromatogramas. Gracias a este estudio ‘no dirigido’ es posible evidenciar la existencia de diferencias entre muestras, pero en el caso concreto de este trabajo el manejo de la gran cantidad de datos obtenidos mediante el programa *MetAlign* no se pudo realizar mediante los métodos clásicos de estadística, ya que el número de variables (*features*) era mucho mayor que la de las observaciones (muestras). Para la correcta interpretación de tal volumen de datos fue necesario recurrir a análisis estadísticos multivariantes, que se describen en los siguientes dos apartados.

4.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Generalmente, el estudio estadístico multivariante más común es el análisis de componentes principales (PCA), así que se realizó un PCA con todas las muestras objeto de estudio. Al estudiar dicho PCA se observó una clara tendencia de las muestras a separarse por variedades en la mayoría de los ensayos, aunque no era posible separarlas totalmente, por lo que dicho análisis no fue concluyente (Figura 4.1). En esta figura las muestras de la variedad Clemenules aparecen coloreadas en verde y las de Clemenpons en azul. Este análisis no fue determinante debido a la gran cantidad de parámetros introducidos: dos años de recolección (2009/2010), dos variedades de frutos (Clemenules/ Clemenpons), varios estadios de maduración (1-8 en 2009; 1-7 en 2010) y dos parcelas en la cosecha del año 2010: Parcela 5 (P5)/ Banco de Germoplasma (BG).

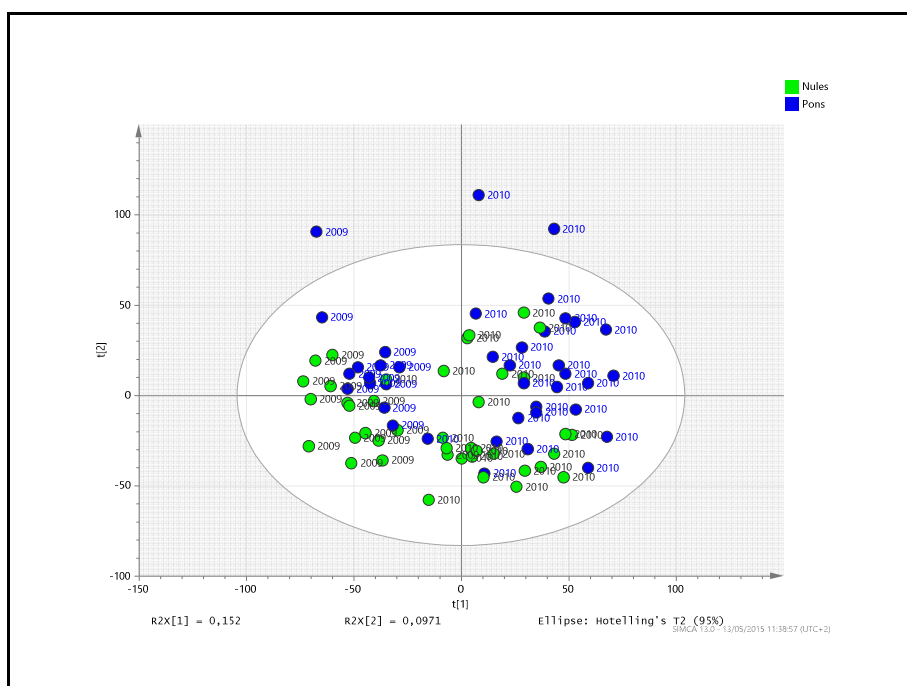


Figura 4.1. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras de 2009 y 2010.

Así pues, se procedió a la realización de dos PCAs diferentes para las muestras recolectadas cada año. La figura 4.2 muestra el PCA con las muestras recolectadas en el año 2009 y la figura 4.3 el PCA con las muestras recolectadas en el año 2010, ambos normalizados a varianza unitaria. La varianza es una medida de la dispersión de los datos; al ser unitaria implica que todos los compuestos tienen el mismo peso a la hora de hacer el análisis, tanto los de dispersión grande entre las dos variedades como los de dispersión pequeña (Jolliffe, 2002).

En el PCA del 2009 (Figura 4.2), en el que se incluyen todas las muestras de ese año, correspondientes únicamente a la parcela 5 (P5), se observa perfectamente que la segunda componente (PC2) separa la variedad Clemenules (coloreadas en verde) de la Clemenpons (coloreadas en azul) y explica el 14.3 % de la varianza de los datos, es decir, que solo el 14.3% de la varianza existente en las muestras del 2009 permitía diferenciar entre ambas variedades (Figura 4.1). La primera componente (PC1), en el caso de la variedad Clemenules determina el estado de maduración (1-7).

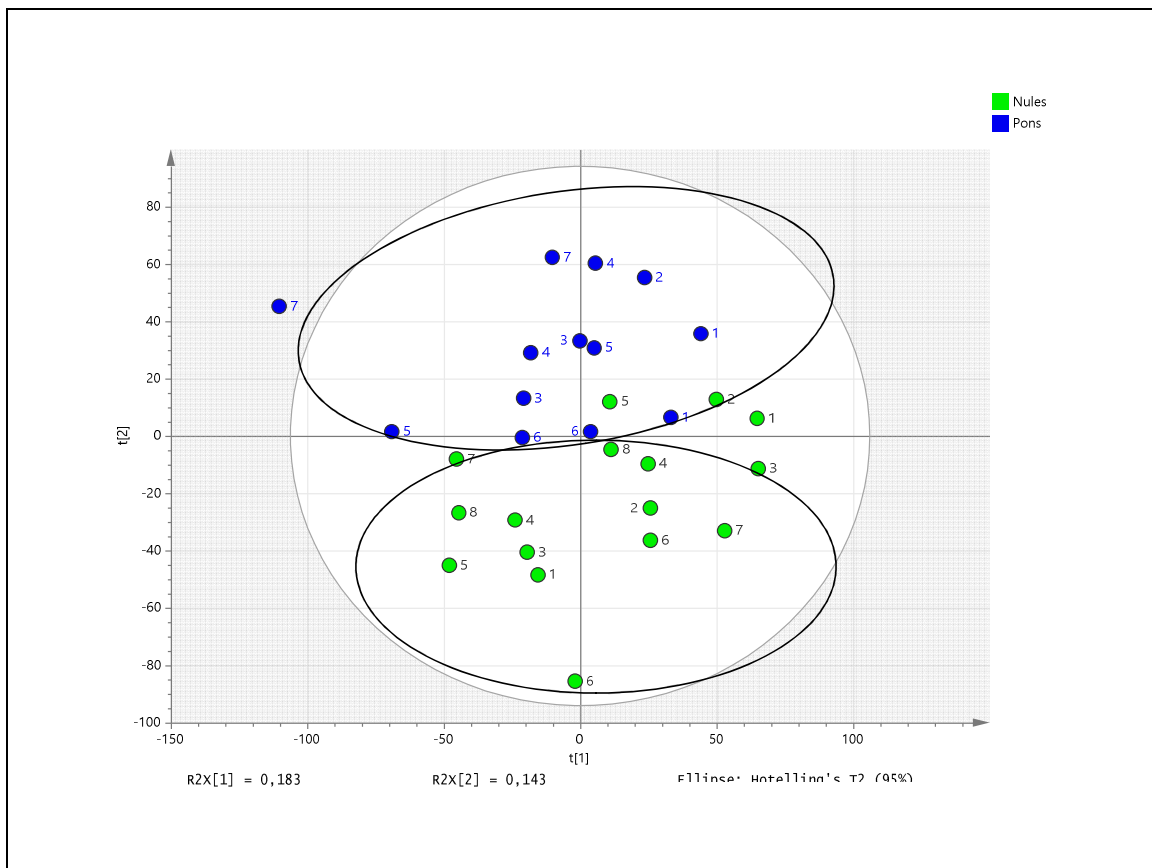


Figura 4.2. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7), el (8) no se mostró

Sin embargo, al realizar el PCA con las muestras del año 2010, en el que se incluyen los datos de dos localizaciones diferentes (P5 y banco de germoplasma), no es posible conseguir una componente que distinga ambas variedades (Figura 4.3.).

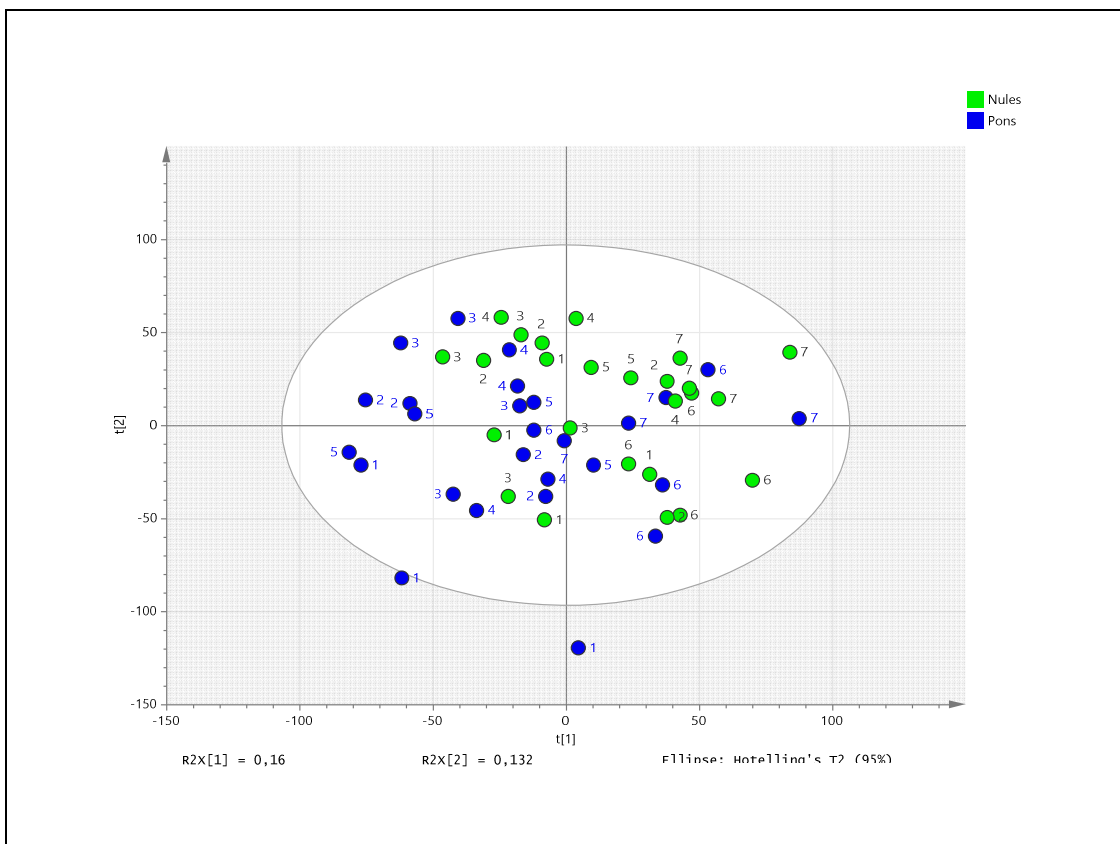


Figura 4.3. Análisis de PCA con los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7)

Con el objetivo de conseguir una componente que distinguiera las variedades Clemenules y Clemenpons según su contenido en compuestos volátiles, tal y como se había logrado con las muestras recolectadas en el año 2009, se realizaron por separado los PCAs con los datos del año 2010 de cada una de las parcelas: la parcela 5 (P5) y el banco de Germoplasma (BG). Así se observó que trabajando sólo con las muestras de la P5 del año 2010 fue de nuevo imposible encontrar una componente que lograra diferenciar las variedades objeto de estudio (datos no mostrados). Sin embargo, la componente 1 (PC1) del PCA llevado a cabo con los datos obtenidos a partir de la nueva localización BG separó claramente ambas variedades explicando el 19.4% de la varianza (Figura 4.4).

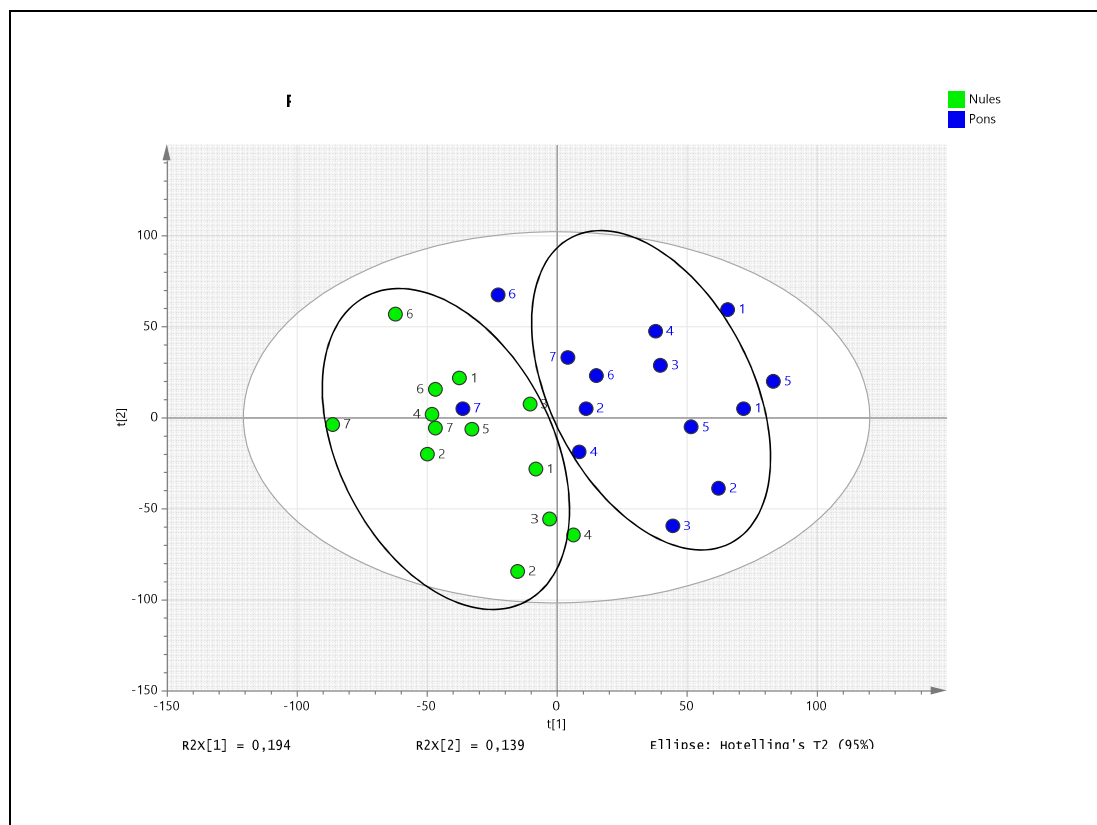


Figura 4.4. Análisis de PCA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010 del Banco de Germoplasma. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7)

A la vista de estos estudios metabolómicos se puede concluir que el PCA es una herramienta estadística lo suficientemente potente como para separar las variedades Clemenules y Clemenpons, en función de su contenido en compuestos volátiles y de muestras recolectadas en el año 2009 en la parcela 5. Sin embargo no es útil para distinguir ambas variedades al año siguiente, al proceder las muestras de dos parcelas diferentes.

4.3. Proyección de Estructuras Latentes y Análisis Discriminante (PLS-DA)

Con el fin de obtener un análisis estadístico más concluyente, en el que participaran todas las variables, se decidió realizar un análisis de mínimos cuadrados parciales o proyección de estructuras latentes (PLS) combinado con un análisis discriminante (DA) y utilizando una varianza tipo *Pareto* (Jolliffe, 2002).

Un análisis PLS es un análisis en el que se crea una nueva variable, llamada variable latente, que facilita encontrar las diferencias entre dos matrices de datos, en este caso, los datos de los cromatogramas de Clemenules y los datos de los cromatogramas de Clemenpons. Para este estudio PLS-DA esta nueva variable fue el tipo de variedad y a cada una de las dos variedades se le dio un valor.

A su vez el análisis discriminante (DA) proporciona información sobre qué variables permiten diferenciar a las dos matrices de datos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a cada matriz, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente. Las variables que se supone que permiten diferenciar los grupos se utilizan como variables

independientes o variables de clasificación (también llamadas variables discriminantes). Deben ser variables cuantitativas continuas, que en este trabajo serán las alturas de los picos de los cromatogramas.

En este análisis se utilizó una varianza de tipo *Pareto*, y no varianza unitaria, de tal manera que los compuestos con mayor dispersión de datos entre ambas variedades tuvieran más importancia que los compuestos con menor dispersión de datos a la hora de determinar las diferencias, pero sin impedir totalmente que la influencia de estos últimos quedase reflejada en los resultados de este análisis estadístico (Jolliffe, 2002).

Al estudiar el PLS-DA con todas las muestras juntas del 2009 y del 2010 se observó que no era posible separarlas totalmente según la variedad (Figura 4.5). No obstante, cuando se hizo un PLS-DA con los datos de cada año de forma independiente se observó que era posible diferenciar las muestras de ambos tipos de variedades por su contenido en compuestos volátiles, tanto en el año 2009 como en el año 2010 (Figura 4.6 y Figura 4.7).

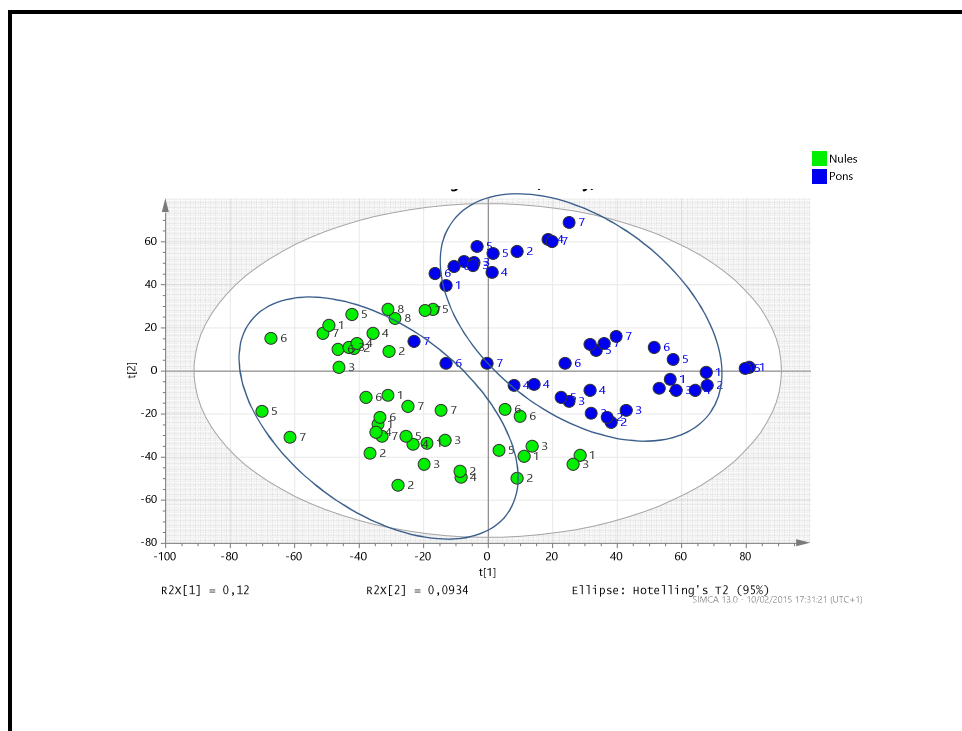


Figura 4.5. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del 2009 y del 2010. 1-8 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (8)

El PLS-DA de los datos obtenido a partir de las muestras del año 2009 muestra que la combinación de la primera componente (PC1), que explica el 12 % de la varianza de los datos, con la segunda (PC2), que explica el 6.9 % de la varianza, permite distinguir perfectamente entre ambas variedades (Figura 4.6). En este caso ambas componentes están rotadas aproximadamente 30 grados.

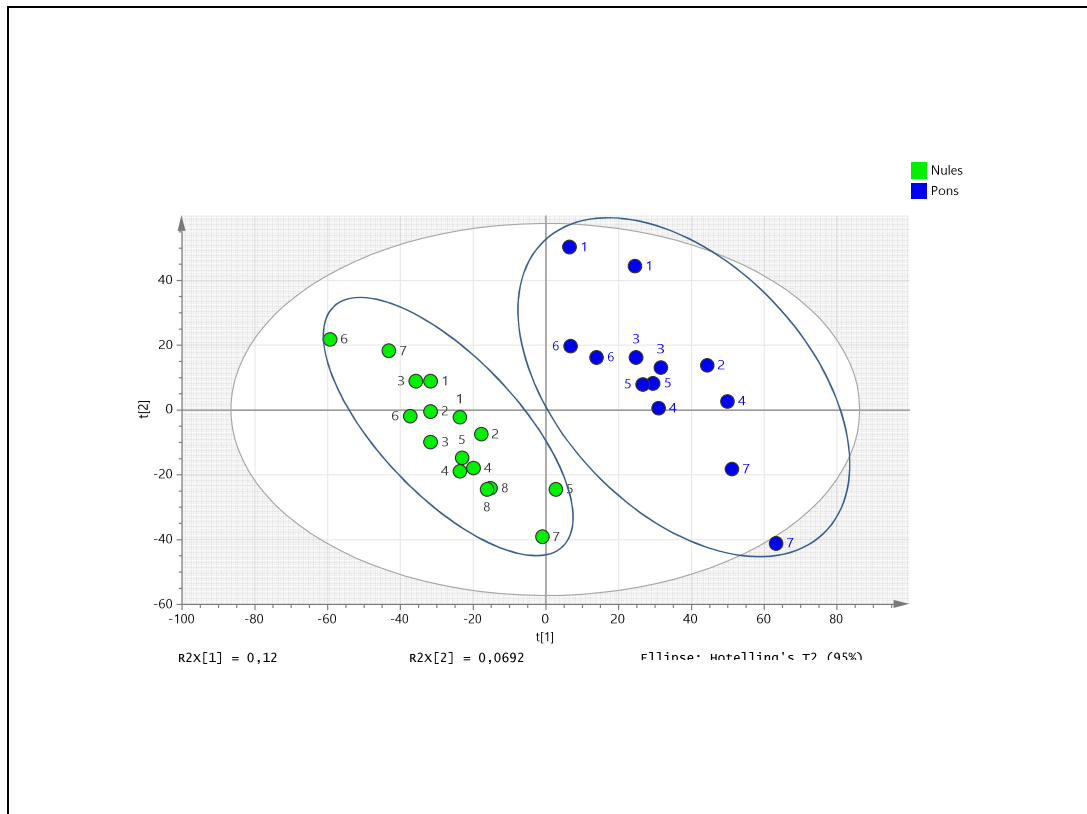


Figura 4.6. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2009. 1-8 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (8)

El PLS-DA realizado con los datos procedentes de las muestras recolectadas en el año 2010, tanto en la parcela 5 como en el Banco de Germoplasma, fue capaz de separar perfectamente ambas variedades a través de la combinación de la primera componente (PC1), que explica el 12.8 % de la varianza de los datos, con la segunda componente (PC2), que explica el 7.4 % de la varianza (Figura 4.7). Como en el caso anterior, las componentes aparecen rotadas. La combinación de estas dos componentes también permite distinguir en cierta medida los estadios de maduración de los frutos recolectados, de modo que las muestras de recolección más temprana (1-3) tienden a estar situados abajo a la derecha y las recolectadas más tardíamente (5-7) arriba a la izquierda.

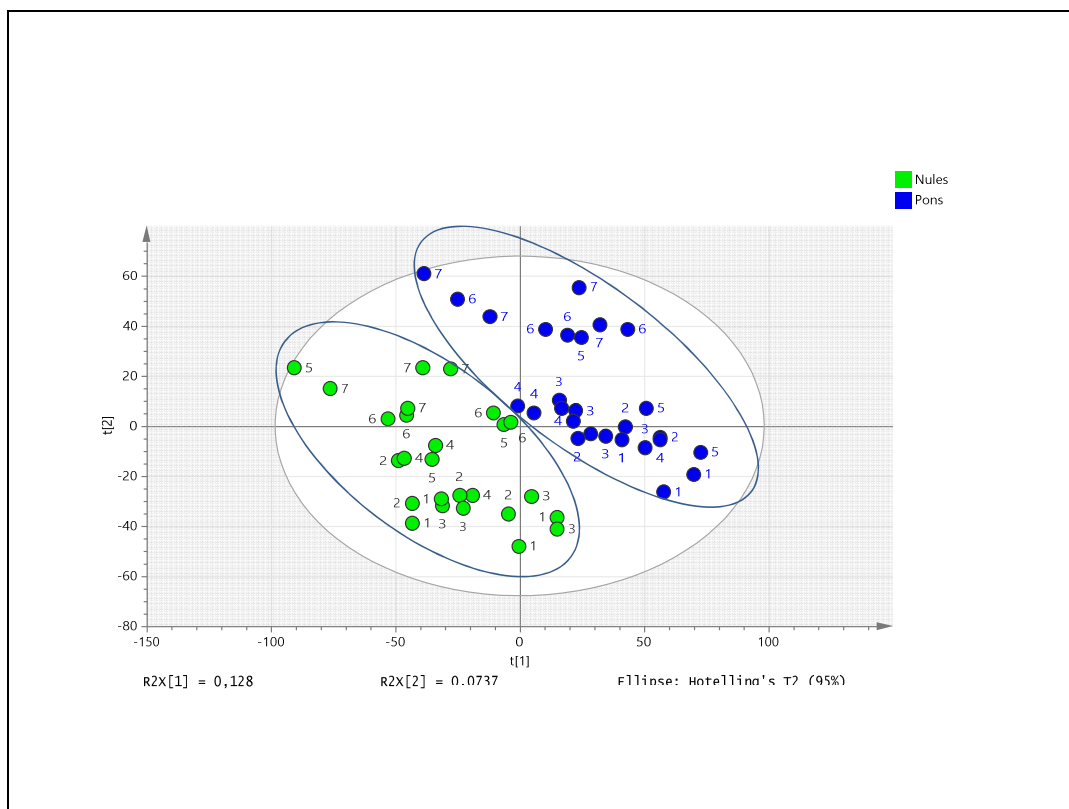


Figura 4.7. Análisis PLS-DA de los datos obtenidos a partir de las muestras del año 2010. 1-7 son los estados de maduración de menos (1) a más maduración (7)

4.4. Identificación de los compuestos diferenciales entre la variedad Clemenules y Clemenpons

Una vez obtenido un análisis estadístico capaz de diferenciar metabólicamente los aceites esenciales de ambas variedades, se procedió a la identificación de los compuestos volátiles responsables de estas diferencias, tanto en las muestras recolectadas en el año 2009 como en las del año 2010.

Solamente aquellos compuestos diferenciales que fueron comunes en ambos años, se consideraron como discriminantes entre los dos tipos de aceites esenciales. Las diferencias entre los compuestos volátiles fueron diferencias de tipo cuantitativo y no de tipo cualitativo, es decir, ambos aceites contenían los mismos compuestos volátiles, pero algunos de estos compuestos tenían diferente concentración según la variedad. A continuación se enumeran cuáles son estos compuestos que presentan diferencias cuantitativas entre ambas variedades y que permiten distinguir ambos aceites.

4.4.1. Compuestos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules

La tabla 1 muestra los quince compuestos volátiles que estaban en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenpons que en el de Clemenules. En dicha tabla también se indica el ratio entre la abundancia (medida como altura de los picos cromatográficos) de dichos compuestos en el aceite esencial de Clemenpons y la abundancia de los mismos en el aceite esencial de Clemenules.

Tabla 1. Compuestos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules

Nombre del compuesto	Tr (min)	Tipo de compuesto ^a	Olor según Flavornet ^b	Ratio Clemenpons/Clemenules ^c
3-careno	24.31	mt hdc	limón	1.44 ± 0.36
α-terpineno	24.55	mt hdc	limón	1.26 ± 0.29
γ-terpineno	25.93	mt hdc	turpentina (pino)	1.43 ± 0.39
no identificado	28.16	mt oxig	-	2.79 ± 1.89
no identificado	28.91	mt oxig	-	3.32 ± 2.79
<i>trans</i> -carveol	31.29	mt alc	alcaravea (anisado)	2.11 ± 0.79
<i>p</i> -ment-1-en-9-al ^d	31.47	mt ald	-	1.91 ± 0.80
no identificado	33.49	mt oxig	-	2.03 ± 0.97
acetato de α-terpinilo	34.98	mt est	cera	1.68 ± 0.51
no identificado	36.64	mt oxig	-	1.71 ± 0.55
no identificado	38.64	sq hdc	-	1.13 ± 0.15
α-humuleno	38.71	sq hdc	madera	1.12 ± 0.18
no identificado	39.40	sq hdc	-	1.62 ± 0.49
no identificado	39.89	sq hdc	-	1.43 ± 0.41
α-sinensal ^d	43.90	sq ald	fresco (dulce)	1.83 ± 0.45

^amt hd= monoterpeno hidrocarbonado; mt oxig= monoterpeno con función oxigenada; mt alc= monoterpeno alcohólico; mt ald= monoterpeno aldehídico; mt est= monoterpeno esterificado; sq hdc= sesquiterpeno hidrocarbonado; sq hdc= sesquiterpeno hidrocarbonado, sq= sesquiterpeno aldehídico. ^bCornell University, 2004. ^cLas medias de las abundancias para cada uno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre ambas variedades, $p < 0.05$, según *t* de Student. ^dcompuesto detectado tentativamente.

Diez de estos compuestos diferenciales son de naturaleza monoterpénica, estando presentes en los aceites de Clemenpons en una cantidad entre 3.3 y 1.3 veces superior que en los aceites de Clemenules. En concreto, tres de ellos son los monoterpenos hidrocarbonados 3-careno, α-terpineno y γ-terpineno, mientras que los otros siete son monoterpenos oxigenados, de los cuales se han identificado sin ambigüedad dos de ellos, el *trans*-carveol y el acetato de α-terpinilo, y un tercer compuesto, *p*-ment-1-en-9-al, que se ha identificado tentativamente solo por su espectro de masas, ya que no existe el patrón comercial (Figuras 4.8, 4.9 y 4.10).

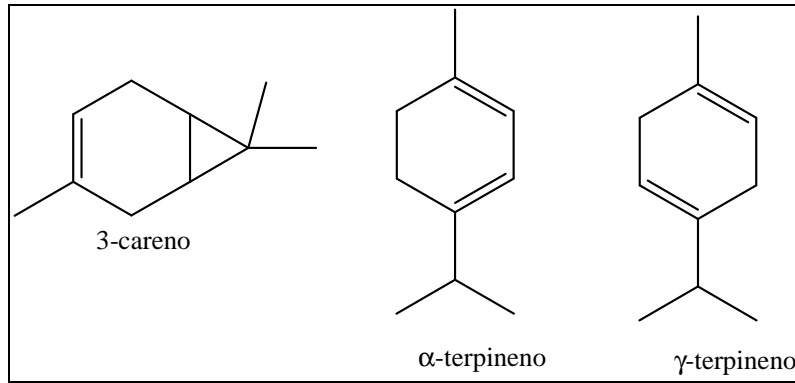


Figura 4.8. Monoterpenos hidrocarbonados identificados

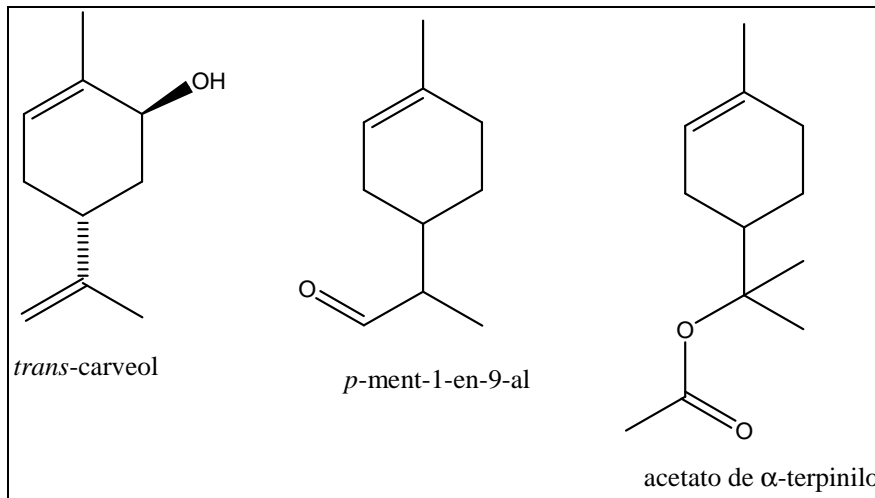


Figura 4.9. Monoterpenos oxigenados identificados

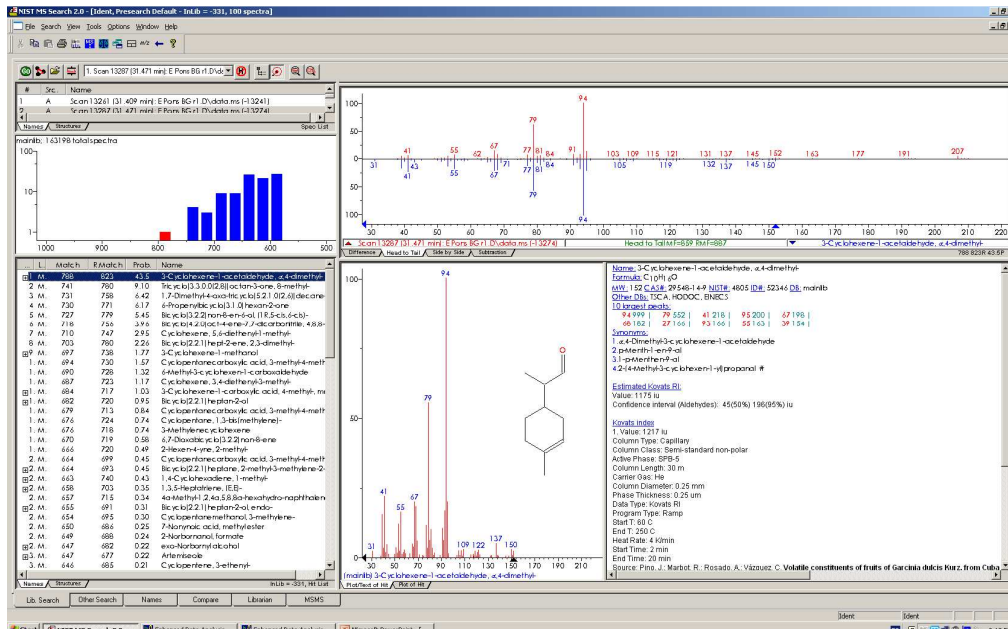


Figura 4.10. Información proporcionada por la NIST sobre el compuesto con $t_r=31.47$ min

Se sabe que los cuatro monoterpenos sin identificar son oxigenados por la homología de su espectro de masas con el de varios monoterpenos oxigenados, de

acuerdo con la base de datos NIST; sin embargo, estos cuatro compuestos no muestran una probabilidad de semejanza muy elevada con respecto a ninguno de los compuestos propuestos por la NIST, por lo que no es posible identificarlos, ni siquiera tentativamente (Figura 4.11).

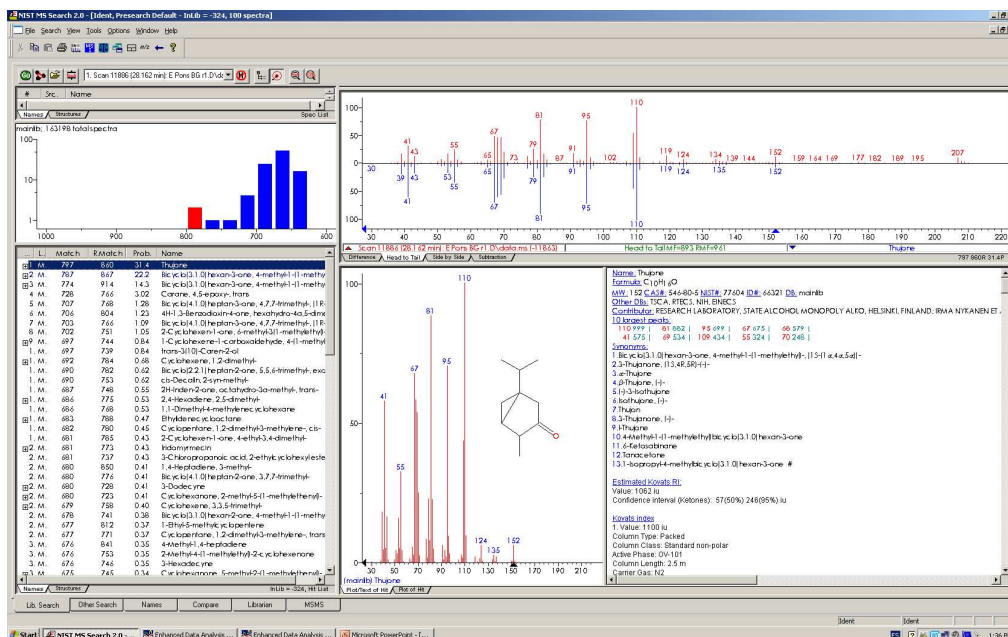


Figura 4.11. Información proporcionada por la NIST sobre el compuesto con tr= 28.16 min

El resto de compuestos diferenciales son sesquiterpenos: cuatro hidrocarbonados, de los cuales solo se ha podido identificar sin ambigüedad el α -humuleno, y un sesquiterpeno aldehídico, el α -sinensal, que solo ha podido ser identificado de forma tentativa en base a su espectro de masas, ya que no es posible adquirir su patrón de forma comercial (Figura 4.12). Estos cinco compuestos sesquiterpénicos no llegan a duplicar su concentración en Clemenpons con respecto a Clemenules, de acuerdo con el ratio mostrado en la tabla 1.

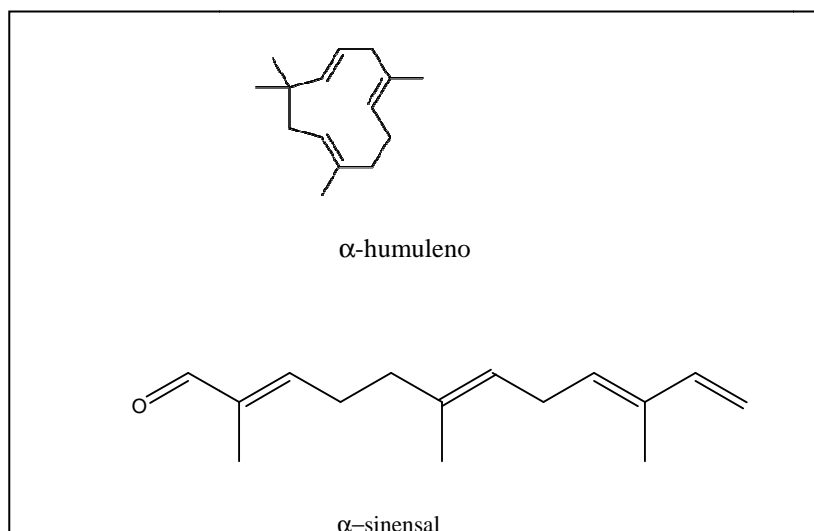


Figura 4.12. Sesquiterpenos identificados

4.4.2. Compuestos más abundantes en Clemenules que en Clemenpons

La tabla 2 muestra los cinco compuestos volátiles que estaban en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenules que en el de Clemenpons. En dicha tabla también se indica el ratio entre la abundancia de dichos compuestos en el aceite esencial de Clemenpons y la abundancia de los mismos en el aceite esencial de Clemenules.

Tabla 2. Compuestos más abundantes en Clemenules que en Clemenpons

Nombre del compuesto	Tr (min)	Tipo de compuesto ^a	Olor según Flavornet ^b	Ratio Clemenpons/Clemenules ^c
1-octanol	25.90	alcohol	musgo, nuez, setas	0.91 ± 0.32
1-decanol	32.39	alcohol	grasa	0.83 ± 0.38
dodecanal	36.43	aldehído	grasa ^d	0.72 ± 0.22
tetradecanal ^e	41.67	aldehído	grasa, floral, madera ^f	0.61 ± 0.19
pentadecanal ^e	46.58	aldehído	fresco (floral)	0.65 ± 0.31

^aTodos son alifáticos, ^bCornell University, 2004. ^cLas medias de las abundancias para cada uno de los compuestos mostraron diferencias significativas entre ambas variedades, $p < 0.05$, según *t* de Student. ^dMiyazawa y col., 2010. ^eCompuesto detectado tentativamente. ^fChisholm y col., 2003a.

Estos metabolitos diferenciales son todos alifáticos de ocho o más átomos de carbono. En concreto se trata de los alcoholes 1-octanol y 1-decanol y los aldehídos dodecanal, tetradecanal y pentadecanal (Figura 4.13); estos dos últimos compuestos solo han podido ser identificados de forma tentativa por su espectro de masas. Su abundancia en los aceites de Clemenpons es entre un 39 y un 9 % inferior que en los aceites de Clemenules, aproximadamente (Tabla 2).

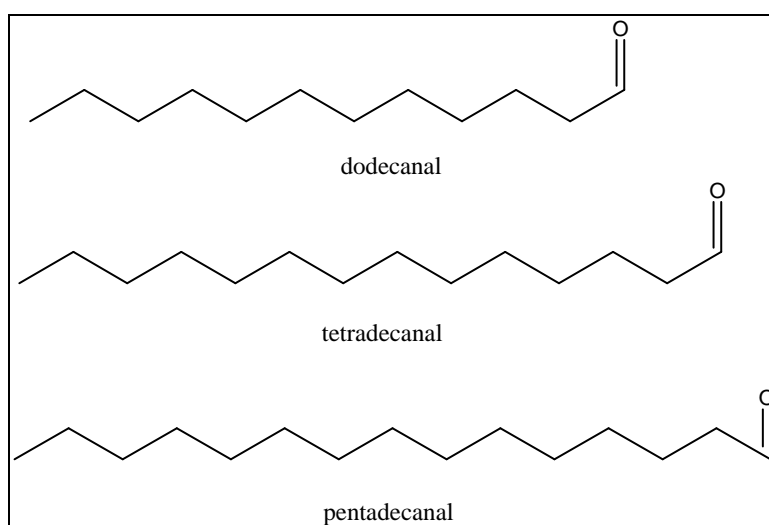


Figura 4.13. Aldehídos alifáticos identificados

De acuerdo con lo expuesto en los dos subapartados anteriores, se observa que el aceite esencial de la variedad Clemenpons es más rico en algunos monoterpenos y sesquiterpenos (Tabla 1). Los compuestos terpénicos derivan de la vía del ácido mevalónico (Bruneton, 2002). Dado los resultados obtenidos, esta vía parece más potenciada en la variedad Clemenpons que en Clemenules. Los compuestos monoterpénicos α -terpineno y α -terpineno, ambos hidrocarbonados y monocíclicos (Figura 4.6), se suelen identificar en todos los análisis de aceites esenciales de cítricos (Ruberto y col., 1997; Lota y col., 2001; Merle y col., 2004; Njoroge y col., 2005; Lan Phi y col., 2006; Boussaada y Chemli, 2007; Viuda-Martos y col., 2009; Akakabe y col., 2010; Omori y col., 2011; Deterre y col., 2012; Bourgou y col., 2012; Tomiyama y col., 2012; Liu y col., 2012; Costa y col., 2014; Wang y Liu, 2014). Ambos compuestos proporcionan al aceite esencial un aroma típico de limón, de acuerdo con la base de datos de Flavor.net (Cornell University, 2004) (Tabla 1). El compuesto 3-careno, hidrocarbonado y bicíclico (Figura 4.6), no ha sido identificado tan frecuentemente en el aceite esencial de cítricos, aunque proporciona un aroma parecido a los dos anteriores compuestos, según Flavor.net (Ruberto y col., 1997; Lota y col., 2001; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bourgou y col., 2012; Tomiyama y col., 2012; Wu y col., 2013).

En cuanto a los dos monoterpenos oxigenados identificados sin ambigüedad, el acetato de α -terpinilo y el *trans*-carveol (Figura 4.7), también más abundantes en Clemenpons que en Clemenules, es importante señalar que son monocíclicos y que proporcionan aromas diferentes a los tres monoterpenos hidrocarbonados citados anteriormente, según Flavor.net (Tabla 1). Así, el acetato de α -terpinilo, que ha sido identificado en pocos aceites esenciales de cítricos (Ruberto y col., 1997; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bourgou y col., 2012), tiene un aroma a cera. El *trans*-carveol, identificado en más ocasiones (Minh Tu y col., 2002; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Njoroge y col., 2005; Lan Phi y col., 2006; Viuda-Martos y col., 2009; Omori y col., 2011; Cheong y col., 2011; Liu y col., 2015), tiene un aroma a alcaravea (*Carum carvi*) que es una planta aromática que se suele emplear como condimento alimentario y que tiene un aroma semejante al anís (Cornell University, 2004). Esto último, junto con el hecho de que este compuesto duplica su abundancia en el aceite de Clemenpons con respecto al aceite de Clemenules (Tabla 1), podría explicar por qué los agricultores afirman que la corteza del fruto de Clemenpons tiene un aroma anisado que no logran percibir en los frutos de Clemenules.

La variedad Clemenpons también resultó más rica en sesquiterpenos que la variedad Clemenules. Este tipo de terpenos poseen quince átomos de carbono, frente a los diez átomos de carbono que forman los monoterpenos, de ahí que los sesquiterpenos sean menos volátiles y tengan un tiempo de retención mayor en los análisis cromatográficos que los monoterpenos (Tabla 1). De los cinco sesquiterpenos más abundantes en Clemenpons que en Clemenules, tan solo se han podido identificar dos, el α -humuleno y el α -sinensal, aunque solo se ha identificado sin ambigüedad el primero de ellos (Figura 4.10). Ambos han sido detectados muy frecuentemente en el aceite esencial de cítricos (Ruberto y col., 1997; Lota y col., 2001; Min Tu y col., 2002; Chisholm y col., 2003b; Merle y col., 2004; Njoroge y col., 2005; Fanciullino y col., 2006; Lan Phi y col., 2006; Boussaada y Chemli, 2007; Akakabe y col., 2010; Bourgou y col., 2012; Deterre y col., 2012; Liu y col., 2012; Costa y col., 2014; Dong y col., 2014; Wan y Liu, 2014). El primero de ellos, monocíclico, tiene un aroma a madera, y el segundo, de estructura lineal, tiene un aroma fresco y dulce (Cornell University, 2004).

Por otra parte, este trabajo también permitió observar que el flavedo de la variedad *Clemenules* era más rico en compuestos alifáticos que el flavedo de la variedad *Clemenpons*. Estos compuestos (Tabla 2), dos alcoholes y tres aldehídos, proceden de la oxidación de los ácidos grasos. Así pues, este proceso de oxidación de lípidos parece más potenciado en la variedad *Clemenules* que en *Clemenpons* (Bruneton, 2001). Los dos alcoholes, el 1-octanol y el 1-decanol, emiten un aroma a musgo y a grasa, respectivamente (Cornell University, 2004). El primero se ha identificado en muchas ocasiones en el aceite esencial de cítricos (Ruberto y col., 1997; Chisholm y col., 2003; Lan Phi y col., 2006; Cheong y col., 2011; Bourgou y col., 2012; Deterre y col., 2012; Liu y col., 2012; Tomiyama y col., 2012), mientras que el 1-decanol se ha identificado en pocas ocasiones (Liu y col., 2012; Tomiyama y col., 2012). Los aldehídos dodecanal, tetradecanal y pentadecanal (Figura 4.11) también se han identificado en los aceites esenciales de cítricos, aunque en mucha mayor medida el primero de ellos (Ruberto y col., 1997; Chisholm y col., 2003; Högnadóttir y Rouseff, 2003; Njoroge y col., 2005; Lan Phi y col., 2006; Akakabe y col., 2010; Miyazawa y col., 2010; Deterre y col., 2012; Liu y col., 2012; Tomiyama y col., 2012; Costa y col., 2014; Liu y col., 2015), mientras que el tetradecanal y el pentadecanal se han identificado en escasas ocasiones, siempre junto al decanal, en el aceite esencial de pummelo, pomelo y lima (Njoroge y col., 2005; Chisholm y col., 2003a). Los dos primeros aldehídos proporcionan un aroma a grasa, al igual que el 1-decanol, mientras el pentadecanal aporta un aroma floral (Chisholm y col., 2003a; Cornell University, 2004; Miyazawa y col., 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el flavedo de la variedad *Clemenpons* parece más rico en compuestos terpénicos que el flavedo de la variedad *Clemenules*, los cuales le podrían proporcionar a dicho flavedo mayores notas aromáticas de limón, madera, pino e incluso de alcaravea, que recuerda al anís. Por el contrario, el flavedo de la variedad *Clemenules* se muestra más rico en compuestos alifáticos aldehídicos y alcohólicos de cadena de más de siete átomos de carbono, que suelen aportar unas notas aromáticas de grasa, musgo e incluso florales. No obstante, para confirmar estos matices olfativos sería necesario realizar un estudio empleando un olfactómetro acoplado al cromatógrafo de gases, ya que la sensibilidad del olfato humano no es directamente proporcional a las concentraciones mostradas por el detector de masas. El ser humano tiene un umbral de reconocimiento del olor diferente para cada compuesto, de tal manera la nariz humana no tiene por qué apreciar necesariamente las variaciones de concentración de los compuestos volátiles que hemos determinado en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

Tras el estudio comparativo de los compuestos volátiles que constituyen los aceites esenciales del flavedo de los frutos de la variedad Clemenules y de los frutos de la variedad Clemenpons, se puede concluir lo siguiente:

- 1- El perfil volátil de los aceites esenciales de ambas variedades presenta diferencias que permiten distinguir ambos tipos de frutos, lo cual no era posible hasta el momento a través de ninguna característica morfológica de dichos frutos.
- 2- El aceite esencial de ambas variedades tienen diferencias cuantitativas, no cualitativas, es decir, ambos presentan los mismos compuestos pero no en la misma concentración.
- 3- De acuerdo con los compuestos volátiles presentes en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenpons que en el de Clemenules, el flavedo de la variedad Clemenpons parece más rico en monoterpenos, como por ejemplo los compuestos 3-careno o *trans*-carveol y en sesquiterpenos, como α -humuleno.
- 4- De acuerdo con los compuestos volátiles presentes en mayor concentración en el aceite esencial de Clemenules que en el de Clemenpons, el flavedo de la variedad Clemenules es más rico en compuestos alifáticos de cadena superior a 7 átomos de carbono, como el alcohol 1-octanol y el aldehído dodecanal.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ, M. (2003). *Citricultura*. Ed. Mundiprensa. 2ª edición. Madrid, 422 pp.
- AKABABE, Y.; KUSUNOKI, A.; TANAKA, R.; KANETSUNE, Y. (2010). A comparison of volatile components of Setomi with its parent cultivars. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74: 659-662.
- ALFARO, C (2006). Tesis Doctoral: *Medida de la concentración de semioquímicos en aire ambiente. Aplicación a la feromona de Chilo Suppressalis Walter (Lepidóptera: Pyralidae) para la optimización del método de confusión sexual*. Universidad Politécnica de Valencia.
- BÁEZ, D.; PINO, J.A.; MORALES, D. (2012). Volatiles from *Magnolia grandiflora* flowers: comparative analysis by simultaneous distillation-extraction and solid phase microextraction. *Natural Products Communications*, 7: 237-238.
- BOURGOU, S.; RAHALI, F.Z.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M.S. (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian *Citrus* during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, doi: 10.1100/20127528593.
- BOUSSAADA, O.; CHEMLI, R. (2007). Seasonal variation of essential oil composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10: 109-120.
- BRATTOLI, M.; CISTERMINO, E.; DAMBROUSO, P.R.; de GENNARO, G.; GIUNGATO, P.; MAZZONE, A.; PALMISANI, J.; TUTINO, M. (2013). Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds. *Sensors*, 13: 16759-16800.
- BRUNETON, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Ed. Acribia S.A. 2ª edición. Zaragoza, 1099 pp.
- CALO, J.R.; CRANDALL, P.G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. (2015). Essential oil as antimicrobial in food systems. A review. *Food Control*, 54: 111-119.
- CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.J.; RODRIGO, M.J.; IGLESIAS, D.J.; TALÓN, M. (2007). Estudio de la producción de volátiles en cítricos: Alteraciones en la producción de aceites esenciales y aromas en flores y frutos. *Levante Agrícola*, 3er trimestre: 341.346.
- CHEONG, M-W.; LIU, S-Q.; YEO, J.; CHIONH, H-K.; PRAMUDYA, K.; CURRAN, P.; YU, B. (2011). Identification of aroma-active compounds in Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel by Gas Chromatography-Olfactometry. *Journal of Essential Oil Research*, 23: 34-42.
- CHISHOLM, M.G.; WILSON, M.A.; GASKEY, G.M. (2003a). Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 106-115.
- CHISHOLM, M.G.; JELL, J.A.; CASS Jr. D.M. (2003b). Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Clementine using gas chromatography-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 275-281.
- CHUTIA, M.; BHUYAN, P.D.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, 42: 777-780.
- CORNELL UNIVERSITY, 2004. *Flavornet and human odor space, Gas chromatography- olfactometry (GCO) of natural products*, Geneva, Nueva York, USA, visto el 4 de Mayo de 2015,

<http://www.flavornet.org/flavornet.htm>

COSTA, R.; BISIGNANO, C.; FILOCAMO, A.; GRASSO, E.; OCCHIUTO, F.; SPADARO, F. (2014). Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops. *Journal of Essential Oil Research*, 26: 400-408.

DETERRE, S.; REGA, B.; DELARUE, J.; DECLoux, M.; LEBRUN, M.; GIAMPAOLI, P. (2012). Identification of key aroma compounds from bitter orange (*Citrus aurantium* L.) products: essential oil and macerate-distillate extract. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 77-88.

DONG, Z.B.; SHAO, W.Y.; LIANG, Y.R. (2014). Isolation and characterization of essential oil extracted from Tangerine peel. *Asian Journal of Chemistry*, 26: 4975-4978.

DUGO, G.; COTRONEO, A.; VERZERA, A.; BONACCORSI, I (2002). Composition of the volatile fraction of cold-pressed citrus peel oils, en *Citrus. The genus Citrus*. Editado por G. Dugo y A. Di Giacomo. Ediciones Taylor & Francis, Londres y Nueva York, pp 201-317.

ELMACI, Y.; ONOGUR, T.A. (2012). Mandarin peel aroma: Estimation by using headspace/GC/MS and descriptive analysis techniques. *Acta Alimentaria*, 41: 131-139.

FANCIULLINO, A-L.; TOMI, F.; LURO, F.; DESJOBERT, J.M.; CASANOVA, J. (2006). Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 359-367.

FLATH, R.A.; LIGHT, D.M.; JANG, E.B.; MON, T.R.; JOHN, J.O. (1990). Headspace examination of volatile emissions from ripening papaya (*Carica papaya* L., Solo Variety). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1060-1063.

GÓMEZ, E.; MARTÍNEZ, A.; LAENCINA, J. (1995). Changes in Volatile Compounds during Maturation of some Grape Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67: 229-233.

GONZÁLEZ-MAS, M.C.; ESCRICHE, M.D.; JOVER, S.; BERMEJO, A.; CANO A.; GUTIÉRREZ-SUANZES, A. (2010). "Estudio del aceite esencial de Clementinas: Diferenciación de variedades según el perfil volátil de la corteza". *Levante Agrícola*, especial Postcosecha, 401, 185-192.

GONZÁLEZ-MAS, M. C.; RAMBLA, J.L.; ALAMAR, M.C.; GUTIÉRREZ, A.; GRANELL, A. (2011). Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different *Citrus* species. *Plos One*, 6, e22016: 1-11.

HERN, A.; DORN, S. (2003). Monitoring seasonal variation in apple fruit volatile emissions in situ using solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis*, 14: 232-240.

HÖGNADÓTTIR, Á; ROUSEFF, R.L. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998: 201-211.

INFOAGRO SYSTEMS S.L. 2015. El cultivo de las mandarinas. Madrid, España, visto el 27 de Abril de 2015,

<http://www.infoagro.com/citricos/mandarina.htm>

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, 2015. Citricultura valenciana, Valencia, España, visto el 30 de Abril de 2015,

<http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, 2014. Citricultura valenciana, Valencia, España, visto el 29 de Abril de 2015, http://www.ivia.es/variedades/clementinos_y_satsumas/CLEMENULES.pdf

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, 2014. Citricultura valenciana, Valencia, España, visto el 28 de Abril de 2015, http://www.ivia.es/variedades/clementinos_y_satsumas/CLEMENPONS.pdf

JOLLIFFE, I.T. (2002). *Principal Component Analysis*. Ed. Springer. 2ª edición, Nueva York. 487 pp.

KOLB, B.; ETTRE, L.S. (1997). *Static headspace-gas chromatography: Theory and practice*. Editorial Wiley-VCH, Nueva York.

LAN PHI, N.T.; NISHIYAMA, C.; CHOI, H-S.; SAWAMURA, M. (2006). Evaluation of characteristic aroma compounds of *Citrus natsudaidai* Hayata (Natsudaidai) cold-pressed peel oil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70: 1832-1838.

LEGAZ PAREDES, F.; PRIMO-MILLO, E. (1995). *Normas para la fertilización de los agrios*. Editorial Conselleria de Agricultura y Pesca, Generalitat Valenciana, Valencia, 27 pp.

LIU, C.; CHENG, Y.; ZHANG, H.; DENG, X.; CHEN, F.; XU, J. (2012). Volatile constituents of wild Citrus Mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauriro) peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2617-2628.

LIU, C.; YAN, F.; GAO, H.; HE, M.; WANG, Z.; CHENG, Y.; DENG, X.; XU, J. (2015). Features of citrus terpenoid production as revealed by carotenoid, limonoid and aroma profiles of two pummelos (*Citrus maxima*) with different flesh color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 111-119.

LOTA, M-L.; de ROCCA SERRA, D.; TOMI, F.; CASANOVA, J. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 77-104.

MALHOTRA, S.; SURI, S.; TULI, R. (2009). Antioxidant activity of *Citrus* cultivars and chemical composition of *Citrus karna* essential oil. *Planta Medica*, 75: 62-64.

MARTÍNEZ, M.A.; CSÁKY, A.G. (1998). *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*. Editorial Síntesis, Madrid, 223 pp.

MATEO, J,J; JIMÉNEZ, M. (2000). Monoterpernes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881: 557-567.

MERLE, H.; MORÓN, M.; BLÁZQUEZ, M.A.; BOIRA, H. (2004). Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 491-497.

MINH TU, N.T.; THANH, L.X.; UNE, A.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 169-174.

MIYAZAWA, N.; FUJITA, A.; KUBOTA, K. (2010). Aroma character impact compounds in Kinokuni mandarin orange (*Citrus kinokuni*) compared with Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74: 835-842.

NJOROGE, S.M.; KOAZE, H.; KARANJA, P.N.; SAWAMURA, M. (2005). Volatile constituents of redblush grapefruit (*Citrus paradisi*) and pummelo (*Citrus grandis*) peel essential oils from Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9790-9794.

- O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; CHALOVA, V.I.; RICKE, S.C. (2008). Orange essential oil antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*, 73: 264-267.
- OMORI, H.; NAKAHARA, K.; UMANO, K. (2011). Characterization of aroma compounds in the peel extract of Jabara (*Citrus jabara* Hort. Ex Tanaka). *Flavour and Fragrance Journal*, 26: 396-402.
- PAWLISZYN, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: theory and practice*, Editorial Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 264 pp.
- RAMBLA, J.L.; GONZÁLEZ-MAS, M.C.; PONS, C.; BERNET, G.P.; ASINS, M.J.; GRANELL, A. (2014). Fruit volatile profiles of two *Citrus* hybrids are dramatically different from those of their parents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 11312-11322.
- ROUSEFF; R.L.; CADWALLADER K.R. (2001). *Headspace analysis of foods and flavors: Theory and practice*. Editorial Springer, New York.
- RUBERTO, G.; RENDA, A.; PIATELLI, M.; RAPISARDA, P.; STARRANTINO, A. (1997). Essential oil of two new pigmented *Citrus* hybrids, *Citrus clementina* x *Citrus sinensis*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45: 467-471.
- SOLER AZNAR, J.; SOLER FAYOS, G.; FORNER GINER, M.A.; FORNER VALERO J. (2006). *Criterios para identificar variedades y patrones de cítricos*. Ed. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació Press. Valencia, 156 pp.
- SUPELCO, 2015. *Selection guide for Supelco spme fibers*, visto el 5 de mayo, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>
- TANAKA, T. 1961. Citologia: Semi.centennial Commemoration Papers on *Citrus* Studies. Citologia Supporting Foundation, Osaka, Japan, 112 pp.
- TOMIYAMA, K.; AOKI, H.; OIKAWA, T.; SAKURAI, K.; KASAHARA, Y.; KAWAKAMI, Y. (2012). Characteristic volatile components of Japanese sour citrus fruits: Yuzu, Sudachi and Kabosu. *Flavour and Fragrance Journal*, 27: 341-355.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. (2009). Chemical composition of mandarin (*C. reticulata* L.), grapefruit (*C. paradisi* L.), lemon (*C. limon* L.) and orange (*C. sinensis* L.) essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12: 236-243.
- WANG, J.; LIU, Y. (2014). Comparative study on the volatiles in *Citrus reticulata* 'Dahongpao' peel from the same plant and their antioxidant activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17: 303-308.
- WIRTH J.; GUO, W.; BAUMES, R.; GÜNATA. Z. (2001). Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* muscat of alexandria and shiraz cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2917-2923.
- WU, G. A.; PROCHNIK, S.; JENKINS, J.; SALSE, J.; HELLSTEN, U.; MURAT, F.; PERRIER, X.; RUIZ, M.; SCALABRINI, S.; TEROL, J.; TAKITA, M.A.; LABADIE, K.; POULAIN, J. ; COULOUX, A.; JABBARI, K.; CATTONARO, F.; DEL FABBRO, C.; PINOSIO, S.; ZUCCOLO, A.; CHAPMAN, J.; GRIMWOOD, J.; TADEO, F.R.; ESTORNELL, L.H.; MUÑOZ-SANZ, J.V.; IBAÑEZ, V.; HERRERO-ORTEGA, A.; ALEZA, P.; PÉREZ-PÉREZ, J.; RAMÓN, D.; BRUNEL, D.; LURO, F.; CHEN, C.; FARMERIE W.G.; DESANY, B.; KODIRA,C.; MOHIUDDIN, M.; HARKINS, T.; FREDRIKSON, K.; BURNS, P.;

LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M.; REFORGIATO, G.; FREITAS-ASTÚA, J.; QUETIER, F.; NAVARRO, L.; ROOSE, M.; WINCKER, P.; SCHMUTZ, J.; MORGANTE, M.; MACHADO, M.A.; TALON, M.; JAILLON, O.; OLLITRAULT, P.; GMITTER, F.; ROKHSAR, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32: 656-663.

WU, Z.; LI, H.; YANG, Y.; ZHAN, Y.; TU, D. (2013). Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 46: 311-316.