



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

---

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR EN INGENIERIA AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
Curso 2016-2017

**Influencia del grado de maduración en el  
rendimiento y composición del aceite esencial  
extraído de los gálbulos de *Juniperus  
oxycedrus* L.**

Autora: Begoña Ygueravide Romero

Tutor: Profesor Dr. Juan Antonio Llorens Molina

**Resumen.****Influencia del grado de maduración en el rendimiento y composición del aceite esencial extraído de los gábulos del *Juniperus oxycedrus* L.**

La actividad biológica de los aceites esenciales (antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, etc.) es objeto de creciente atención por la tendencia progresiva a la aplicación de productos naturales en el procesado y conservación de los alimentos. Por otra parte, en cuanto a su aplicación como aditivos aromatizantes, tiene un notable interés la caracterización química de aquellos aceites esenciales que por su rendimiento y posible disponibilidad son potencialmente utilizables con estos fines. No obstante, los aceites esenciales muestran una elevada variabilidad química como consecuencia de diversos factores (genéticos, ambientales y ontogenéticos), lo que requiere una caracterización rigurosa del material vegetal del que se extraen.

Los aceites esenciales de las diferentes especies del género *Juniperus*, extraídos tanto de las hojas como de los gábulos e incluso de la madera (aceite de cade) son ampliamente utilizados con fines medicinales, por su actividad antimicrobiana y en la industria alimentaria. Un factor de variabilidad importante en la composición del aceite esencial procedente de los gábulos es su estado de maduración. Sin embargo, no se han aplicado criterios objetivos para clasificarlos en función de este factor. De la literatura existente hasta ahora se desprende que simplemente se ha aplicado la apreciación visual.

El objetivo de este trabajo es relacionar la composición de dicho aceite esencial con el grado de maduración de los gábulos. Para definir éste de un modo objetivo se ha desarrollado y aplicado un método de clasificación basado en el sistema CIE  $L^*a^*b^*$ . A través de un método estadístico multivariante (análisis discriminante) de los datos de medida del color se establece una clasificación de las muestras de gábulos en cinco niveles de maduración. En cada grupo se ha procedido a la extracción del aceite esencial mediante un método de extracción-destilación simultáneas (SDE, mediante un equipo Likens-Nickerson). Las muestras han sido posteriormente analizadas mediante cromatografía de gases con detección por espectroscopía de masas (análisis cualitativo) y mediante detección por ionización de llama (FID) para la cuantificación, tanto de cada uno de sus componentes como del rendimiento en aceite esencial. También se determinó para cada nivel de maduración el grado de humedad con objeto de determinar el rendimiento de aceite esencial con respecto al contenido en materia seca.

Los resultados obtenidos demuestran que el método físico para la medida de color ha sido adecuado para clasificar de manera objetiva el grado de maduración. En cuanto a la composición del aceite esencial, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas según el grado de maduración para el mirceno y los monoterpenos oxigenados. También encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los gábulos más maduros y los menos maduros para los monoterpenos, los sesquiterpenos oxigenados y los diterpenos oxigenados, observándose un progresivo incremento de la proporción de compuestos oxigenados a medida que progresa la maduración. En cuanto al rendimiento de aceite esencial, éste es máximo en los estadios intermedios de maduración.

**Palabras clave:** *Juniperus oxycedrus* L, aceites esenciales, grado de maduración.

**Autor del TFG.** Begoña Ygueravide Romero

**Tutor Académico.** Profesor Dr. Juan Antonio Llorens Molina

Valencia, julio 2017

**Abstract.****Influence of the degree of ripeness on yield and composition of the essential oil extracted from the berries of *Juniperus oxycedrus* L.**

The biological activity of essential oils (antimicrobials, antifungals, antioxidants, etc.) is increasingly addressed by the progressive trend towards the application of natural products in food processing and preservation. In addition, about their application as flavoring additives, the chemical characterization of essential oils which, because of their performance and possible availability, are potentially useful for these purposes, is of great interest. However, the essential oils show a high chemical variability because of several factors (genetic, environmental and ontogenetic), which requires a rigorous characterization of the plant material from which they are extracted.

Essential oils from different species of the genus *Juniperus*, extracted from leaves, as well as from berries and even from wood (cade oil) are widely used for medicinal purposes, because of their antimicrobial activity and in the food industry. An important factor of variability in the composition of the essential oil of the berries is its maturation stage. However, objective criteria have not been applied to classify them according to this factor. From the literature to date it follows that visual appreciation has simply been applied.

The objective of this work is to relate the composition of this essential oil with the degree of maturation of the berries. In order to define this objective, a classification method based on the CIE system  $L^* a^* b^*$  has been developed and applied. A multivariate statistical method (discriminant analysis) of color measurement data establishes a classification of the berries samples into five levels of maturation. In each group the essential oil was extracted by a simultaneous extraction-distillation method (SDE, using Likens-Nickerson equipment). The samples were analyzed by gas chromatography with mass spectrometry detection (qualitative analysis) and by flame ionization detection (FID) for the quantification, both of each of its components and the yield of the essential oil. The degree of moisture was also determined for each maturation level to determine the yield of essential oil with respect to the dry matter content.

The results obtained demonstrate that the physical method for color measurement has been adequate to classify objectively the degree of maturation. About the composition of the essential oil, statistically significant differences were found according to the maturation degree of myrcene and oxygenated monoterpenes. Statistically significant differences were also found between the more mature and less mature berry of monoterpenes, oxygenated sesquiterpenes and oxygenated diterpenes, with a progressive increase in the proportion of oxygenated compounds as the maturation progresses. As for the yield of essential oil, this is maximum in the intermediate stages of maturation.

**Key words:** *Juniperus oxycedrus* L, essential oils, degree of ripening.

**Author of the TFG.** Begoña Ygueravide Romero

**Academic tutor.** Profesor Dr. Juan Antonio Llorens Molina

Valencia, July 2017

**Resum.****Influència del grau de maduració en el rendiment i composició de l'oli essencial extret dels gàlbuls del *Juniperus oxycedrus* L.**

L'activitat biològica dels olis essencials (antimicrobiana, antifúngica, antioxidant, etc.) és objecte de creixent atenció per la tendència progressiva a l'aplicació de productes naturals en el processat i conservació dels aliments. Per altra banda, el seu ús com a additius aromatitzants, té un notable interès la caracterització química d'aquells olis essencials que per el seu rendiment i possible disponibilitat són potencialment utilitzables amb aquests fines. No obstant, en els olis essencials existeix una elevada variabilitat química com a conseqüència de diverses factors (genètics, ambientals i ontogenètics) la qual cosa requereix una caracterització rigorosa del material vegetal del que s'extreien.

Els olis essencials de les diferents espècies del gènere *Juniperus*, extrets tant de les fulles com dels gàlbuls i també de la fusta (oli de cade) són àmpliament utilitzats amb finalitat medicinal, per la seua activitat antimicrobiana i en la indústria alimentària. Un factor de variabilitat important en la composició de l'oli essencial procedent dels gàlbuls és el seu estat de maduració. Tan mateix, no s'han aplicat criteris objectius per a classificar-los en funció d'aquest factor, simplement l'apreciació visual. De la literatura existent fins ara es desprèn que els gàlbuls per la seua maduració, simplement s'han aplicat l'apreciació visual.

L'objectiu d'aquest treball és relacionar la composició de l'oli essencial amb el seu grau de maduració dels gàlbuls. Para definir aquest d'un modo objectiu s'ha desenvolupat i aplicat un mètode de classificació basat en el sistema CIE  $L^*a^*b^*$ . A través d'un mètode estadístic multivariant (anàlisi discriminant) de les dades de mesura del color s'estableix una classificació de les mostres de gàlbuls en cinc nivells de maduració. En cada grup es procedeix a l'extracció de l'oli essencial mitjançant un mètode d'extracció-destil·lació simultànies (SDE, mitjançant un equip Likens-Nickerson). Les mostres han estat posteriorment analitzades mitjançant cromatografia de gasos amb detecció per espectroscòpia de masses (anàlisi qualitativa) i mitjançant detecció per ionització de flama (FID) per a la quantificació, tant de cada un dels seus components com del rendiment en oli essencial. El grau d'humitat també es va determinar per a cada nivell de maduració per tal de determinar el rendiment d'oli essencial pel que fa al contingut de matèria seca.

Els resultats obtinguts demostren que el mètode físic per a la mesura de color va ser adequat per a classificar de manera objectiva el grau de maduració. Quant a la composició de l'oli essencial, s'han trobat diferències estadísticament significatives segons el grau de maduració per al mircenol i els monoterpens oxigenats. També trobem diferències estadísticament significatives entre els gàlbuls més madurs i els menys madurs per a els monoterpens, els sesquiterpens oxigenats i els diterpens oxigenats, observant-se un progressiu increment de la proporció de compostos oxigenats a mesura que progressa la maduració. Pel que fa al rendiment d'oli essencial, aquest és màxim en els estadis intermedis de maduració.

**Paraules claus:** *Juniperus oxycedrus* L, olis essencials, grau de maduració.

**Autor del TFG.** Begoña Ygueravide Romero

**Tutor Acadèmic.** Professor Dr. Juan Antonio Llorens Molina

València, juliol 2017

## **Agradecimientos**

A mi tutor D. Juan Antonio Llorens Molina, por su paciencia y disponibilidad para ayudarme a realizar este trabajo.

A toda mi familia que siempre me ha ayudado y confiado en mí.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Juniperus oxycedrus</i>. Morfología y especies.</b>	<b>2</b>
1.1.1. Generalidades del género <i>Juniperus</i> .	2
1.1.2. Diferencias entre especies de <i>Juniperus</i> .	2
1.1.3. Diferencias entre subespecies de <i>Juniperus oxycedrus</i> .	4
<b>1.2. Localización geográfica y climática.</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Usos tradicionales.</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Composición.</b>	<b>7</b>
<b>2. Objetivos del trabajo.</b>	<b>11</b>
<b>3. Material y métodos.</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Material vegetal.</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Selección de muestras.</b>	<b>13</b>
3.2.1. Clasificación visual.	13
3.2.2. Clasificación inicial por medida física del color.	14
<b>3.3. Extracción-destilación simultánea de los aceites esenciales. Likens-Nickerson.</b>	<b>16</b>
3.3.1. Materiales.	16
3.3.2. Fundamento.	17
3.3.3. Metodología.	17
<b>3.4. Identificación y cuantificación. Cromatografía de gases.</b>	<b>18</b>
3.4.1. Cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-EM).	19
3.4.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).	20
<b>3.5. Determinación de la humedad.</b>	<b>21</b>
3.5.1. Materiales.	21
3.5.2. Fundamento.	22
3.5.3. Metodología.	22
<b>3.6. Análisis estadístico.</b>	<b>22</b>
<b>4. Resultados.</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Estudio de color.</b>	<b>24</b>
<b>4.2. Determinación de la humedad.</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Extracción del aceite esencial.</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Composición de los aceites esenciales.</b>	<b>27</b>
4.4.1. Cromatograma de gases.	27
4.4.2. Caracterización química del aceite esencial.	27
<b>4.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.</b>	<b>30</b>
4.5.1. Composición química.	30
4.5.2. Estudio individualizado de cada compuesto o grupo de compuestos.	31
<b>5. Conclusiones.</b>	<b>40</b>
<b>6. Bibliografía.</b>	<b>41</b>
<b>7. Anexos.</b>	<b>44</b>

## Relación de tablas incluidas en este trabajo

Tabla 1. Comparación entre las especies *communis* y *oxycedrus* del genero *Juniperus*.

Tabla 2. Comparativa de tres subespecies del *Juniperus oxycedrus*.

Tabla 3. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* de diferente procedencia.

Tabla 4. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las diferentes especies de *Juniperus* y subespecies de *J. oxycedrus* de diferente procedencia.

Tabla 5. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) según la época de recolección de *Juniperus* de diferente procedencia.

Tabla 6. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) según la etapa de maduración de *Juniperus* de diferente procedencia.

Tabla 7. Muestras obtenidas según la escala visual.

Tabla 8. Determinación de la humedad de los diferentes grados de maduración.

Tabla 9. Rendimiento de la extracción de aceites esenciales según su grado de maduración.

Tabla 10. Composición química de la muestra B2 de *Juniperus oxycedrus spp. oxycedrus*.



---

## Figuras

Figura 1. Hoja de *Juniperus communis*.

Figura 2. Hoja del *Juniperus oxycedrus*.

Figura 3. Árbol de *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus*.

Figura 4. Árbol de *Juniperus oxycedrus* spp. *badía*.

Figura 5. Arbusto de *Juniperus oxycedrus* spp. *macrocarpa*.

Figura 6. Gálbulos de *Juniperus* en los diferentes estados de maduración.

Figura 7. Lector de Color CR-10 Plus (Konica Minolta).

Figura 8. Sistema CIE L\*a\*b\* en 3D.

Figura 9. Equipo de extracción-destilación simultánea LIKENS-NICKERSON.

Figura 10. Esquema del método analítico.

Figura 11. Gráfica de las funciones discriminantes.

Figura 12. Medias e intervalos LSD de los rendimientos según el grado de maduración (datos sometidos a la transformación  $ASENO(RAIZ(x/100))$ ).

Figura 13. Cromatograma GC/MS de aceite esencial de *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus* de la muestra B2.

Figura 14. Gráfico de medias del  $\alpha$ -pineno frente a los grados de maduración.

Figura 15. Gráfico de medias del mirceno frente a los grados de maduración.

Figura 16. Gráfico de medias de monoterpenos frente a los grados de maduración.

Figura 17. Gráfico de medias de monoterpenos oxigenados frente a los grados de maduración.

Figura 18. Gráfico de medias de sesquiterpenos frente a los grados de maduración.

Figura 19. Gráfico de medias de sesquiterpenos oxigenados frente a los grados de maduración.

Figura 20. Gráfico de medias de diterpenos frente a los grados de maduración.

Figura 21. Gráfico de medias de diterpenos oxigenados frente a los grados de maduración.

Figura 22. Gráfico de medias de hidrocarburos alifáticos frente a los grados de maduración.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción.

Los aceites esenciales son mezclas líquidas de sustancias complejas volátiles producidas por las plantas, que poseen un olor agradable e intenso. Son sintetizadas como metabolitos secundarios por numerosas plantas aromáticas generalmente localizadas en países mediterráneos y tropicales.

Los aceites esenciales por sus múltiples propiedades son utilizados en numerosos campos.

- En el área de la alimentación se emplean fundamentalmente por sus propiedades antisépticas (antioxidantes, bactericidas y fungicidas) como conservadores de alimentos, aplicándolos directamente en los alimentos o en su embalaje.
- También cabe destacar el papel de los aceites esenciales para la protección de cultivos por sus acciones antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas.
- En el campo de la medicina y farmacología tienen también un importante papel, debido a que poseen numerosas propiedades, entre las que se engloban, acciones analgésicas, sedantes, antiinflamatorias, espasmolíticas y anestésicas locales, fundamentalmente.

Hoy en día, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 tiene importancia comercial en la industria farmacéutica, agroalimentaria, sanitaria, cosmética y perfumería (Bakkali *et al.*, 2007).

Diversos aceites esenciales son extraídos a partir de frutos, gálbulos o de las semillas que contienen. En este caso, un factor importante de variabilidad es su grado de maduración. Por las características de su composición química, algunos aceites esenciales, provenientes de estos órganos de la planta, han sido utilizados por la industria agroalimentaria, entre estos destacamos:

- *Myrtus communis* (arrayán): en cuanto a esta planta se conocen varios usos en la industria de alimentos, ello se debe a que sus extractos (tanto de las hojas como de los frutos) poseen un elevado potencial antibacteriano contra los patógenos transmitidos a alimentos y las bacterias que los deterioran (Amensour, *et al.* 2010). Es usado como antioxidante natural debido a sus compuestos fenólicos (Amensour, *et al.* 2009) y como aditivo colorante en salchichas Frankfurt sustituyendo a aditivos artificiales, ya que aumentan las coordenadas a\* y b\* del sistema CIE L\*a\*b\* (Amensour *et al.* 2010).
- *Illicium verum* (anís estrellado): tiene una acción antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de microorganismos como *B. subtilis*, *E. coli* y *S. cerevesiae*; este efecto está relacionado con la presencia de anetol en su composición (De, *et al.*, 2001).

- *Elettaria cardamomum* (cardamomo): en la composición química de este aceite esencial se encuentran como componentes el pineno, que aporta una actividad antibiótica frente a patógenos y el limoneno que aporta una gran capacidad saborizante, por lo que se utiliza como aditivo en la industria alimentaria (Ayala Marmolejo & Murillo Aspiazu, 2015).
- *Foeniculum vulgare* (hinojo): tiene capacidad antioxidante debido a su contenido en vitamina C, también se utiliza en la elaboración de bebidas alcohólicas como licores aromatizados (Alonso Esteban, 2015).
- *Piper nigrum* (pimienta): es una especie muy utilizada en la elaboración de productos manufacturados en la industria alimentaria, como indica el estudio de Cabello Navas y Belloso Morales (2009) tiene un efecto antibacteriano contra el crecimiento de bacterias Gram positivas (*Streptococcus spp.* y *Bacillus cereus*).

En nuestro estudio hemos elegido el *Juniperus oxycedrus*, porque a sus aceites esenciales se les han descrito propiedades beneficiosas y diferentes usos en la industria agroalimentaria, como la elaboración de ginebra (Fonseca, 2006).

### **1.1. *Juniperus oxycedrus*. Morfología y especies.**

#### 1.1.1. Generalidades del género *Juniperus*.

Este trabajo trata del *Juniperus oxycedrus spp. oxycedrus*, una subespecie perteneciente a la familia de los *Cupressaceae*. Ésta se puede dividir en 28 géneros los cuales albergan 142 especies, que se distribuyen en zonas con climas templados de ambos hemisferios, aunque generalmente habitan en el hemisferio Norte ( Guía de Consulta Diversidad Vegetal, 2013).

El género *Juniperus* es el segundo más diverso de coníferas, geográficamente está ampliamente extendido ya que se adapta a diferentes zonas y climas como veremos a continuación. Este género se divide en 67 especies y 34 variedades. Las diversas especies de *Juniperus* se caracterizan por el desarrollo de un cono hembra carnoso en el que las escamas están fusionadas, son gálbulos de una forma redondeada con un diámetro que varía desde entre 3 y 20 mm. Estos gálbulos crecen en los arbustos o árboles perennes que contienen hojas aciculares o apretadas con puntas divergentes (Adams R. P., 2014)

#### 1.1.2. Diferencias entre especies de *Juniperus*.

Dentro del género *Juniperus* hay grandes diferencias entre sus especies, como por ejemplo entre la especie *communis* y la *oxycedrus* (especie en la cual se basa este trabajo), que son las más habituales en nuestro entorno. En la tabla 1 vemos las principales diferencias entre ambas (Arbolapp (CSIC/FECYT), 2014.) (Arbolapp (CSIC/FECYT), 2014).

Tabla 1. Comparación entre las especies *communis* y *oxycedrus* del género.

ESPECIES DE <i>JUNIPERUS</i>	<i>COMMUNIS</i>	<i>OXYCEDRUS</i>
<b>Tipo de planta</b>	Arbustos.	Arbustos o árboles.
<b>Hojas</b>	Aciculares y punzantes. Dimensiones: 10-20 cm de largo y 1-2 mm de ancho. 1 banda blanca en el haz	Aciculares y punzantes. Dimensiones: 12-20 cm de largo y 1,2-2 mm de ancho 2 bandas blancas en el haz.
<b>Fruto: conos femeninos que forman los gálbulos.</b>	1 cm de diámetro aprox. Color: azulado oscuro.	0,8-1,2 cm de diámetro. Color: rojizo-marrón.
<b>Clima</b>	Continental extremo.	Mediterráneo.
<b>Ecosistema</b>	Montañoso.	Mediterráneo.
<b>Suelo/terreno</b>	Calizo.	Pedregoso y seco.
<b>Tolerancias</b>	No rebrote tras incendios. No a condiciones de sombra.	Si a la sequía.
<b>Distribución</b>	Norte, Centro y Este de la península.	Región mediterránea.



FIGURA 1. HOJA DE *JUNIPERUS COMMUNIS*.



FIGURA 2. HOJA DEL *JUNIPUERUS OXYCEDRUS*

1.1.3. Diferencias entre subespecies de *Juniperus oxycedrus*.

La gran variabilidad de las características entre las especies de *Juniperus* también se observa en sus subespecies. Estas diferencias se recogen en la tabla 2, donde se realiza la comparación entre *J. oxycedrus* spp. *oxycedrus*, *J. oxycedrus* spp. *badia* (Adams R. P. 2014) y *J. oxycedrus* spp. *macrocarpa*. (Güemes & Roselló, 2004).

Tabla 2. Comparativa de tres subespecies del *Juniperus oxycedrus*.

SUBESPECIE DE <i>JUNIPERUS</i> <i>OXYCEDRUS</i>	<i>OXYCEDRUS</i>	<i>BADIA</i>	<i>MACROCAPA</i>
<b>Tipo de planta</b>	Árbol o arbusto (6 m.)	Árbol (15m.)	Arbusto (3-5m.)
<b>Hojas</b>	Aciculares punzantes.  Dimensiones: 15-20 mm de longitud.  2 bandas blancas estomáticas.	Aciculares  Dimensiones: 12-20 mm de longitud y 1,5-2 mm de ancho.	Forma de aguja con ápice punzante.  2 bandas blancas estomáticas.
<b>Gálbulos</b>	6-12 mm de diámetro.  De rojizo a púrpura durante maduración.	10-13 mm de diámetro.  De rojizo-marrón a púrpura durante maduración.	12-15 mm de diámetro.  Castaño púrpura cuando maduran.
<b>Clima</b>	Secos.	Continental suavizado.	Semiárido.
<b>Zona</b>	Mediterráneo.	Centro de la península Ibérica	Mediterráneo e Irano-Turánica.



FIGURA 3. ÁRBOL DE *JUNIPERUS OXYCEDRUS SPP. OXYCEDRUS*.

FIGURA 4. ÁRBOL DE *JUNIPERUS OXYCEDRUS SPP. BADÍA*.

FIGURA 5. ARBUSTO DE *JUNIPERUS OXYCEDRUS SPP. MACROCARPA*.

### 1.2. Localización geográfica y climática.

Las plantas del género *Juniperus* son comunes del hemisferio Norte, solo se conoce una especie que crece en el hemisferio Sur, exactamente en las montañas del este de África, esta especie es conocida con el nombre de *Juniperus procera*.

El *Juniperus* tiene gran capacidad de adaptación, por ello se pueden encontrar especies a diferentes altitudes, desde el nivel del mar hasta el límite forestal, los árboles en esta zona ya no pueden crecer por diversos factores que lo impiden. Además de la adaptación a la altitud, también la tiene desde un punto de vista edafológico. La mayoría de especies crecen en suelos calizos (*Juniperus communis*); por otro lado, como ya hemos visto anteriormente el *Juniperus oxycedrus* crece en suelos pedregosos y secos. Estas diferencias de adaptación son tan grandes que el género *Juniperus* puede hallarse desde en suelos desérticos hasta pantanosos (Adams R. P. 2014).

En cuanto al clima, también se observa en este género una elevada adaptabilidad. Algunas de las especies son tolerantes a las sequías, desarrollándose en climas más desérticos; otras crecen en climas continentales con grandes cambios de temperaturas, asimismo, como en la especie estudiada en este trabajo, son parte de la flora típica de los ecosistemas mediterráneos.

### 1.3. Usos tradicionales.

El *Juniperus*, comúnmente conocido como enebro, ha sido utilizado por sus propiedades en la industria farmacéutica y en la de la alimentación.

Por un lado, se conocen propiedades medicinales y usos farmacológicos para diferentes dolencias, estas propiedades han sido recogidas en el libro de Costa, *et al.* (2005), destacando:

- *Juniperus communis*: Antiodontálgico
- *Juniperus oxycedrus*: Detoxificante, antiverrugoso, demulcente y antialérgico.

Por otro lado, por las características de sus aceites esenciales, el género *Juniperus* ha sido utilizado en la tecnología de alimentos, ya sea como condimento alimentario o como aditivo. Entre las propiedades de este aceite esencial, se sabe que el *Juniperus phoenicea* spp. *turbinata* y el *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus* tienen una importante actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* como indican Angioni, et al. (2003); también tiene actividad antibiótica debido a la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$  pineno en su composición. La presencia de estos compuestos, comunes a todas las especies y subespecies del género *Juniperus* es importante por su acción bacteriostática (Medeiros-Leite, et al., 2007). Respecto al uso como condimento alimentario, se utiliza, principalmente, para rectificar la cebada destilada en la elaboración de ginebra y como aromatizante en algunos platos y bebidas.

El estudio de estos aceites esenciales se debe al interés por las propiedades de sus compuestos mayoritarios, entre los que se encuentra el  $\alpha$ -pineno, que aparece como componente mayoritario en todas las subespecies, y tiene una importante acción bacteriostática (Medeiros-Leite, et al., 2007).



#### 1.4. Composición.

La composición de los aceites esenciales del *Juniperus* ha sido objeto de diversos estudios, que se han basado en diferentes criterios para el estudio de su composición química. A continuación, los exponemos en diferentes tablas que diferencian entre los criterios escogidos, indicando los componentes mayoritarios (>5%) en la composición de sus aceites esenciales.

Tabla 1. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* de diferente procedencia.

Referencias Parte de la planta	Localización	Componentes > 5%
<b>(Hajdari, et al., 2014)</b> Gálbulos	Mirushë, Mitrovicë, Prizren, Mushtisht, Brezovicë (Kosovo).	Mirceno (45,5-56,9%), $\alpha$ -Pinenos (10,2-36,6%), Limoneno (3,6-13,8%), Germacreno D (1,7-8,6%)
<b>(Brice Boti, et al., 2006)</b> - Hojas - Gálbulos	Córcega (Francia)	- $\alpha$ -Pinenos (56,1-73,3%), $\Delta^3$ -Carenos (0,7-8,2%) - $\alpha$ -Pinenos (41,1-58,7%), Mirceno (14,1-21,9%), Germacreno D (11,7-19,9%)
<b>(Derwich &amp; Chabir, 2011)</b> Hojas	Región Centro-Norte de Marruecos	$\alpha$ -Pinenos (31,25%), Sabinenos (5,21%), Limoneno (5,02%)

Tabla 4. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de diferentes especies de *Juniperus* y subespecies de *J. oxycedrus* de diferente procedencia.

Referencias Especie-Subespecie	Localización	Componentes > 5%
<b>(Adams, et al., 1998)</b> <b>Hojas</b> - <i>Oxycedrus</i> - <i>Badia</i> - <i>Macrocarpa</i>	- Norte y Sur de Grecia; El Penon, España. - Jaen, España. - Tarifa, España.	- $\alpha$ -Pino (25,3-42,7%), Limoneno (4,5-27,7%), $\alpha$ -Felandreno (0,8-8,2%), p-Cimeno (1,5-6,2%), óxido de manoílo (1,7-5,3%), $\beta$ -Felandreno (1,6-5%) - $\alpha$ -Pino (5,1-24,9%), Germacreno D (3,4-24,5%), óxido de manoílo (0,2-21,0%), - Sabineno (26,5%), $\alpha$ -Pino (22,6%), Terpinen-4-ol (7,3%)
<b>(Adams R., 1998)</b> <b>Hojas</b> - <i>Communis</i> - <i>Oxycedrus</i>	Hemisferio Norte	- $\alpha$ -Pino (56,8%), Limoneno (6,9%), $\beta$ -Felandreno (6,9%), Mirceno (5,2%) - $\alpha$ -Pino (41,3%), $\alpha$ -Felandreno (8,2%), p-Cimeno (6,2%), óxido de manoílo (5,3%), $\alpha$ -Terpineol (5%), $\beta$ -Felandreno (5%)

Tabla 5. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) según la época de recolección de *Juniperus* de diferente procedencia.

Referencias Etapa de cosecha	Localización	Componentes > 5%
<b>(Medini, et al., 2010)</b> <b>Hojas</b> - invierno - primavera - verano	Rimel, Hawaria, Makthar, Tabarka (Túnez)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\alpha</math>-Pino (27,35-43,24%), <math>\beta</math>-Bourboneno (14,28%), 10-Epi-<math>\alpha</math>-Muurolo (0,33-11,13%), Acetato de Geranilo (3,22-8,80%), 13-óxido de epimanoílo, <math>\alpha</math>-Terpineno (1,07-5,54%)</li> <li>- <math>\alpha</math>-Pino (43,29-58,03%), <math>\beta</math>-Bourboneno (0,15-9,98%), <math>\alpha</math>-Terpineno (2,10-8,92%), 13-óxido de epimanoílo (1,35-6,70%)</li> <li>- <math>\alpha</math>-Pino (24,32-53,34%), <math>\alpha</math>-Terpineno (0,37-9,68%), <math>\beta</math>-Bourboneno (0,16-8,78%), Abietano (1,97-7,66%), Acetato de Geranilo (2,48-7,14%), 13-óxido de epimanoílo (1,82-5,65%)</li> </ul>

Tabla 6. Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) según la etapa de maduración de *Juniperus* de diferente procedencia.

Referencias Etapa maduración.	Localización	Componentes > 5%
(Angioni, <i>et al.</i> , 2003) - Hojas - Gálbulos inmaduros - Gálbulos maduros	Sardinia (Italia)	- $\alpha$ -Pino (85,95%) - $\alpha$ -Pino (62,26%), Mirceno (17,07%), Germacreno D (13,79%) - $\alpha$ -Pino (70,64%), Germacreno D (12,86%), Mirceno (10,24%)
(Salido, <i>et al.</i> , 2002) - Hojas - Gálbulos inmaduros - Gálbulos maduros	Sierra de la Pandera, Jaén (España)	- $\alpha$ -Pino (39,8-57%), óxido de manoílo (4,8-10,2%), - $\alpha$ -Pino (18,6-65,1%), Germacreno D (0,8-39,5%), Mirceno (4,2-6,8%) - $\alpha$ -Pino (23,1%)
(Milos & Radonic, 2000) - Hojas - Gálbulos inmaduros - Gálbulos maduros	Dalmacia (Croacia)	- $\alpha$ -Pino (41,37%), óxido de manoílo (12,29%), Farnesol (8,60%) acetato de dodecenilo (6,32%) - $\alpha$ -Pino (66,30%), sesquiterpenos (9,87%) - $\alpha$ -Pino (61,21%), $\beta$ -Mirceno (5,73%), sesquiterpenos (5,22%)

Tal como se observa a través de la información proporcionada en las anteriores tablas, las diferencias encontradas en los principales compuestos del aceite esencial del *Juniperus* se ha relacionado con las diferentes subespecies (Adams, *et al.*, 1998) (Adams R. 1998), así como con las diferentes partes de la planta y sus distintas fases de maduración (Medini, *et al.*, 2010) (Angioni, *et al.*, 2003) (Salido, *et al.*, 2002) (Milos & Radonic, 2000) (Brice Boti, *et al.*, 2006).

## **OBJETIVOS DE TRABAJO**

## 2. Objetivos del trabajo.

Como ya se ha indicado anteriormente, el grado de maduración afecta al rendimiento y composición del aceite esencial tal como queda patente en los resultados de las investigaciones anteriormente referidas. No obstante, en estos trabajos la distinción entre niveles de maduración se ha realizado de modo visual o basándose en factores estacionales, distinguiendo tan solo dos niveles.

Por ello, el objetivo de este trabajo es el desarrollo y aplicación de un método para conocer las diferencias en el rendimiento y composición de los aceites esenciales del *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus*, según el grado de maduración, basado en la medida física del color.

**Nuestro plan de trabajo** se ha desarrollado en las siguientes fases:

- Recolección del material vegetal de las diferentes zonas geográficas: Liria, Segart, Espadán.
- Clasificar según el grado maduración en 5 grupos por medio de dos fases; una visual y otra a través de una medida física del color.
- Realizar un análisis estadístico de los grados de maduración.
- Determinación de la humedad para los diferentes grados de maduración
- Extracción-destilación simultanea de los aceites esenciales de las muestras seleccionadas.
- Analizar por cromatografía de gases con espectroscopia de masas (GC/MS) como método de detección para identificar la composición de los aceites esenciales y con detección mediante ionización de llama (FID) para su cuantificación.
- Analizar estadísticamente los cambios en la composición según el grado de maduración.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. Material y métodos.

#### 3.1 Material vegetal.

El material vegetal se obtuvo de 3 zonas distintas de la Comunitat Valenciana: Segart, Liria y La Sierra de Espadán. De cada zona se extrajeron muestras de 3 individuos diferentes, la recolección se realizó en el periodo de diciembre 2016- enero 2017, para contar con gábulos en diferentes estados de maduración. Tras la clasificación por el color, las muestras fueron conservadas a -40°C hasta el momento de su análisis.

La localización de las zonas de muestreo viene indicada por sus coordenadas teniendo en cuenta que los individuos muestreados se sitúan aproximadamente en un radio de 1 km en torno a los puntos indicados.

- **Segart.** (4 individuos, muestreados en dos etapas de maduración: noviembre de 2016 y enero de 2017) 39°40'46"N, 0°22'35"O, 303 m altitud.
- **Liria.** (3 individuos) 39°37'38"N, 0°40'46"O, 183 m altitud.
- **Espadán (Ahín).** (3 individuos) 39°53'38"N, 0°21'26"O, 765 altitud.
- Desde el punto de vista bioclimático, los dos primeros emplazamientos corresponden al clima termomediterráneo (Costa, 1983); mientras que la zona de muestreo de la Sierra de Espadán, por su ubicación y altitud, puede considerarse de clima mesomediterráneo de acuerdo con la información aportada por Estellés y Mollar (2012).



### 3.2. Selección de muestras.

De todas las muestras que se obtuvieron tras la recolección del material vegetal, se realizó una separación a nivel visual de los gálbulos de cada individuo, para llevar a cabo posteriormente un análisis de color con un método físico.

#### 3.2.1. Clasificación visual.

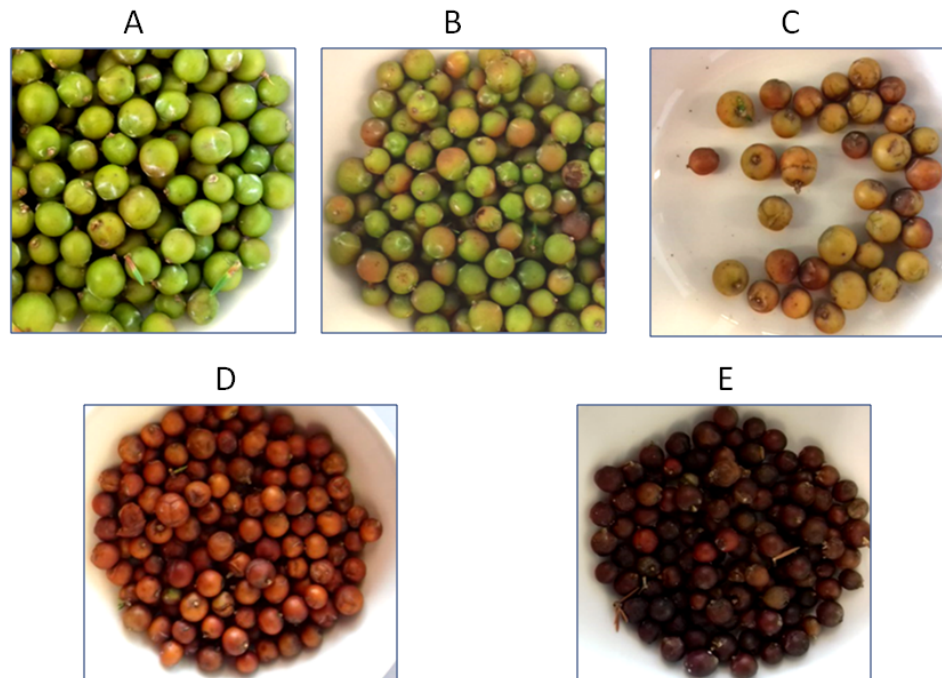


FIGURA 6. GÁLBULOS DE *JUNIPERUS* EN LOS DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN.

Escala visual definida para la clasificación preliminar:

- Nivel A. Gálbulos con coloración homogénea verde, que abarca la totalidad o casi totalidad de la superficie.
- Nivel B. Gálbulos que presentan una coloración mixta verde-rojiza, donde esta última coloración abarca al menos la mitad de su superficie.
- Nivel C. Gálbulos con un color pardo amarillento.
- Nivel D. Gálbulos con coloración rojiza intensa y homogénea.
- Nivel E. Gálbulos de color rojo oscuro llegando a negro.

De las 41 muestras obtenidas, la clasificación según la escala visual fue:

Tabla 7. Muestras obtenidas según la escala visual.

LOCALIDAD	NIVEL DE MADURACIÓN				
	A	B	C	D	E
ESPADÁN	3	3		1	1
LLIRIA	1	1	1	3	3
SEGART	6	5	2	5	6

### 3.2.2. Clasificación inicial por medida física del color.

Materiales.

Lector de Color CR-10 Plus (Konica Minolta) y recipiente con fondo blanco.



FIGURA 7. LECTOR DE COLOR CR-10 PLUS (KONICA MINOLTA).

Fundamento.

El color de los gábulos está relacionado con el grado de madurez, por tanto, la medida física del color sirve para determinar de forma rápida algunos parámetros y características que serían más complicados de evaluar por otros procedimientos más complejos. (Chiralt Boix, *et al.*, 2007). El ojo humano no percibe las pequeñas diferencias de color, de modo que la apreciación subjetiva tiene inconvenientes ya que depende del observador y de las características externas.

Según indican Chiralt *et al.* (2007), el empleo de escalas uniformes de color se justifica como una simplificación del estudio de las tolerancias de color, buscando estrechar la separación cromática en las zonas de los verdes y alargar la de los azules; de este modo se

han diseñado espacios de color que se correlacionan con el color percibido (luminosidad, tono y pureza).

En este trabajo se usa como método clasificatorio de color el espacio CIE  $L^*a^*b^*$ ; es un sistema cartesiano en 3 dimensiones:

- $L^*$ : eje vertical, mide la luminosidad del color variando desde 0 (negro) a 100 (blanco); los colores fluorescentes pueden dar más de 100.
- $a^*$ : eje horizontal, mide el rojo-verde dando un valor positivo a los rojos y negativo a los verdes.
- $b^*$ : eje horizontal (perpendicular a  $a^*$ ), mide el amarillo-azul dando valor positivo a los amarillos y negativo a los azules.

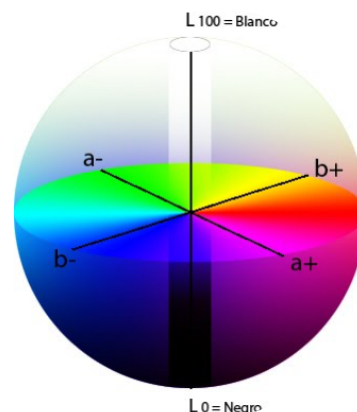


FIGURA 8. SISTEMA CIE  $L^*A^*B^*$  en 3D.

Con estos valores se pueden calcular los atributos del color percibido (luminosidad, tono y croma).

Metodología.

De cada una de las muestras se realizaron 14 mediciones de color y como resultado se obtuvieron las coordenadas  $dL$ ,  $da$  y  $db$  en el sistema CIE  $L^*a^*b^*$ . De las 14 mediciones se eliminaron más alejados de la media, teniendo en cuenta las tres variables, en concreto se eliminaron cuatro valores (los dos más altos y los dos más bajos). De este modo se descartaron los valores con datos anómalos, que podían deberse a errores cometidos durante medición de color. Debe tenerse en cuenta que el aparato de medida se utiliza preferentemente para medir el color en superficies planas o con escasa curvatura, por lo que, en este trabajo, dadas las características de la superficie a medir (figura 6), las desviaciones en las medidas son más acusadas.

Dado que para uno de los niveles (C) solamente se obtuvieron 3 muestras con una masa suficiente para poder posteriormente realizar las determinaciones analíticas (% de

humedad y extracción y análisis del aceite esencial), se optó por seleccionar 5 muestras del resto de los niveles, de modo que se obtuviera un número final de muestras suficientemente elevado de cara al tratamiento estadístico final, guardando la máxima homogeneidad posible en el número de muestras para cada nivel de maduración.

De este modo, para los niveles A, B, D y E se seleccionaron las muestras según el siguiente criterio (anexo 1): para cada nivel se seleccionaron las cinco muestras cuya suma de las desviaciones relativas respecto de la media para cada una de las tres variables estudiadas fuera mínima. Una vez seleccionadas las muestras finales (23), para cada nivel de maduración se separó de las muestras la cantidad mínima necesaria para realizar la medida de contenido en humedad por triplicado. El material vegetal restante es el que sería posteriormente objeto de extracción y análisis químico.

### **3.3. Extracción-destilación simultánea de los aceites esenciales. Likens-Nickerson.**

#### **3.3.1. Materiales.**

- Triturador doméstico.
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A)
- Vasos de precipitados (PYREX).
- Matraz aforado 500ml (vidraFOC).
- Embudo de decantación (vidraFOC).
- Placa calefactora.
- Manta térmica (Ibs-Instruments).
- Termómetros.
- Espátulas.
- Viales de vidrio.
- Extractor.
- Tubos refrigerantes.
- Equipo de vacío.
- Pipetas.
- Embudo de plástico y vidrio.
- Disolvente: Diclorometano

### 3.3.2. Fundamento.

La extracción-destilación simultánea se trata de una extracción en continuo. Se compone de dos partes, por un lado, está el matraz A; que contiene material vegetal y agua desionizada (calentados mediante manta calefactora), en donde se produce un arrastre de los compuestos volátiles por el vapor de agua y, por otro lado, está el matraz B; que contiene el disolvente orgánico de distinta densidad al agua (diclorometano en nuestro caso) y que se introduce en un baño de agua caliente a 60-65°C. De este modo, los vapores del disolvente y vapor de agua, que arrastra los compuestos volátiles del material vegetal, entran en contacto en el mismo refrigerante donde los vapores del disolvente orgánico extraen los componentes del aceite esencial. En el refrigerante los vapores se condensan y separan en dos fases: la orgánica con los compuestos volátiles extraídos; que se lleva al matraz B; y la acuosa; que se lleva al matraz A (El Anhar, A., 2016).

El matraz B, con el disolvente orgánico se va enriqueciendo de los compuestos volátiles extraídos.

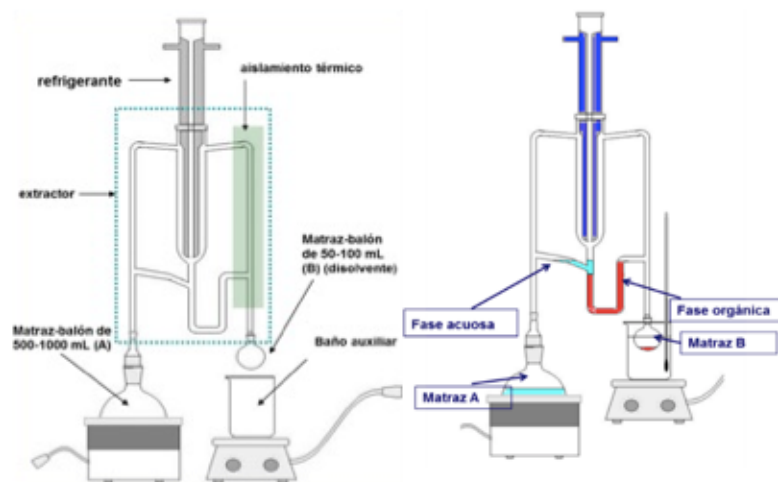


FIGURA 9. EQUIPO DE EXTRACCIÓN-DESTILACIÓN SIMULTANEA LIKENS-NICKERSON.

### 3.3.3. Metodología.

Para comenzar, por un lado, se pesa el material vegetal, en este caso gábulos de *J. oxycedrus spp. oxycedrus*, triturado en un vaso de precipitados y se introduce dentro de un matraz de 500 ml al que se le incorporan 300 mL agua desionizada que se coloca en una manta calefactora. En el matraz auxiliar (a la derecha), se introducen 5 mL de disolvente orgánico, en nuestro caso diclorometano que es más denso que el agua. Dicho matraz se introduce en un baño de agua caliente manteniendo una temperatura constante de 60-65°C. Ambos se unen al extractor con unas pinzas y teflón para evitar que no haya pérdidas.

En el cuerpo del extractor se añade también diclorometano de modo que su nivel quede aproximadamente 1 cm por debajo de la conexión con el matraz de 500 mL. Se añade también agua desionizada para que la recirculación del agua a su matraz y del diclorometano al suyo comience a producirse lo antes posible, acelerando así el proceso.

Una vez montado el extractor, se incorporan al equipo el refrigerante y la bomba de vacío, de este modo durante el proceso se produce una hidrodestilación en el matraz del material vegetal que arrastra los componentes volátiles por el extractor hasta llegar al refrigerante donde se une el vapor de agua con los componentes volátiles del material vegetal al vapor refrigerante, una vez llegados a este punto ambos vapores se mezclan y precipitan, debido a las diferentes densidades del agua y del diclorometano hay una separación de fases. Por un lado, la fase acuosa que vuelve al matraz del material vegetal, y por otro lado, la fase orgánica que contiene los componentes volátiles y es llevado al matraz del diclorometano. De modo que los componentes volátiles en el matraz van aumentando su concentración a medida que se produce la hidrodestilación en el matraz del material vegetal y da lugar la extracción-destilación simultáneas.

Este proceso tiene una duración de dos horas. Una vez transcurridas se apaga la manta calefactora y se retira en baño de agua para dejar que se enfríe; una vez enfriado se recoge el diclorometano en el matraz y se le añade  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para deshidratarlo; se trasvasa el diclorometano, una vez filtrado, a un vial de vidrio donde es cerrado y sellado, almacenándose a  $-25^\circ\text{C}$ . Previamente al análisis cromatográfico, cada extracto es concentrado en rotavapor, funcionando a temperatura ambiente, hasta un volumen final de 1 mL. En este momento se incorpora el estándar interno (1-2  $\mu\text{L}$ ), dependiendo de la masa de material vegetal de la muestra. Los viales cromatográficos, convenientemente cerrados con el tapón (septum) y sellados con parafilm, son ya utilizados para los análisis cromatográficos (Llorens-Molina, 2011).

#### **3.4. Identificación y cuantificación. Cromatografía de gases.**

En este trabajo se han utilizado dos variantes de las técnicas analíticas de cromatografía de gases. En primer lugar, se utilizó la cromatografía de gases con detector de espectroscopía de masas (CG-EM) para la identificación inicial de los componentes de las muestras de aceite esencial y, en segundo lugar, con detector de ionización de llama (GC-FID) para la cuantificación aproximada basada en el método de normalización de las áreas de los picos.

Para ambos métodos los compuestos han sido identificados combinando el cálculo de los índices de retención de Kovats y el análisis mediante CG-EM. Con una hoja de cálculo se aplica la fórmula del índice de Kovats mostrada a continuación:

$$IK = 100 X n + 100 \frac{\log_{10}t_{Rx} - \log_{10}t_{Rn}}{\log_{10}t_{RN} - \log_{10}t_{Rn}}$$

Donde:

$n$  es el número de átomos de carbono del  $n$ -alcano que eluye antes del pico analizado.

$t_{Rx}$  es el tiempo de retención del pico analizado.

$t_{Rn}$  es el tiempo de retención del  $n$ -alcano anterior al pico analizado.

$t_{RN}$  es el tiempo de retención del  $n$ -alcano posterior al pico analizado.

El siguiente diagrama muestra todo el proceso analítico realizado en este trabajo:

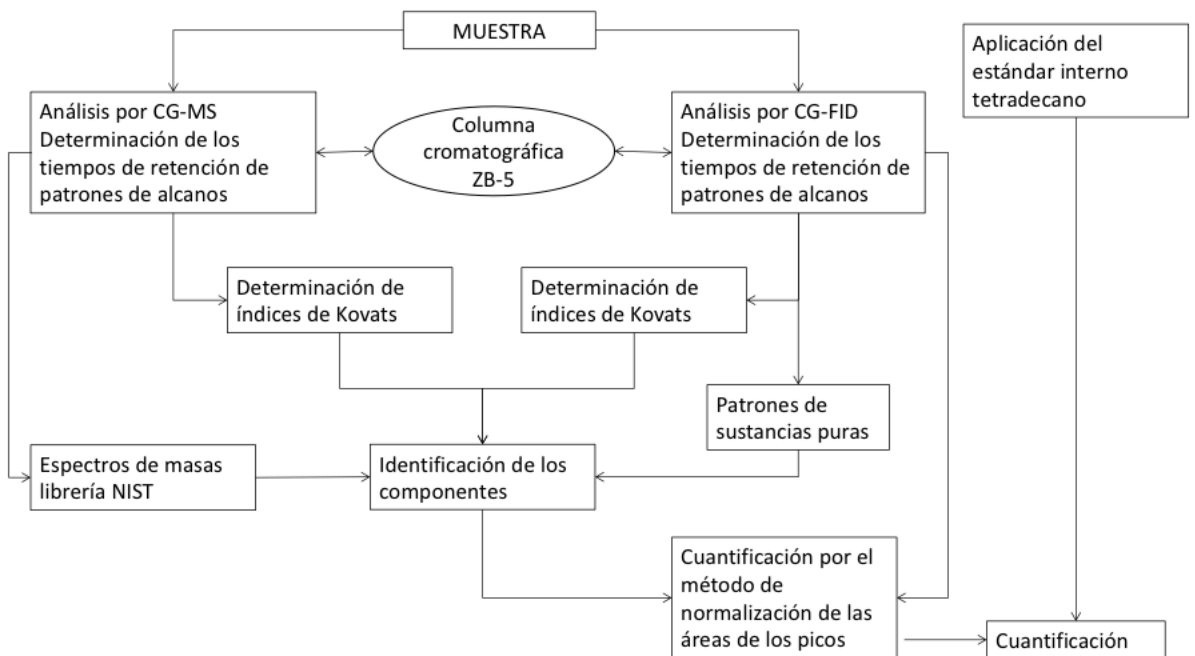


FIGURA 10. ESQUEMA DEL MÉTODO ANALÍTICO.

### 3.4.1. Cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-EM).

Materiales.

- Cromatógrafo de gases y detector de masas (Clarus 500 GC-MS)
- Columna capilar ZB-5.
- Fase móvil (gas Helio)

Fundamento.

La cromatografía de gases es una técnica por la cual se realiza la separación de los componentes de una mezcla, por las diferentes conductas que tienen frente a la fase estacionaria y móvil que componen el equipo, pero con esta técnica solo no se puede realizar una identificación de forma inequívoca. Es por ello, que para la identificación de los

componentes ya separados se utiliza la espectrometría de masas que usa campos eléctricos y magnéticos para la identificación de los iones en relación a su masa-carga. La unión de estas dos técnicas permite analizar y cuantificar compuestos orgánicos volátiles, combinando la separación de la cromatografía y la capacidad selectiva del detector.

Metodología.

Para la espectroscopia de masas, la fase móvil es el gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min la temperatura del inyector fue de 250°C, y la temperatura del horno fue desde los 50°C a los 250°C a razón de 3°C/min. La detección fue realizada en modo de ionización de impacto electrónico (modo impacto electrónico, 70 eV), siendo la temperatura de la fuente de ionización de 200°C. Los espectros se obtuvieron mediante el modo de escaneo total de iones (rango de masas  $m/z$  45-500 uma). Los cromatogramas y espectros se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Los datos que se obtuvieron fueron registrados y comparados con la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU), de forma que las sustancias correspondientes a cada pico del cromatograma fueron identificadas a partir de la probabilidad estimada mediante dicha aplicación, calculada en base a la similitud del espectro de masas del pico problema con los espectros de masas incluidos en la base de datos.

#### 3.4.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).

Materiales.

- Cromatógrafo de gases Clarus 500 GC de Perkin-Elmer Inc. (Wellesley, MA, EEUU)
- Columna capilar ZB-5.
- Gas Helio.
- *Software* TotalChrom 6.2 (Perkin Elmer Inc.)
- *Tetradecano como estándar interno (Sigma-Aldrich)*

Fundamento

Esta técnica se basa en la combustión de los compuestos orgánicos en una llama, estos compuestos al quemarse dan lugar a iones y electrones que son capaces de conducir la corriente eléctrica. Es uno de los detectores más utilizados debido a su respuesta casi universal a los compuestos orgánicos, la intensidad de la corriente se mide utilizando dos electrodos a ambos lados de la llama.

Se debe de tener en cuenta que se trata de un detector destructivo, con una alta sensibilidad, un amplio intervalo lineal de respuesta y bajo ruido de fondo.



### Metodología.

La cuantificación de las muestras se realizó por medio del cromatógrafo de gases, equipado también con una columna capilar ZB-5 (con las mismas características mencionadas anteriormente). El volumen de muestra inyectada fue de 1 o 2  $\mu\text{L}$ . Como gas portador se utilizó el Helio con un caudal de 1,2 mL/min, las temperaturas del inyector y el detector fueron de 250°C, y la temperatura del horno fue desde los 50°C a los 250°C a razón de 3°C/min. Una vez se obtuvieron los cromatogramas se procesaron con el *software* TotalChrom 6.2 (Perkin Elmer Inc.).

El cálculo del rendimiento se hizo a partir del extracto seco de la muestra. Se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \left( \frac{m \text{ tetradecano}}{m \text{ (aceite esencial)} * \left(1 - \left(\frac{\% \text{ Humedad}}{100}\right)\right)} \right) * 100$$

La masa del material destilado se calcula teniendo en cuenta el área del estándar interno en el cromatograma FID de cada muestra con la siguiente ecuación:

$$m \text{ (aceite esencial)} = m \text{ (tetradecano)} * \left( \frac{100 - \% \text{ est interno}}{\% \text{ est interno}} \right)$$

Siendo la masa de tetradecano:

$$m \text{ (tetradecano)} = \rho * V$$

$$\rho = 0,764 \text{ g/cm}^3$$

Una vez realizados los cálculos, se llevó a cabo un estudio estadístico (ANOVA simple) para comprobar la existencia de diferencias significativas en la composición y rendimiento, con respecto al grado de maduración.

### 3.5. Determinación de la humedad.

#### 3.5.1. Materiales.

- Estufa a vacío (*Vaciotem-T, JP Selecta, España*).
- Capsulas de vidrio
- Guantes (*Semperguard*).
- Desecador.
- Balanza analítica (*Kern*).

### 3.5.2. Fundamento.

Método por secado en estufa de vacío.

Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si disminuye la presión del sistema y necesariamente se reduce su punto de ebullición. Si se sustrae aire de una estufa por medio de vacío se incrementa la velocidad del secado.

Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg. y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y que no se evaporen los compuestos volátiles de la muestra, cuya presión de vapor también ha sido modificada (Nollet, 1996).

### 3.5.3. Metodología.

Las muestras para la determinación de humedad según los diferentes grados de maduración del *Juniperus oxycedrus*, se obtuvieron, como ya se indicó anteriormente, de una mezcla de las diferentes muestras de A, B, C, D y E de las cuales se extrajeron 3 muestras de aproximadamente 3 g cada una de ellas (A<sub>1</sub>; A<sub>2</sub>; A<sub>3</sub>; B<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>; B<sub>3</sub>; C<sub>1</sub>; C<sub>2</sub>; C<sub>3</sub>; D<sub>1</sub>; D<sub>2</sub>; D<sub>3</sub>; E<sub>1</sub>; E<sub>2</sub>; E<sub>3</sub>). Estas muestras estaban previamente trituradas y clasificadas para la extracción-destilación, y se conservaron en congelación a -40°C hasta el momento de la determinación.

Para realizar la determinación de humedad se pesaron los 3 g en las capsulas de vidrio; que habían sido pesadas previamente sin muestra después de tenerlas en el desecador para obtener el peso constante. A continuación, se introdujo la muestra en la estufa de vacío durante 3 horas; una vez transcurrido el tiempo se retiraron las muestras y se dejaron enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente, para ser pesadas de nuevo. La obtención de los resultados de la humedad se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(\text{Peso muestra fresca} + \text{capsula}) - (\text{Peso muestra seca} + \text{capsula})}{\text{Peso muestra fresca}} \times 100$$

### 3.6. Análisis estadístico.

En primer lugar, para comprobar la correcta clasificación de los gábulos se realizó un análisis discriminante el cual ayuda a distinguir entre los grupos basándose en las variables introducidas (dL, dA y dB). La aplicación de este método permite obtener un conjunto de funciones que son combinación lineal de las citadas, de modo que sus coeficientes determinan el mayor o menor peso de cada una de ellas en el valor de la función. La expresión gráfica de la relación entre las dos primeras funciones discriminantes (que habitualmente explican un elevado % de la varianza, permite visualizar el grado de independencia de los grupos de muestras o individuos estudiados). Constituye pues, una medida de la calidad de la clasificación establecida. Al mismo tiempo, este método permite también la inclusión objetiva de nuevos individuos o muestras en la clasificación previamente establecida.

Para analizar la relación entre grado de maduración y rendimiento y composición química, se llevó a cabo un análisis ordinario de varianza ANOVA, utilizando como variables los porcentajes de los compuestos principales y de los tipos de compuestos presentes en el aceite esencial. En ambos estudios se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI. Respecto al análisis estadístico para ver las diferencias en cuanto a la composición química según el grado de maduración de los gábulos, se realizó un ANOVA simple que construye un modelo estadístico donde se describe el efecto del grado de maduración sobre la composición química, las pruebas realizadas determinan si hay o no diferencias significativas entre las media, varianzas y medianas de los compuestos químicos en los diferentes grados de maduración. Para constatar si las diferencias son significativas o no, se tienen en cuenta los resultados de las siguientes pruebas:

- Prueba-F: se realiza una tabla de ANOVA, donde se compran las medias y como resultado final para que haya una diferencia significativa el valor-P debe de ser menor a 0,05.
- Prueba de Rangos Múltiples: compara las medias de modo que indica cuales tienen diferencias significativas entre ellas.
- Visualmente, la prueba anterior se expresa en el gráfico de medias: las medias de los niveles se representan en una gráfica que permite la comparación entre las medias por los intervalos LSD (“Least Significant Difference”). La magnitud de estos intervalos permite la comparación entre las medias, de modo para que pueda aceptarse entre ellas una diferencia una diferencia significativa (en este trabajo, se acepta el 95 % de probabilidad - $P < 0.05$ -).

## RESULTADOS

## 4. Resultados.

### 4.1. Estudio de color.

El análisis discriminante del color por método físico diferenció significativamente los grados de maduración, como se puede observar en la siguiente figura:

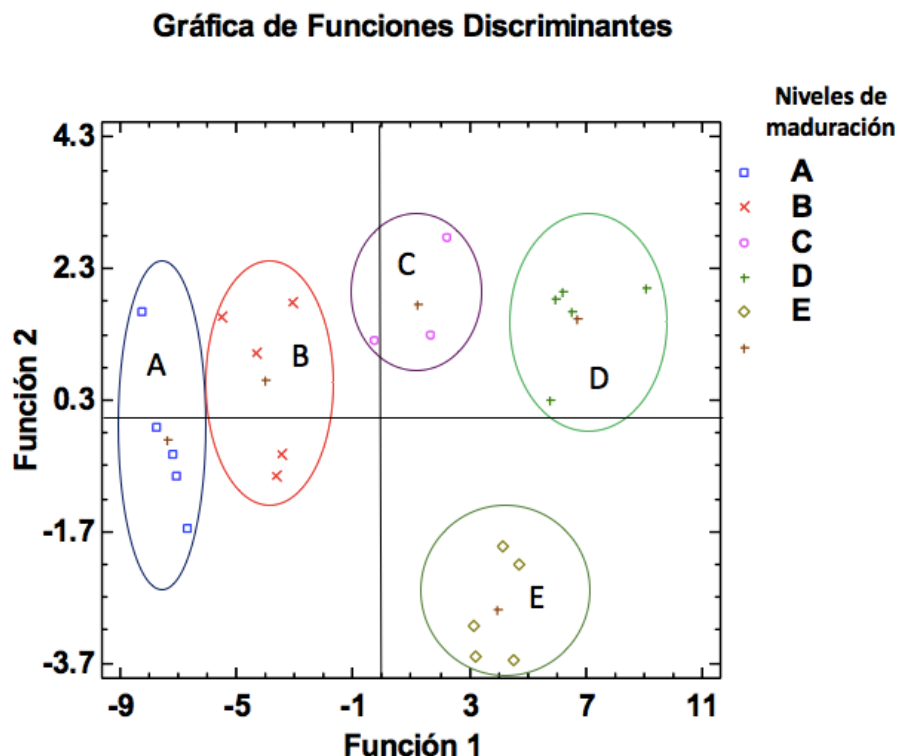


FIGURA 11. GRÁFICA DE LAS FUNCIONES DISCRIMINANTES.

El desarrollo completo del análisis discriminante se muestra en el anexo 3. Las dos funciones discriminantes definidas (cuya relación se representa en el gráfico) explican el 99.81 % de la varianza. Los valores de  $\lambda$  de Wilks para ambas funciones muestran que las diferencias son ampliamente significativas: F1 (0.00533839), F2 (0.200115).

$$F1 = 0.025062*dL + 0.98291*dA - 0.703112 * dB$$

$$F2 = 0.656078*dL + 0.471193*dA + 0.660139*dB$$

Dado que la función F1 explica el 90.75 % de la varianza y teniendo en cuenta los pesos de las variables dA y dB, puede interpretarse fácilmente la distribución de los grupos de muestras en el gráfico. Para los niveles A, B, C y D, alineados consecutivamente a lo largo del eje de abscisas (F1), la gradación rojo-verde (dA) y amarillo-cian (dB), cada una en sentido contrario, permite clasificar por el color los niveles de maduración establecidos. En cuanto al nivel E, se observa que su diferencia con el resto viene dada por los valores de F2 (eje de ordenadas). Efectivamente, en esta función dL (luminosidad tiene un peso mayor, comparable al de las otras variables). De hecho, estas muestras, desde el punto de vista

visual se distinguen del resto por su aspecto acusadamente oscuro o negruzco. Por último, cabe citar (anexo 2) que se obtuvo un 100% en el porcentaje de casos bien clasificados.

#### 4.2. Determinación de la humedad.

Los datos obtenidos durante la determinación de la humedad, están recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 8. Determinación de la humedad de los diferentes grados de maduración.

	PESO CAPSULA (SIN MUESTRA)	PESO MUESTRA FRESCA + CAPSULA	PESO MUESTRA SECA + CAPSULA	PESO MUESTRA FRESCA (SIN CAPSULA)	%H	MEDIA %H
A <sub>1</sub>	22,834	25,728	24,272	2,894	50,31	50,16 ± 0,13
A <sub>2</sub>	21,401	24,358	22,878	2,957	50,05	
A <sub>3</sub>	20,126	23,073	21,596	2,947	50,12	
B <sub>1</sub>	21,126	24,23	22,77	3,104	47,04	47,46 ± 0,36
B <sub>2</sub>	22,396	25,378	23,956	2,982	47,69	
B <sub>3</sub>	20,551	23,521	22,106	2,97	47,64	
C <sub>1</sub>	31,037	33,933	32,897	2,896	35,77	36,04 ± 0,36
C <sub>2</sub>	30,979	33,876	32,836	2,897	35,90	
C <sub>3</sub>	54,551	57,454	56,396	2,903	36,45	
D <sub>1</sub>	52,859	55,752	55,332	2,893	14,52	14,40 ± 0,31
D <sub>2</sub>	55,159	58,035	57,614	2,876	14,64	
D <sub>3</sub>	54,966	57,907	57,494	2,941	14,04	
E <sub>1</sub>	54,526	57,48	57,086	2,954	13,34	13,03 ± 0,26
E <sub>2</sub>	34,917	37,89	37,508	2,973	12,85	
E <sub>3</sub>	22,118	25,06	24,68	2,942	12,92	

De los 5 grados de maduración que se han establecido (A, B, C, D y E) para el *Juniperus*, aquellos que tienen el grado de maduración más bajo (A) presentan una mayor humedad, y por tanto un mayor contenido en agua. Se puede observar que la disminución en humedad es progresiva a medida que va avanzando la madurez de los gálbulos.

### 4.3. Extracción del aceite esencial.

De las muestras destiladas según los cinco grados de maduración, los gálbulos de B y C son los que registraron mayor rendimiento. El rendimiento se calculó sobre el extracto seco de las muestras, a continuación, se muestra una tabla con los % de rendimiento.

Tabla 9. Rendimiento de la extracción de aceites esenciales según su grado de maduración.

Muestra	% Rendimiento ( $m_{AE}/m_{\text{materia seca}}$ )
A	1,62 ± 0,37
B	2,31 ± 0,62
C	1,84 ± 0,56
D	1,62 ± 0,39
E	0,8 ± 0,18

Para comprobar si había diferencias significativas entre los rendimientos, se realizó un ANOVA con el Statgraphics, como los datos están expresados en % es necesario aplicar la transformación  $ASENO(RAIZ(x/100))$ . Como resultado se observaron 3 grupos homogéneos que vienen representados en siguiente el gráfico LSD:

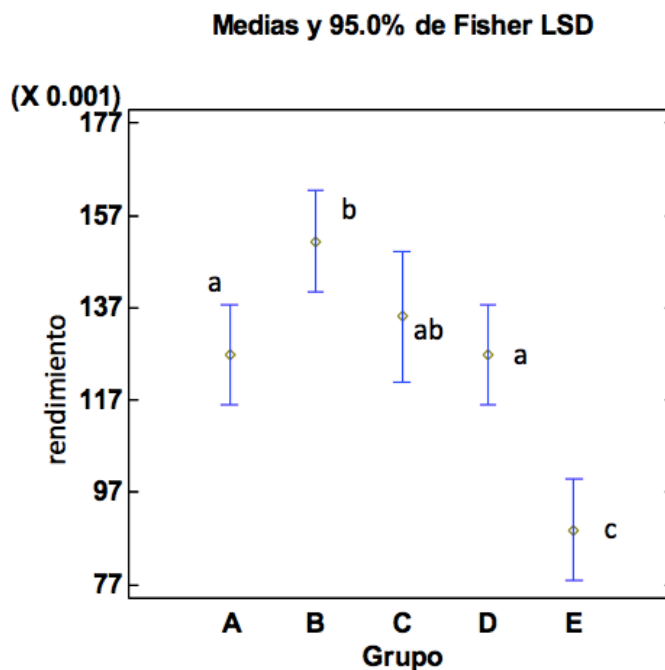


FIGURA 12. MEDIAS E INTERVALOS LSD DE LOS RENDIMIENTOS SEGÚN EL GRADO DE MADURACIÓN (datos sometidos a la transformación  $ASENO(RAIZ(x/100))$ ).

Donde letras diferentes (a, b y c) muestran los grupos con diferencias significativas.

#### 4.4. Composición de los aceites esenciales.

##### 4.4.1. Cromatograma de gases.

En el cromatograma se muestra la identificación de los compuestos del aceite esencial de *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus* (en una de las muestras) que están presentes en mayor cantidad:

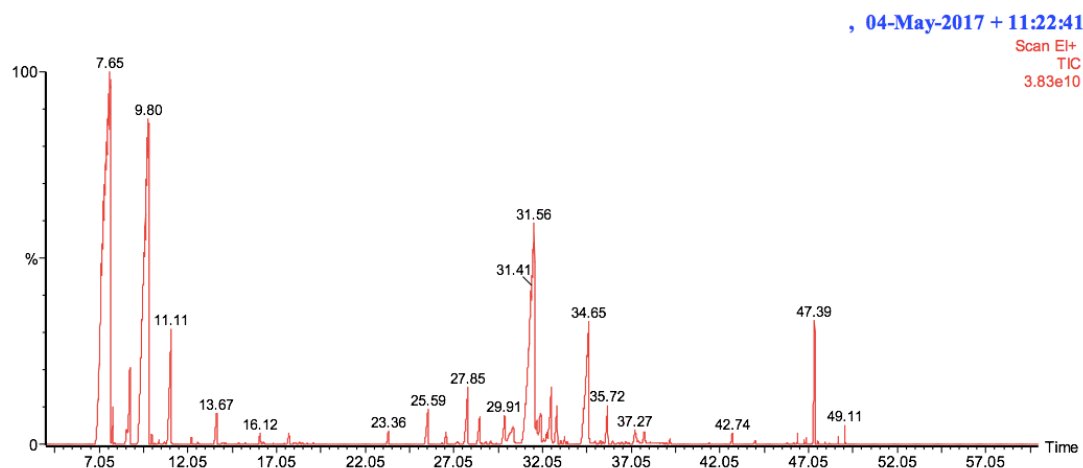


FIGURA 13. CROMATOGRAMA GC/MS DE ACEITE ESENCIAL DE *JUNIPERUS OXYCEDRUS* SPP. *OXYCEDRUS* DE LA MUESTRA B2.

##### 4.4.2. Caracterización química del aceite esencial.

A continuación, se ha seleccionado la muestra B2 (tabla 10) para mostrar un ejemplo de los compuestos identificados y la estimación de la proporción relativa de dichos compuestos en la muestra de aceite. La composición porcentual de aceite esencial de cada muestra, se calcula a partir de las áreas de pico de los cromatogramas, mediante el programa TURBOMASS (5.00) (PerkinElmer™).

La identificación de todas las muestras viene en el Anexo 3 (final del texto).



Tabla 10. Composición química de la muestra B2 de *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus*.

<sup>a</sup>: tiempo de retención, en orden de elución en la columna cromatográfica ZB-5.

<sup>b</sup>: Índice de retención de Kovats experimental.

<sup>c</sup>: tanto por cien con respecto al área total de los picos del cromatograma obtenido mediante GC/MS.

<sup>d</sup>: Trazas (%<0,1)

TR <sup>a</sup>	RI (KOVATS) <sup>b</sup>	COMPUESTO	% AREA (TIC) <sup>c</sup>
7.000	954	$\alpha$ -pineno	38.03
7.810	958	Canfeno	0.30
7.925	961	Thuja-2,4(10)-dieno	0.01
8.265	969	Verbenona	t <sup>d</sup>
8.595	977	Sabineno	0.26
8.780	981	$\beta$ -pineno	1.47
9.816	1003	Mirceno	22.82
10.016	1008	$\alpha$ -felandreno	0.08
10.196	1013	$\delta$ -3 careno	0.01
10.421	1018	$\alpha$ -terpineno	0.05
10.736	1026	$\rho$ -cimeno	0.03
11.096	1035	Limoneno	2.81
11.356	1041	(Z)- $\beta$ -ocimeno	t
12.247	1060	$\gamma$ -terpineno	0.08
12.602	1067	(Z)-hidrato de sabineno	0.03
13.667	1088	terpinoleno	0.62
14.017	1095	(E)-hidrato de sabineno	0.03
14.177	1098	Perileno	0.02
14.322	1100	(Z)-tuyona	0.00
14.64	1108	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	t
14.833	1113	(E)-tuyona	t
14.913	1115	(E)-1,2:4,5-diepoxi- <i>p</i> -mentano	0.01
15.278	1123	$\alpha$ -camfolenal	0.02
16.123	1142	Alcanfor	0.18
16.313	1146	Hidrato de camfeno	0.03
16.848	1157	(Z)-pinocamfona	0.01
16.953	1160	Pinocarvona	t
17.489	1171	(E)-pinocamfona	0.01
17.749	1176	Terpinen-4-ol	0.20
18.009	1181	<i>p</i> -Metil acetofenona	0.01
18.109	1183	<i>p</i> -8-cimenol	0.02
18.359	1188	$\alpha$ -terpineol	0.04
18.779	1196	Dodecano	0.01

---

<b>18.924</b>	1198	( <i>E</i> )-dihidro carvona	t
<b>19.134</b>	1203	Verbenona	0.01
<b>20.730</b>	1240	Carvona	0.01
<b>22.631</b>	1281	acetato isobornilo	0.00
<b>23.356</b>	1296	Tridecano	0.23
<b>25.582</b>	1349	$\alpha$ -cubebeno	0.85
<b>26.372</b>	1367	$\alpha$ -Ylangeno	0.01
<b>26.607</b>	1372	$\alpha$ -copaeno	0.20
<b>26.932</b>	1380	$\beta$ -bourboneno	0.01
<b>27.267</b>	1387	$\beta$ -elemeno	0.05
<b>27.838</b>	1399	tetradecano (estándar interno)	1.41
<b>28.503</b>	1416	$\beta$ -cariofileno	0.64
<b>28.633</b>	1420	$\beta$ -Dupriziano	0.01
<b>28.853</b>	1425	$\beta$ -copaeno	0.05
<b>29.128</b>	1432	( <i>E</i> )- $\alpha$ -bergamoteno	0.06
<b>29.443</b>	1440	Aromadendreno	0.01
<b>29.908</b>	1452	$\alpha$ -humuleno	0.60
<b>30.389</b>	1463	Sesquisabineno	0.83
<b>31.569</b>	1491	Germaceno-D	14.15
<b>31.724</b>	1495	$\gamma$ -amfeno	0.21
<b>31.939</b>	1500	$\alpha$ -muuroleno	0.60
<b>32.124</b>	1504	$\alpha$ -cupreneno	0.04
<b>32.534</b>	1516	$\gamma$ -cadinene	1.50
<b>32.860</b>	1524	$\delta$ -cadinene	0.79
<b>33.090</b>	1530	( <i>E</i> )-cadin-1,4-dieno	0.06
<b>33.295</b>	1536	$\alpha$ -cadineno	0.10
<b>33.445</b>	1540	$\alpha$ -calacoreno	0.03
<b>34.635</b>	1570	trans-nerolidol	5.88
<b>35.005</b>	1579	oxido de cariofileno	0.04
<b>35.301</b>	1587	$\beta$ -copaen-4-ol	0.04
<b>35.451</b>	1590	salvial-4(14)-en-1-ona	0.03
<b>35.711</b>	1597	Hexadecano	0.77
<b>36.016</b>	1605	Epóxido de humuleno (II)	0.05
<b>36.731</b>	1625	cubenol <1-epi>	0.03
<b>37.266</b>	1640	muurolol <epi- $\alpha$ >	0.44
<b>37.781</b>	1654	selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	0.26
<b>38.287</b>	1668	bisabolol-epi- $\beta$	0.02
<b>38.812</b>	1682	bisabolol-epi- $\alpha$	0.03
<b>39.232</b>	1693	Heptadecano	0.07
<b>42.738</b>	1793	Octadecano	0.17
<b>45.845</b>	1894	Nonadecano	0.01
<b>46.425</b>	1928	5, 15-rosadieno	0.09

<b>46.790</b>	1954	geranil linalool <Z,Z>	0.03
<b>46.915</b>	1963	Sandaracopimara-8(14),15-dieno	0.05
<b>47.375</b>	1994	Oxido de manoílo	1.64
<b>47.560</b>	2011	Oxido de manoílo <13-epi>	0.02
<b>47.990</b>	2057	Abietatrieno	0.01
<b>48.241</b>	2083	Abietadieno	0.01
<b>49.101</b>	2197	sandaracopimarinal	0.09
		<b>Total identificado</b>	99.4

Los datos cuantitativos para las distintas muestras analizadas se exponen en el anexo 1. Se ha logrado identificar unos porcentajes superiores al 95% en la mayoría de las muestras (D4 tiene un rendimiento del 94,9%). Se encontraron un total de 74 compuestos entre las 23 muestras analizadas en un tiempo de retención de los 7 a los 50 minutos. Todas las muestras coinciden en los compuestos mayoritarios, siendo el  $\alpha$ -pineno el compuesto con mayor presencia (del 67,7% A1 hasta 30,1% D4). Como segundo compuesto mayoritario cabría destacar la presencia de mirceno (del 34,3% A2 hasta 6,1% E5). La presencia de los demás compuestos identificados en las muestras varía según el grado de maduración; estos datos han sido analizados estadísticamente como veremos a continuación.

Hay que señalar que, pese a la variabilidad en cuanto a la cuantificación de las muestras estudiadas, se observa una homogeneidad casi total entre las mismas desde un punto de vista cualitativo y respecto a la bibliográfica estudiada y recogida en las tablas 3 a 6.

#### **4.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.**

##### 4.5.1. Composición química.

Se han analizado las diferencias estadísticas según el grado de maduración en los dos componentes mayoritarios ( $\alpha$ -pineno y mirceno) y de los componentes minoritarios agrupados en sus respectivos grupos.

Se encontraron diferencias significativas en los grupos de mayor maduración para el mirceno, monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados y diterpenos oxigenados.

No hubo diferencias significativas para  $\alpha$ -pineno, sesquiterpenos, diterpenos e hidrocarburos alifáticos entre los diferentes grados de maduración.

#### 4.5.2 Estudio individualizado de cada compuesto o grupo de compuestos.

Análisis de los resultados de las diferentes pruebas realizadas en cada compuesto o grupo de compuestos.

#### $\alpha$ -pineno.

El resultado obtenido indica que los grados de maduración no influyen en la cantidad de  $\alpha$ -pineno. En la primera prueba realizada se obtuvo una tabla de ANOVA el valor-P = 0,8108, mayor de 0,05.

Siguiendo con el análisis, el resultado de la Prueba de Rangos Múltiples no da diferencias entre las medias de los factores. Por último, en la gráfica los intervalos LSD se ve que no hay diferencias entre las medias. Con todos estos resultados se puede asegurar que no hay diferencias significativas (figura 14).

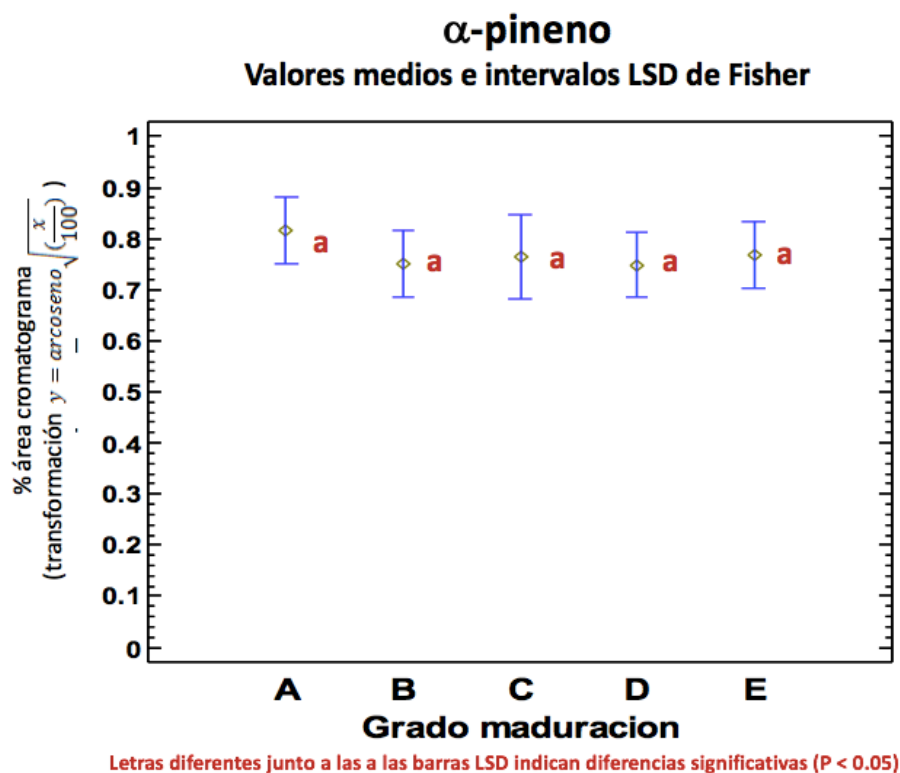


FIGURA 14. GRÁFICO DE MEDIAS DEL  $\alpha$ -PINENO FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

**Mirceno.**

Respecto a la proporción de mirceno según el grado de maduración, el análisis de la tabla del ANOVA, indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes grados de maduración, valor-P 0,0341.

Para saber qué grupos son los que tienen las diferencias significativas en sus medias se observa la prueba de rangos múltiples. En ella se determinó que había dos grupos homogéneos; las diferencias entre las medias estaban entre el grupo E respecto de A, B y C; esto se puede ver representado en el gráfico de medias que por los intervalos LSD se observan las diferencias que hay entre los grupos (figura 15).

Puede decirse entonces que los diferentes grados de maduración muestran dos grupos con diferencias significativas respecto a las medias del mirceno. De acuerdo con los estudios realizados por Angioni, *et al.* (2003) y Milos & Radonic (2000), los gálbulos más verdes contienen una mayor cantidad de este compuesto.

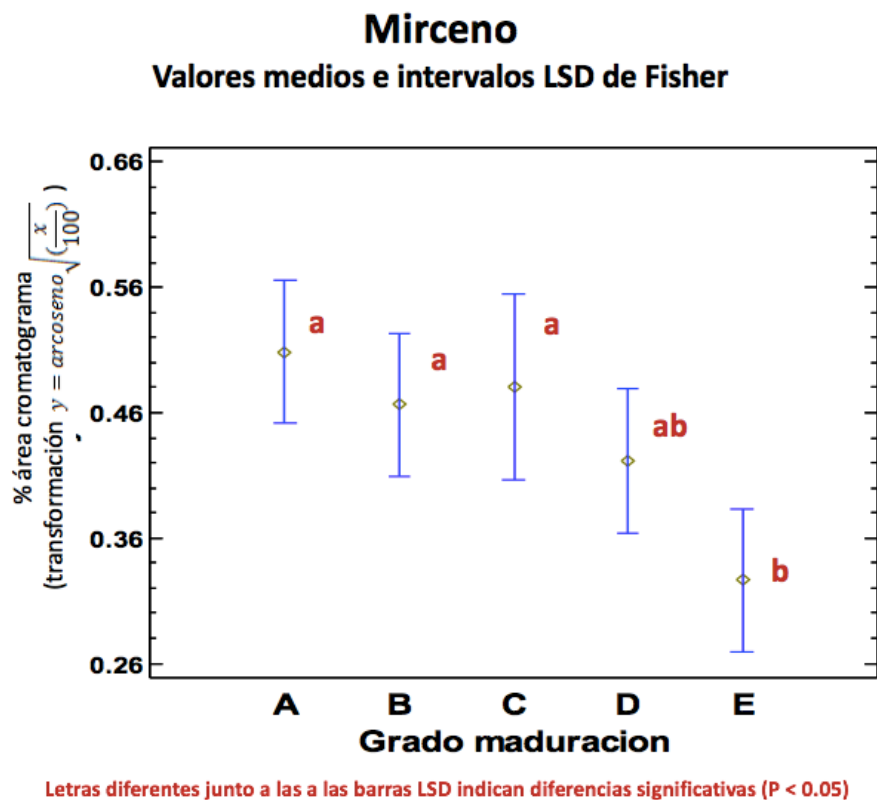


FIGURA 15. GRÁFICO DE MEDIAS DEL MIRCENO FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Monoterpenos.

La prueba de rangos múltiples nos indica que existen diferencias significativas entre la media del grupo A respecto con las de D y E, de modo que representan dos grupos homogéneos, esto se puede ver representado en el gráfico de medias con los intervalos LSD, en el cual se observa que hay diferencias entre los grupos ya citados antes (figura 16).

Se observa pues que los diferentes grados de maduración muestran diferencias significativas entre A (subgrupo con menor grado de maduración) comparado con los subgrupos D y E (mayor grado de maduración), al igual que los datos obtenidos por Angioni, *et al.* (2003) y Salido, *et al.* (2002). Siendo mayor el contenido de monoterpenos en este grupo de compuestos más verdes, es decir con menor grado de maduración.

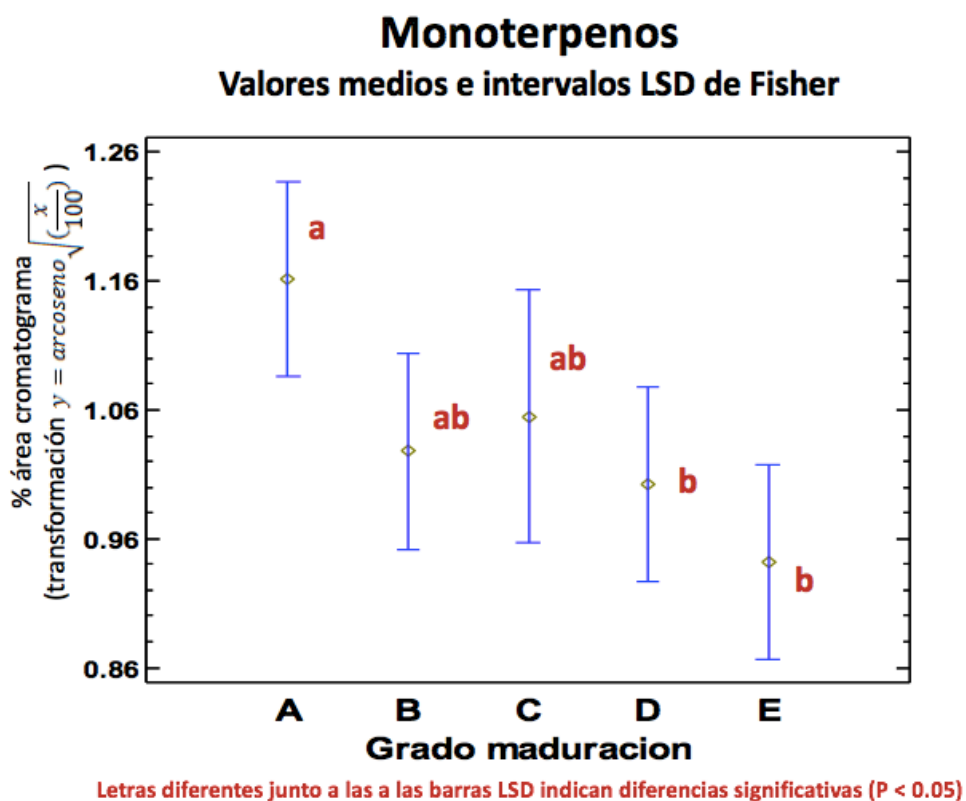
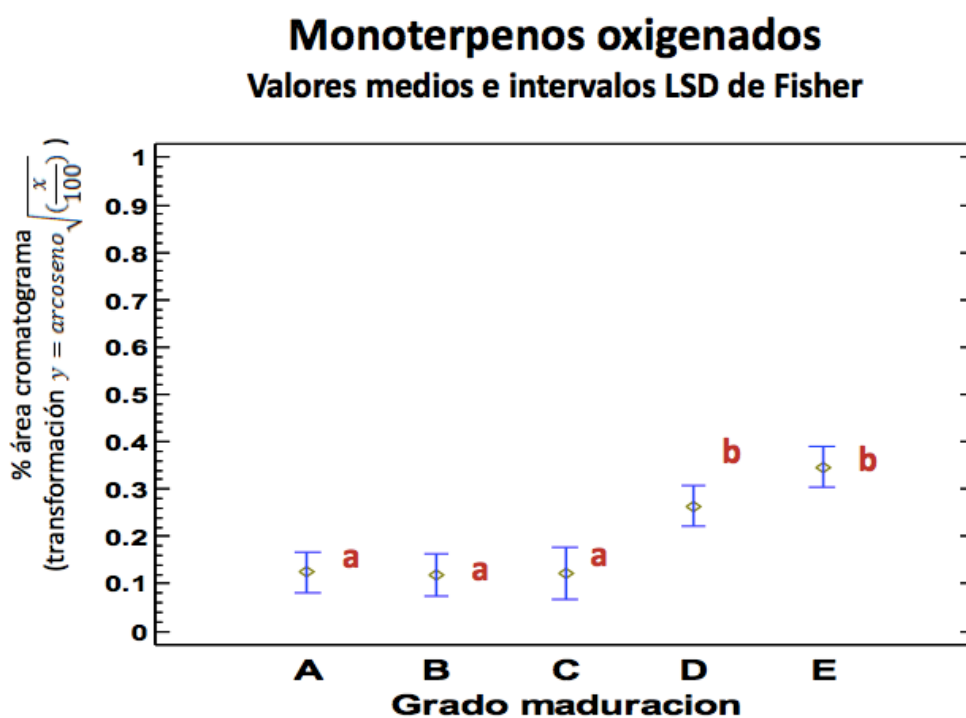


FIGURA 16. GRÁFICOS DE MEDIAS DE MONOTERPENOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Monoterpenos oxigenados.

El resultado del análisis de los monoterpenos oxigenados nos da un valor-P de 0,0001 lo que indica que hay diferencias significativas. Cuando se realizó la Prueba de Rangos Múltiples se apreciaron diferencias entre los grupos A, B y C respecto de D y E, formando dos grupos homogéneos, esto está representado en el gráfico de medias de los intervalos LSD (figura 17).

Puede decirse por tanto que la proporción de monoterpenos oxigenados crece a medida que avanza el proceso de maduración.

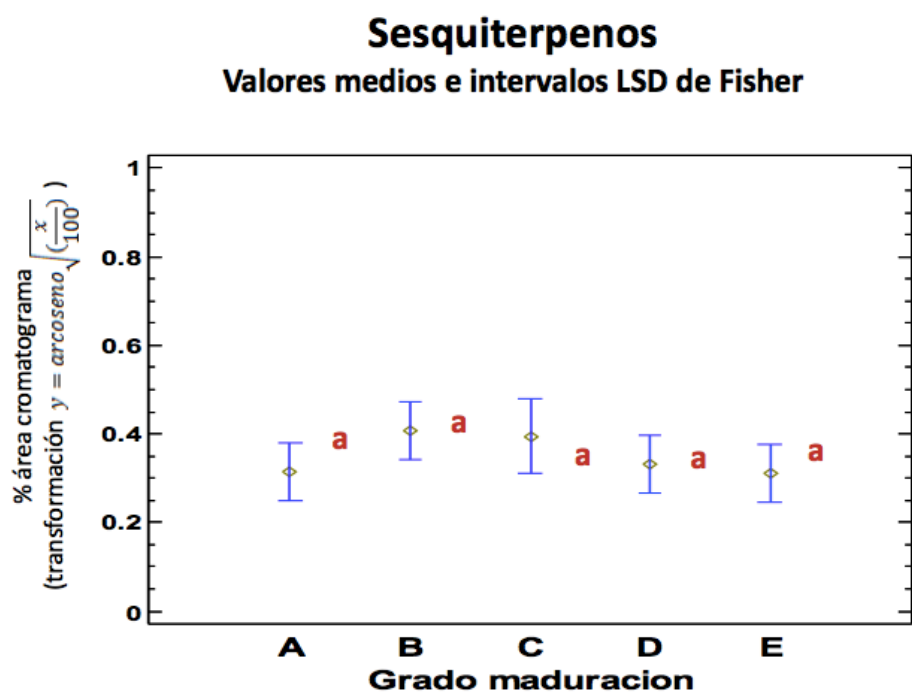


Letras diferentes junto a las a las barras LSD indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

FIGURA 17. GRÁFICO DE MEDIAS DE MONOTERPENOS OXIGENADOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Sesquiterpenos.

Para el análisis de los sesquiterpenos los resultados indicaron que no había diferencias significativas entre las medias de los diferentes grados de maduración. En los resultados de ANOVA el valor-P dio 0,4349. Cuando se realizaron las pruebas de Rangos Múltiples se confirmó la presencia de un grupo homogéneo en cuanto a sesquiterpenos y la comparación de medias con los intervalos LSD lo demuestra gráficamente (figura 18).



Letras diferentes junto a las a las barras LSD indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

FIGURA 18. GRÁFICO DE COMPARACIÓN DE SESQUITERPENOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.



### Sesquiterpenos oxigenados.

La Prueba de Rangos Múltiples nos muestra la existencia de dos grupos homogéneos ya que hay diferencias significativas entre las medias de A con D y E. En el gráfico de comparación por los intervalos LSD se observan los dos grupos teniendo B y C valores intermedios entre ambos (figura 19). Encontrando valores superiores en los 2 grados de mayor maduración.

Del mismo modo que en el caso de los monoterpenos oxigenados, la proporción de sesquiterpenos oxigenados va aumentando a medida que maduran los gálbulos. Es además interesante observar cómo, independientemente de la significación o no de las diferencias, existe un incremento claramente regular.

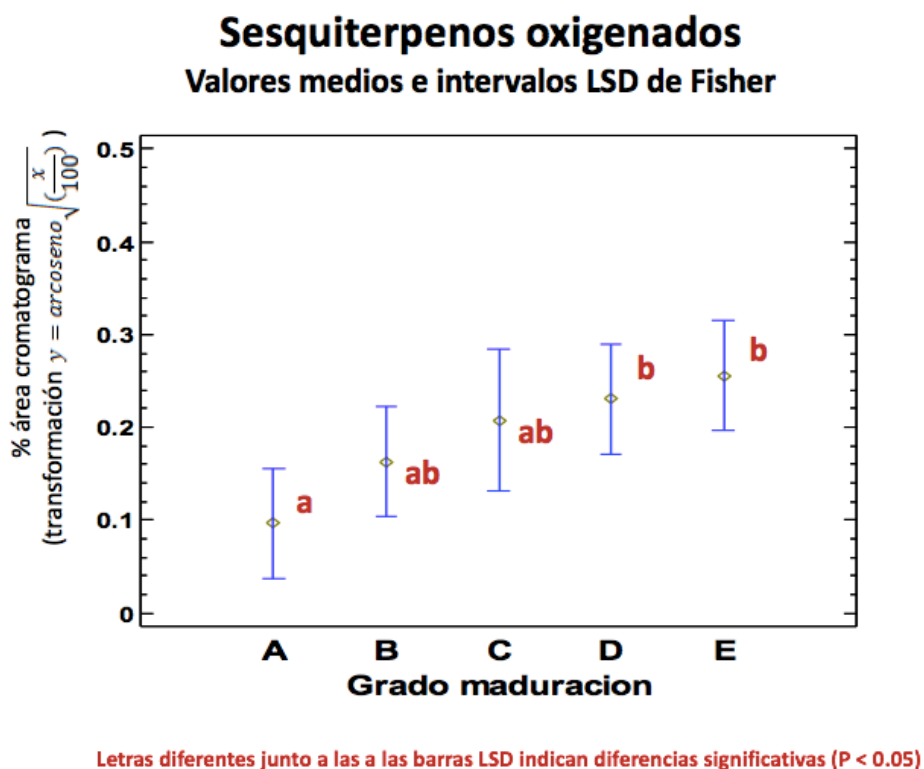


FIGURA 19. GRÁFICO DE MEDIAS DE SESQUITERPENOS OXIGENADOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Diterpenos.

En el caso de los diterpenos todas las pruebas realizadas dieron como resultado que no había diferencias significativas entre las medias. En primer lugar, la tabla del ANOVA dio un valor-P de 0,5784, lo que indica que las diferencias no son significativas. Cuando se compararon las medias con la Prueba de Rangos Múltiples se observó un grupo homogéneo en los resultados que mostraba que no había diferencias entre las medias. Esto se ve gráficamente en el LSD con la comparación de las medias gráficamente (figura 20).

Por lo tanto, se puede afirmar que las diferencias en los diterpenos no presentan diferencias significativas según el grado de maduración.

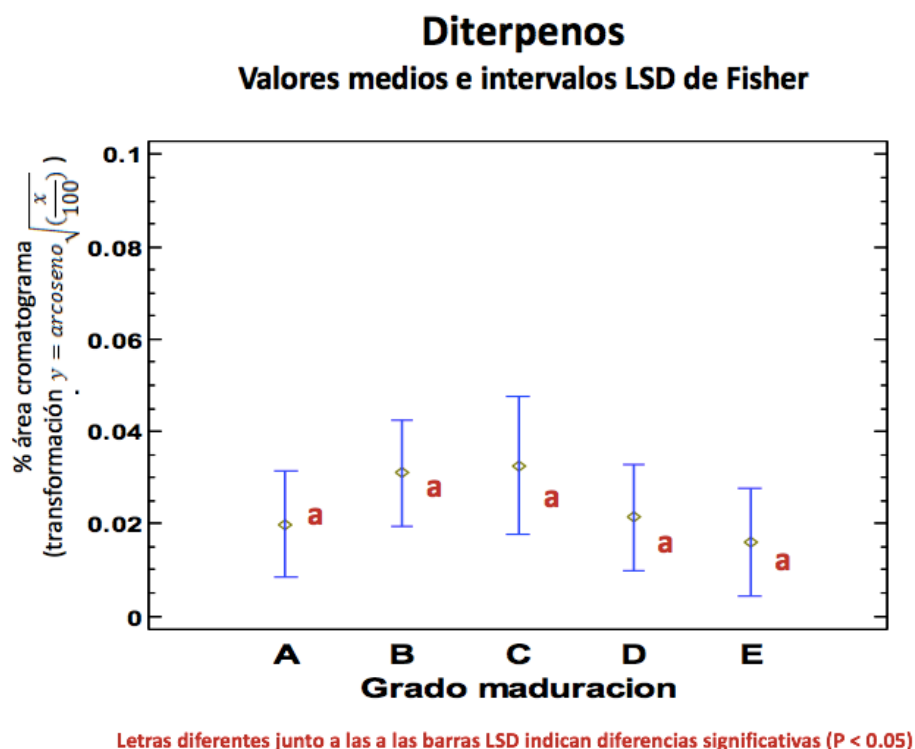
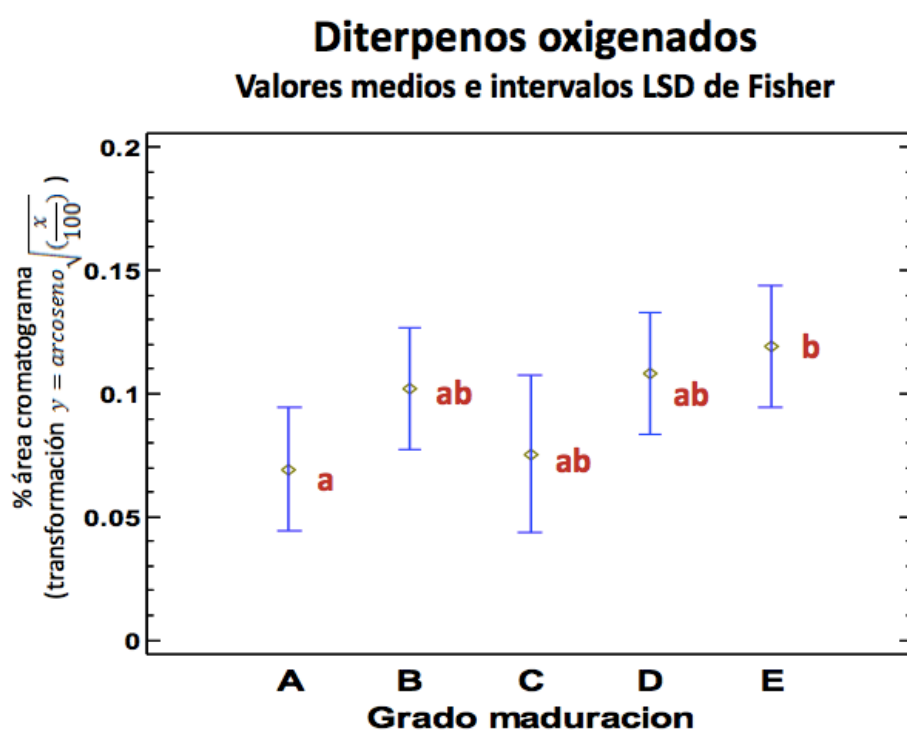


FIGURA 20. GRÁFICO DE MEDIAS DE DITERPENOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Diterpenos oxigenados.

El resultado obtenido para los diterpenos oxigenados, según en ANOVA, al aplicar la Prueba de Rangos Múltiples se determinó que entre los valores medios de A y E había diferencias formando dos grupos homogéneos, estos grupos se pueden observar en el gráfico LSD cuando se comparan las medias gráficamente (figura 21).

Tal como sucedía con monoterpenos y sesquiterpenos, también se observa en los diterpenos cómo la fracción oxigenada correspondiente se incrementa a medida que avanza la maduración.



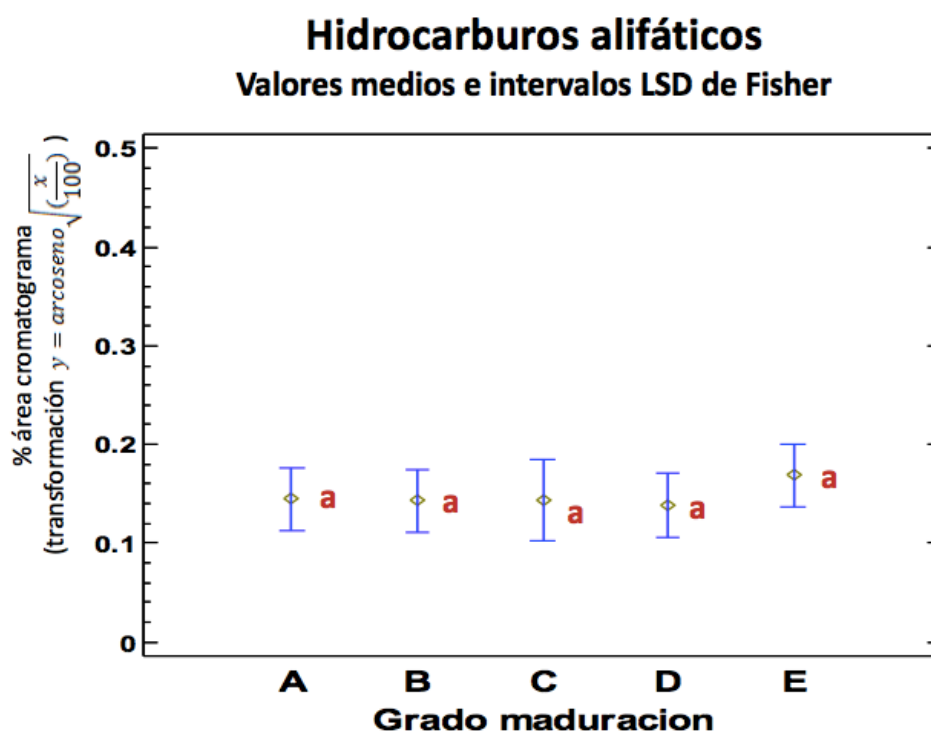
Letras diferentes junto a las barras LSD indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

FIGURA 21. GRÁFICO DE MEDIAS DE DITERPENOS OXIGENADOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

### Hidrocarburos alifáticos.

El último grupo de compuesto analizados estadísticamente fue es de los hidrocarburos alifáticos. Como resultados de la tabla ANOVA se obtuvo un valor-P de 0,8729; lo que indica que las diferencias entre las medias no son significativas. La comparación de cada una de las medias por las Pruebas de Rangos Múltiples dio un único grupo homogéneo. Esto se ve reflejado en el gráfico de comparación de medias con los intervalos LSD (Figura 22).

Con estos resultados, se puede afirmar que las diferencias de las medias de los diferentes grados de maduración no son significativas para el grupo de hidrocarburos alifáticos.



Letras diferentes junto a las a las barras LSD indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

FIGURA 22. GRÁFICO DE MEDIAS DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS FRENTE A LOS GRADOS DE MADURACIÓN.

## **CONCLUSIONES**

## 5. Conclusiones.

1. El método físico para la medida de color fue adecuado para clasificar de modo objetivo los grados de maduración, definiendo con mayor precisión sus diferencias, frente a la simple distinción entre verde y maduro, tal como se ha venido realizando en estudios anteriores. La metodología introducida, basada en la aplicación del Análisis Discriminante, podría utilizarse para la determinación del grado óptimo de maduración en función del perfil químico deseado para el aceite esencial, según el uso que se le vaya a dar.
2. El grado de humedad de las muestras es inversamente proporcional al grado de maduración.
3. Se obtienen diferencias significativas respecto a las medidas del rendimiento, siendo los valores más elevados los pertenecientes a los grupos intermedios (B y C). El escaso rendimiento en el nivel de maduración E muestra la inconveniencia de procesar este tipo de gábulos, dado que, además, muestran diferencias significativas en su composición en todos los tipos de compuestos.
4. En cuanto a los compuestos mayoritarios:  $\alpha$ -pineno y mirceno, este último muestra un descenso a lo largo del proceso de maduración, del mismo modo que los monoterpenos en general.
5. Asimismo, los sesquiterpenos y diterpenos no oxigenados, disminuyen también al avanzar la maduración. Paralelamente se observa un incremento en la proporción de compuestos oxigenados, que se observa tanto en la fracción monoterpénica, como en la sesquiterpénica y diterpénica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. Bibliografía.

- Adams, R. (1998). The leaf essential oils and chemataxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Pergamon*. *Biochemical Systematic and Ecology*. 26: 637-645
- Adams, R. P. (2014). *Junipers of the World. The genus Juniperus*. Victoria, Canada: Trafford Publishing. 4th ed
- Adams, R., Altarejos, J., Fernandez, C., & Camacho, A. (1998). The leaf essential oils and taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, and subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. *J. Essent. Oil Res.* 11:167-172
- Alonso Esteban, J. (2015). *El hinojo (Foeniculum vulgare Mill.) en las Ciencias Farmacéuticas. Trabajo Fin De Grado E*. Facultad De Farmacia. Universidad Complutense.
- Amensour, M., Bouhdid, S., Fernández-López, J., Idaomar, M., Skali Senhaji, N., Pérez-Alvarez, J.A., Abrini, J., (2010). Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria, *International Journal of Food Properties*, In press.
- Amensour, M., Sanchez Zapata, E., Martín- Sánchez, A., Abrini, J., Sendra, E., Sayas, E., Viuda Martos, M., Pérez Alvarez, J.A., Fernández López, J., (2010) Aplicación de un extracto de *Myrtus communis* como colorante en salchichas frankfurt: evolución del color durante su vida útil. *Publicaciones de la Universidad de Alicante*, 2010. ISBN 978-84-9717-144-1, pp. 363-366.
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Pérez Alvarez, J.A., Fernández-López, J., (2009) Total phenolic content and antioxidant activity of Myrtle (*Myrtus communis*) extracts, *Natural Product Communications* 4, 819-824.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2003). Chemical Composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3073-3078
- Arbolapp (CSIC/FECYT) (2014). Arbolapp. Retrieved from <http://www.arbolapp.es/especies/ficha/Juniperus-communis/>
- Arbolapp (CSIC/FECYT) (2014) Arbolapp. Retrieved from <http://www.arbolapp.es/especies/ficha/Juniperus-oxycedrus/>
- Ayala Marmolejo, X., & Murillo Aspiazú, H. (2015). Procesamiento, caracterización y extracción del aceite esencial de cardamomo (*Elettaria cardamomun*) enfocado en la industria. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle.redug/18916>



- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Brice Boti, J., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Salgeiro, L., & Casanova, J. (2006). Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* spp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC-MS and C-NMR. *Flavour and Fragrance journal*. 21. 268-273
- Cabello Navas, M., & Belloso Morales, G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. *Revista UDO Agrícola* 9 (3): 705-710.
- Chiralt Boix, A., Martínez Navarrete, N., González Martínez, C., Talens Oliag, P., & Moraga Ballesteros, G. (2007). *Propiedades físicas de los alimentos*. Universitat Politècnica de València. Valencia.
- Costa Talens, M. (1983). Pisos bioclimáticos y series de vegetación en el área valenciana.
- Costa, M., Aguilera, A., Soriano, P., Guemes, J., Mulet, L., Riera, J., & Fabregat, C. (2005). *Vegetación y flora de la Sierra de Espadán*. Valencia: Fundación Bancaja.
- De, M., De, A., Mukhopadhyay, R., Miro, M., & Anerjee, A. (2001). *Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f.* Retrieved from Universidad de Granada: <http://hdl.handle.net/10481/28252>
- Derwich, E., & Chabir, R. (2011). Identification of the volatile constituents of the essential oil of *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) from the north centre region of Morocco. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 4(suppl 1):50-54
- El Anhar, A. (2016) Variación estacional del aceite esencial obtenido de diferentes quimiotipos de *Mentha longifolia* L., Trabajo Final de Grado, Universidad Politècnica de València, Valencia.
- Estellés, P. M., & Mollar, D. A. J. C. (2012) Estudio comparativo de las poblaciones de *Cheilanthes hispanica* Mett. y *Cheilanthes tinaii* Tod. en el PN de la Serra d'Espadà (Castellón), TFG, Universitat Politècnica de València (Gandia). *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Asignatura: Diversidad Vegetal*. (2013). Retrieved Jun 15, 2017, from Universidad Nacional del Nordeste: [http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/2-Gimnospermas\\_2013.pdf](http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/2-Gimnospermas_2013.pdf)
- Fonseca, Rosa María (2006) *Juniperus*, la ginebra, el incienso, los lápices y los repelentes. *Ciencias*(81), 44-47.
- Güemes, J., & Roselló, J. (2004). *Ministerio de Agricultura y Pesca. Alimentación y Medio Ambiente*. Retrieved from Gobierno de España: [http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/568\\_tcm7-149443.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/568_tcm7-149443.pdf)

- Hajdari, A., Mustafa, B., Gashi, V., Nebija, D., Ibraliu, A., & Novak, J. (2014). Chemical composition of the essential oils of ripe berries of *Juniperus oxycedrus* L., growing wild in Kosovo. *Biochemical Systematic and Ecology*. 57:90-94
- Llorens Molina, J. (2011). *Ruinet Upv*. Retrieved from UPV: <http://hdl.handle.net/10251/13314>
- Medeiros-Leite, A., de Oliveira-Lima, E., Leite de Souza, E., de Fátima Formiga Melo Diniz, M., Nogueira Trajano, V., & Almeida de Medeiros, I. (2007). Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 43:121-125
- Medini, H., Elaissi, A., Khouja, M., Chraief, I., Farhat, F., Hammami, M., Harzallah-Skhiri, F. (2010). Leaf essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae) harvested in Northern Tunisia: Composition and intra-specific variability. *Chemistry and Biodiversity*. 7:1254-1266
- Milos, M., & Radonic, A. (2000). Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food Chemistry*. 68: 333-338
- Nollet, L. M., & Dekker, M. (1996). *Analysis Handbook of Food*. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1996, Chap. 15
- Salido, S., Altarejos, J., Noguerras, M., Sanchez, A., Pannecouque, C., Witvrouw, M., & De Clerq, E. (2002). Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* spp. *badia. Journal of Ethnopharmacology*. 81:129-134

## **ANEXOS**

## 7. Anexos.

### ANEXO 1. PROCESO DE SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.

<sup>a</sup>: Espadán.

<sup>b</sup>: Liria.

<sup>c</sup>: Segart.

<sup>d</sup>: 1ª recolección Segart nov-16

<sup>e</sup>: 2ª recolección Segart ene-17

RL	Sample	VALORES MEDIOS			DESVIACIONES ABSOLUTAS			DESVIACIONES RELATIVAS			Suma desviaciones relativas	Seleccionadas
		dL	dA	dB	D(dL)	D(dA)	D(dB)	dL	dA	dB		
A	ES <sup>a</sup> 1	-39,31	-5,53	23,83	-1,06	-0,09	-0,08	0,028	0,017	0,004	0,048	A1
A	ES2	-37,30	-4,45	26,34	0,95	0,99	2,43	0,025	0,182	0,101	0,308	A2
A	ES3	-38,17	-4,56	27,48	0,08	0,88	3,57	0,002	0,161	0,149	0,312	
A	L <sup>b</sup> 2	-40,11	-5,43	21,93	-1,86	0,01	-1,98	0,049	0,001	0,083	0,133	A3
A	SE <sup>c</sup> 1a <sup>d</sup>	-33,40	-6,28	29,94	4,85	-0,84	6,03	0,127	0,155	0,252	0,534	
A	SE4a	-42,99	-5,28	21,12	-4,74	0,16	-2,79	0,124	0,029	0,117	0,270	A4
A	SE2b <sup>e</sup>	-43,09	-4,87	19,29	-4,84	0,57	-4,62	0,127	0,104	0,193	0,424	
A	SE3b	-36,58	-5,92	21,17	1,67	-0,48	-2,74	0,044	0,089	0,115	0,247	A5
A	SE4b	-31,36	-7,61	25,39	6,89	-2,17	1,48	0,180	0,400	0,062	0,642	
A	SE1b	-40,16	-4,44	22,65	-1,91	1,00	-1,26	0,050	0,183	0,053	0,286	
	media	-38,25	-5,44	23,91								
B	SE1b	-40,16	-4,44	22,65	0,40	-3,00	-0,74	0,010	2,086	0,032	2,127	
B	SE4a	-44,46	-1,76	20,44	-3,90	-0,32	-2,95	0,096	0,223	0,126	0,445	B1
B	SE3a	-43,94	-1,41	20,68	-3,38	0,03	-2,71	0,083	0,020	0,116	0,219	B2
B	SE2a	-40,17	-1,99	25,41	0,39	-0,55	2,02	0,010	0,383	0,086	0,479	B3

<b>B</b>	SE1a	-41,34	-3,49	25,10		-0,78	-2,05	1,71	0,019	1,425	0,073	1,518	
<b>B</b>	L3	-35,66	1,10	25,97		4,90	2,54	2,58	0,121	1,764	0,110	1,996	
<b>B</b>	ES3	-42,02	-1,15	23,89		-1,46	0,29	0,50	0,036	0,201	0,021	0,258	B4
<b>B</b>	ES2	-39,51	0,45	23,88		1,05	1,89	0,49	0,026	1,313	0,021	1,360	
<b>B</b>	ES1	-37,82	-0,26	22,48		2,74	1,18	-0,91	0,068	0,819	0,039	0,926	B5
	media	-40,56	-1,44	23,39									
<b>C</b>	L2	-44,49	4,53	19,61									
<b>C</b>	SE4a	-42,33	5,89	21,17									
<b>C</b>	SE4b	-38,08	1,60	18,59									
	media	-41,63	4,01	19,79									
<b>D</b>	SE4b	-43,04	10,99	13,09		1,61	2,81	-1,97	0,036	0,344	0,131	0,511	D1
<b>D</b>	SE3b	-45,84	4,23	8,28		-1,18	-3,95	-6,78	0,026	0,483	0,450	0,959	
<b>D</b>	SE2b	-48,24	7,76	15,10		-3,58	-0,42	0,04	0,080	0,051	0,003	0,134	D2
<b>D</b>	SE1b	-45,23	8,97	16,75		-0,57	0,79	1,69	0,013	0,097	0,112	0,222	D3
<b>D</b>	SE3a	-48,15	3,57	11,39		-3,49	-4,61	-3,67	0,078	0,564	0,244	0,885	
<b>D</b>	L3	-35,86	6,87	12,75		8,80	-1,31	-2,31	0,197	0,160	0,153	0,510	D4
<b>D</b>	L2	-46,60	9,28	16,40		-1,94	1,10	1,34	0,043	0,135	0,089	0,267	D5
<b>D</b>	L1	-45,81	12,26	18,01		-1,15	4,08	2,95	0,026	0,499	0,196	0,721	
<b>D</b>	ES3	-43,15	9,68	23,77		1,51	1,50	8,71	0,034	0,184	0,578	0,796	
	media	-44,66	8,18	15,06									
<b>E</b>	SE2b	-49,97	2,94	11,26		-0,64	0,16	0,53	0,013	0,057	0,050	0,120	E1
<b>E</b>	SE3b	-47,06	3,04	7,53		2,27	0,26	-3,20	0,046	0,093	0,298	0,437	E2
<b>E</b>	SE4b	-47,29	4,81	9,56		2,04	2,03	-1,17	0,041	0,730	0,109	0,881	
<b>E</b>	SE1b	-49,90	2,52	10,83		-0,57	-0,26	0,10	0,012	0,094	0,010	0,115	E3
<b>E</b>	SE3a	-52,12	-0,04	11,11		-2,79	-2,82	0,38	0,057	1,014	0,036	1,107	
<b>E</b>	SE2a	-49,83	2,51	10,15		-0,50	-0,27	-0,58	0,010	0,097	0,054	0,161	E4
<b>E</b>	L3	-48,97	2,23	11,51		0,36	-0,55	0,78	0,007	0,198	0,073	0,278	E5

E	L2	-49,04	4,63	12,38		0,29	1,85	1,65	0,006	0,665	0,154	0,825	
E	L1	-49,70	5,00	11,53		-0,37	2,22	0,80	0,008	0,798	0,075	0,880	
E	ES3	-49,41	0,17	11,42		-0,08	-2,61	0,69	0,002	0,939	0,065	1,005	
	media	-49,33	2,78	10,73									

## ANEXO 2. DESARROLLO DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE EN EL ESTUDIO DE COLOR REALIZADO CON STATGRAPHICS CENTURION XVI.

### Análisis Discriminante

Variable de clasificación: RL

Variables independientes:

dL  
dA  
dB

Número de casos completos: 23

Número de grupos: 5

Función	Eigenvalor	Porcentaje	Correlación
Discriminante		Relativo	Canónica
1	36.486	90.75	0.98657
2	3.64309	9.06	0.88579
3	0.0762493	0.19	0.26617

Funciones	Lambda			
Derivadas	de Wilks	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	0.00533839	94.1909	12	0.0000
2	0.200115	28.9595	6	0.0001
3	0.929153	1.3227	2	0.5162

### El StatAdvisor

Este procedimiento está diseñado para desarrollar un conjunto de funciones discriminantes el cual puede ayudar a predecir RL con base en los valores de otras variables cuantitativas. 23 casos fueron utilizados para desarrollar un modelo que discrimine entre los 5 niveles de RL. 3 variables predictoras fueron introducidas. Las 2 funciones discriminantes con valores-P menores que 0.05 son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95.0%. Para graficar las funciones dicriminantes, seleccione Funciones Discriminantes de la lista de Opciones Gráficas. Para predecir nuevas observaciones, seleccione Tabla de Clasificación de la lista de Opciones Tabulares.

### Coefficientes de la Función de Clasificación para RL

	A	B	C	D	E
dL	-4.62077	-4.58421	-4.21516	-4.15618	-5.17366
dA	-10.2645	-7.18243	-2.6049	1.67392	-2.19118
dB	6.373	5.66282	4.20843	2.24161	1.79255
CONSTANTE	-193.767	-165.801	-125.779	-116.569	-134.178

### El StatAdvisor

Esta ventana muestra las funciones usadas para clasificar observaciones. Hay una función para cada uno de los 5 niveles de RL. Por ejemplo, la función usada para el primer nivel de RL es

$$-193.767 - 4.62077*dL - 10.2645*dA + 6.373*dB$$

**Coefficientes de la Función Discriminante para RL**

	1	2	3
dL	0.0250622	0.656078	0.808955
dA	0.982291	0.471193	-0.0671036
dB	-0.703112	0.660139	-0.438948

**Coefficientes Sin Estandarizar**

	1	2	3
dL	0.00807719	0.211445	0.260715
dA	0.798758	0.383155	-0.0545658
dB	-0.338411	0.317728	-0.211268
CONSTANTE	5.03758	2.73998	15.1854

**El StatAdvisor**

Esta ventana muestra los coeficientes de las funciones usadas para discriminar entre los distintos niveles de RL. De particular interés son los coeficientes estandarizados. La primer función discriminante estandarizada es

$$0.0250622*dL + 0.982291*dA - 0.703112*dB$$

De la magnitud relativa de los coeficientes en la ecuación de arriba, se puede determinar como se están utilizando las variables independientes para discriminar entre los grupos.

**Tabla de Clasificación**

Actual	Tamaño de Grupo	Predicho		RL		
RL		A	B	C	D	E
A	5	5	0	0	0	0
		(100.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)
B	5	0	5	0	0	0
		( 0.00%)	(100.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)
C	3	0	0	3	0	0
		( 0.00%)	( 0.00%)	(100.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)
D	5	0	0	0	5	0
		( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	(100.00%)	( 0.00%)
E	5	0	0	0	0	5
		( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	( 0.00%)	(100.00%)

Porcentaje de casos correctamente clasificados: **100.00%**

	Probabilidad
Grupo	Previa
1	0.2000
2	0.2000
3	0.2000
4	0.2000
5	0.2000

	Grupo	Grupo	Valor	Distancia		2° Grupo	2° Valor	Distancia	
Fila	Actual	Más Alto	Más Alto	Cuadrada	Prob.	Más Alto	Más Alto	Cuadrada	Prob.
1	A	A	196.507	0.200515	0.9994	B	189.068	15.0787	0.0006
2	A	A	204.544	4.94859	0.9991	B	197.544	18.9484	0.0009
3	A	A	187.069	0.413136	0.9970	B	181.258	12.0347	0.0030
4	A	A	193.675	2.59031	0.9924	B	188.796	12.3474	0.0076
5	A	A	170.943	1.50362	0.9987	B	164.291	14.8082	0.0013
6	B	B	166.402	2.24927	0.9983	A	160.002	15.0487	0.0017
7	B	B	162.863	1.58323	0.9993	A	155.536	16.2373	0.0007
8	B	B	176.532	3.15572	0.9104	A	174.214	7.79191	0.0896
9	B	B	136.741	3.17732	0.9995	C	128.921	18.8177	0.0004
10	B	B	170.372	0.40514	0.9973	A	164.453	12.243	0.0027
11	C	C	132.481	0.960722	1.0000	E	121.224	23.4738	0.0000
12	C	C	126.398	2.4218	0.9999	D	116.676	21.8656	0.0001
13	C	C	108.801	4.23696	0.9981	B	102.546	16.7482	0.0019
14	D	D	72.5521	7.46609	1.0000	C	61.1385	30.2932	0.0000
15	D	D	110.052	5.97926	1.0000	E	87.8799	50.3237	0.0000
16	D	D	130.763	3.77461	0.9950	E	125.463	14.374	0.0050



17	D	D	123.977	1.03664	1.0000	C	111.998	24.9949	0.0000
18	D	D	129.405	1.22985	1.0000	E	115.978	28.0841	0.0000
19	E	E	116.131	2.37079	1.0000	D	100.989	32.6555	0.0000
20	E	E	138.092	0.777406	1.0000	C	124.581	27.799	0.0000
21	E	E	136.32	1.07358	1.0000	C	120.44	32.8342	0.0000
22	E	E	131.585	1.16557	0.9998	D	122.752	18.8325	0.0001
23	E	E	132.665	1.27985	0.9998	D	124.209	18.1931	0.0002

\* = incorrectamente clasificado.

#### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los resultados de utilizar las funciones discriminantes derivadas para clasificar observaciones. Se enlistan las dos calificaciones más altas entre las funciones de clasificación para cada una de las 23 observaciones empleadas para ajustar el modelo, así como para cualquier nueva observación. Por ejemplo, la fila 1 tuvo la calificación más alta para RL = A y la segunda más alta para RL = B. De hecho, el valor verdadero de RL era A. Entre las 23 observaciones empleadas para ajustar el modelo, 23, ó el 100.0% fueron clasificadas correctamente. Puede predecir observaciones adicionales agregando nuevas filas al archivo de datos actual, llenar los valores para las variables independientes, pero dejando la celda para RL en blanco.

#### El StatAdvisor

Esta ventana muestra los valores promedio de cada una de las 3 funciones discriminantes para cada uno de los 5 valores de RL. Los centroides están incluidos en la Gráfica de Funciones Discriminantes disponible de la lista de Opciones Gráficas.

#### Resumen Estadístico por Grupo

RL	A	B	C	D	E	TOTAL
RECUENTO	5	5	3	5	5	23
MEDIAS						
dL	-39.432	-41.682	-41.6333	-43.794	-49.12	-43.2626
dA	-5.344	-1.314	4.00667	8.774	3.624	1.77043
dB	23.106	22.58	19.79	14.818	10.57	18.0322
DESVIACIONES ESTD.						
dL	2.39063	2.7446	3.26129	4.82751	1.20551	4.47252
dA	0.498126	0.671364	2.19236	1.56991	1.11303	5.24533
dB	2.68008	2.11687	1.29938	1.84238	1.87695	5.43214

#### El StatAdvisor

Esta ventana muestra los promedios y desviaciones estándar de cada variable independiente para cada nivel de RL.

#### Estadísticas agrupadas Dentro-de-Grupo para RL

Matriz de Covarianza Dentro-de-Grupo

	dL	dA	dB
dL	9.62757	-1.05179	-0.900893
dA	-1.05179	1.51234	0.834681
dB	-0.900893	0.834681	4.31678

Matriz de Correlación Dentro-de-Grupo

	dL	dA	dB
dL	1.0	-0.275642	-0.139745
dA	-0.275642	1.0	0.326675
dB	-0.139745	0.326675	1.0

#### El StatAdvisor

Esta ventana muestra las correlaciones estimadas entre las variables independientes dentro de cada grupo. Se conjuntado la información dentro de grupo de todos los grupos.

**ANEXO 3. TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.**<sup>a</sup>: Tanto por cien con respecto al área total de los picos del cromatograma obtenido mediante GC/MS<sup>b</sup>: Compuestos en orden de elución en la columna cromatográfica ZB-5<sup>c</sup>: Índice de retención de Kovats experimental.<sup>d</sup>: Trazas (<0,1)<sup>e</sup>: No detectado

COMPUESTO <sup>B</sup>	RI <sub>(Kovats)</sub> <sup>c</sup>	MUESTRAS																						
		A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	D1	D2	D3	D4	D5	E1	E2	E3	E4	E5
TRICICLENO	925	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2
$\alpha$ -TUYENO	929	0,1	0,1	0,1	t <sup>d</sup>	0,1	0,1	0,1	t	t	- <sup>e</sup>	t	0,1	t	t	0,1	t	-	-	-	-	t	-	t
$\alpha$ -PINENO	937	67,7	49,5	54,6	51,6	42,5	65,0	41,9	40,3	46,6	39,1	42,1	50,7	50,6	42,1	60,4	46,8	30,1	52,7	38,6	50,4	51,7	41,0	59,5
CANFENO	953	1,0	0,6	1,1	1,0	0,7	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	1,0	0,8	0,3	0,3	0,6	0,5	1,2	1,0	0,7	1,1
SABINENO	975	0,5	0,7	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	-	0,1
$\beta$ -PINENO	979	1,8	1,1	2,5	2,1	1,6	1,5	1,0	1,5	1,9	1,9	2,1	1,7	1,4	2,1	2,5	1,0	1,0	2,1	1,9	2,1	1,6	1,2	1,7
MIRCENO	996	15,5	34,3	23,2	24,6	22,2	14,6	29,7	17,4	17,4	23,3	27,7	20,6	16,4	15,4	11,0	24,9	9,2	26,2	21,7	8,7	9,8	7,5	6,1
$\alpha$ -FELANDRENO	1008	t	-	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	0,1	t	0,2	t	-	-	0,1	t	0,2	0,1	0,1	0,2
$\alpha$ -TERPINENO	1019	t	t	0,1	t	0,1	t	t	t	-	0,1	0,1	0,1	t	0,1	t	t	-	0,1	t	-	-	-	-
$\rho$ -CIMENO	1027	t	-	-	t	-	-	-	t	0,1	t	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,5	0,4	0,5
LIMONENO	1032	2,3	2,9	2,6	2,8	2,6	1,9	2,5	2,1	2,5	3,0	3,1	2,7	2,2	3,0	2,7	2,4	1,5	3,3	3,3	2,4	2,5	2,0	2,1
(E)- $\beta$ -OCIMENO	1052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -TERPINENO	1061	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	-	-
(Z)- HIDRATO DE SABINENO	1072	t	0,1	0,1	t	0,1	t	t	0,1	t	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	-
$\alpha$ -TERPINENO	1086	0,8	0,7	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,6	0,7	0,9	0,7	1,0	0,7	0,7	0,6	0,4	0,5	0,7	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1
(E)-HIDRATO DE SABINENO	1090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,1	-	-	-	0,1	0,4	0,3	0,2	0,3
PERILENO	1098	t	t	t	t	0,1	-	-	t	-	0,1	-	-	t	-	-	-	-	-	0,1	t	-	-	t
(Z)- TUYONA	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,1	-	-	-
1,3,8- <i>p</i> -MENTATRIENO	1106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
(E)- TUYONA	1117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	t	-	-	t	-	-	-	-	-
$\alpha$ -CAMFOLENAL	1127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	t	1,4	0,8	0,1	0,2	0,1	0,3	2,0	1,2	1,2	1,9
ALCANFOR	1148	0,4	0,1	0,5	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,6	0,3	0,2	0,2	0,1	4,6	2,6	0,7	1,0	1,0	6,4	2,8	2,9	3,4	
(Z)- $\beta$ -TERPINEOL	1152	0,1	-	t	t	t	t	-	t	0,1	t	-	t	-	0,8	0,1	-	-	t	0,1	1,0	0,5	0,5	0,5
(Z)-PINOCAMFONA	1154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	0,1	0,2	t	0,1	-	-	0,4	0,9	0,6	0,6	0,7
PINOCARVONA	1160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	1,3	0,5	0,6	0,6	-	-	-	-	-
PINOCANFONA	1171	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,5	1,6	0,3	0,4	0,3	0,6	2,9	1,3	1,7	1,7
BORNEOL	1173	-	-	t	t	-	-	-	-	-	-	0,1	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TERPINEN-4-OL	1181	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,6	0,3	0,2	0,2	0,3	0,7	0,3	0,4	0,4
<i>p</i> -8-CIMENOL	1187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,1	t	t	t	0,1	-	-	-	-
$\alpha$ -TERPINEOL	1194	0,1	-	t	t	0,1	-	t	t	0,1	t	0,2	t	0,1	2,0	0,5	0,2	0,4	t	1,2	2,1	1,2	1,6	1,3
$\gamma$ -TERPINEOL	1199	t	t	-	0,1	t	0,1	-	-	0,1	t	0,2	t	-	2,0	0,4	t	0,2	t	0,4	2,1	0,7	1,0	0,8
ISOFORONA -4-METILENO	1217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	1,0	0,3	0,4	0,4
CARVONA	1243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	t
CARVACROL	1298	0,9	1,1	0,7	0,7	0,3	1,9	0,6	0,4	0,6	0,3	0,5	0,7	0,8	0,4	0,8	0,5	1,8	0,4	0,4	0,6	1,0	1,0	1,5
$\alpha$ -CUBENENO	1344	0,4	0,4	0,2	2,5	0,9	0,7	1,9	3,2	2,6	1,2	0,7	1,0	1,2	0,4	1,2	0,6	2,9	0,5	1,7	0,3	1,9	2,3	1,6
$\alpha$ -COPAENO	1373	0,1	0,1	t	0,5	0,2	0,2	0,4	0,7	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,7	0,1	0,6	0,1	0,6	0,8	0,6
$\beta$ -ELEMENO	1383	-	-	-	t	t	0,1	0,1	0,1	0,1	t	t	t	-	-	-	t	-	-	0,2	-	-	-	-
$\beta$ -CARIOFILENO	1415	0,3	0,2	0,3	0,4	0,7	0,6	0,6	0,8	0,5	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,4	0,9	1,5	0,4	1,3	0,2	0,4	0,7	0,2
$\beta$ -COPAENO	1424	-	-	-	-	t	0,1	-	t	-	t	t	t	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ ( <i>E</i> )-BERGAMOTENO	1430	-	-	-	0,1	0,1	t	0,1	0,2	-	0,1	0,1	t	-	-	-	0,1	0,1	t	0,1	-	0,1	0,1	-
AROMADENDRENO <ALLO>	1438	-	-	-	-	t	-	-	t	-	-	-	-	-	0,5	0,3	0,7	1,0	0,3	-	-	-	-	-
( <i>Z</i> )-MUUROLA-3,5-DIENO	1450	0,3	0,2	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,8	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -HUMULENO	1451	0,1	0,1	t	0,6	1,1	0,4	0,5	2,0	0,8	1,9	1,4	1,1	1,2	0,3	0,1	0,7	1,5	0,3	1,9	0,3	0,9	1,5	0,3
SESQUISABINENO	1463	0,1	t	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-	0,2	0,3	0,1	-	-	0,3	-	t	0,1	0,2	0,4	0,1
$\gamma$ -GURGUJENO	1472	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,8	9,5	15,5	7,0	14,5	10,6	9,2	8,5	-	0,2	-	0,6	-	1,7	0,4	0,5	0,8	0,3
( <i>E</i> )-CADINA-1(6),4-DIENO	1477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	-	-	-	-
GERMACENO-D	1485	4,2	3,2	5,7	5,6	14,4	0,2	0,1	-	-	t	0,1	0,1	0,2	4,9	2,8	8,2	8,6	3,5	0,3	0,8	1,1	1,8	0,2
$\gamma$ -AMORFENO	1494	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,8	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	0,1	0,9	0,2	0,4	0,7	0,3
$\alpha$ -MUUROLENO	1500	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1	0,2	0,2	-	-	-
$\gamma$ -CADINENO	1508	0,2	0,1	0,2	0,6	1,0	0,7	0,4	1,4	0,9	1,4	1,2	0,7	0,9	1,1	-	0,7	2,1	0,4	1,3	0,9	1,8	3,0	1,6
$\delta$ -CADINENO	1514	0,1	0,2	0,3	0,2	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5	0,3	0,7	1,1	0,3	2,1	0,5	0,4	0,7	0,2
( <i>E</i> )-CADINA-1,4-DIENO	1527	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	0,1	-	-	-	-
$\alpha$ -CADINENO	1531	-	-	-	t	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	t	-	t	-	t	-	-	0,1	-	-	0,2	-
$\alpha$ -CALACORENE CALACORENO	1541	-	-	-	-	t	-	-	t	-	t	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
( <i>E</i> )-NERONIDOL	1569	0,1	0,3	0,2	1,2	3,8	0,1	1,6	2,1	5,2	4,2	0,4	3,4	7,5	1,5	1,1	1,8	5,9	0,9	0,3	1,7	5,4	7,6	1,5
OXIDO DE CARIOFILENO	1581	-	-	-	t	t	-	0,1	t	0,1	0,1	0,1	t	0,1	0,8	0,2	0,7	1,3	0,3	1,1	1,0	0,8	1,4	0,4
HEXADECANO	1600	1,9	2,3	1,5	1,4	0,8	4,2	1,4	1,0	1,5	0,6	1,2	1,5	2,0	0,1	1,9	1,3	4,2	1,0	1,1	1,8	2,5	3,0	3,4
EPOXIDO DE HUMULENO (II)	1608	-	-	-	t	0,1	-	t	-	0,1	0,1	0,2	t	0,1	0,8	0,2	0,4	1,7	0,2	0,7	0,9	0,7	1,3	0,3
CUBENOL-1-EPI	1629	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	0,1	0,4	t	t	-	-	0,2	-
CADINOL-EPI- $\alpha$	1638	t	t	0,1	0,1	0,2	t	0,1	0,3	0,3	0,2	0,5	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	1,8	0,1	0,1	0,2	0,3	0,6	0,1
MUROLOL EPI- $\alpha$	1641	-	-	-	-	t	-	t	0,1	0,1	0,1	0,1	t	t	0,3	0,1	0,2	0,9	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1
SELIN-11-EN-4- $\alpha$ -OL	1649	t	0,1	0,1	t	0,2	-	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,8	0,1	0,7	3,5	0,4	0,9	0,4	0,6	1,1	0,3
BISABOLOL-EPI- $\beta$	1676	-	-	-	-	t	-	-	-	-	t	t	t	0,1	t	-	0,3	0,1	t	0,3	t	-	-	-
BISABOLOL-EPI- $\alpha$	1682	-	-	-	-	t	-	-	-	0,1	0,1	0,1	t	t	0,5	0,1	0,2	1,3	0,2	0,8	0,5	0,4	0,9	0,2
HEPTADECANO	1700	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	t	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,3	0,1	-	0,1	0,2	0,0	0,3

<b>OCTADECANO</b>	1800	0,5	0,6	0,4	0,4	0,2	1,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	0,4	0,5	0,2	0,4	0,3	1,0	0,2	0,2	0,3	0,5	0,5	0,8
<b>NONADECANO</b>	1900	t	t	-	t	-	0,1	-	-	-	-	-	t	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	0,1
<b>5, 15-ROSADIENO</b>	1925	-	-	0,1	t	0,2	t	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,2	-	t	-	t	0,1	-
<b>GERANIL LINANOL</b>	1954	-	-	-	-	t	-	-	-	-	t	0,1	t	-	t	-	-	0,1	-	0,1	0,1	t	0,1	t
<b>SANDARACOPIMARA-8(14),15-DIENO</b>	1960	0,1	0,1	t	0,1	0,1	t	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	t	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
<b>OXIDO DE MANOÍLO</b>	1986	0,4	0,1	0,6	0,2	0,8	0,3	0,4	1,6	1,6	1,4	1,8	0,1	0,1	2,0	0,8	0,5	2,1	0,3	0,2	1,7	1,2	2,0	1,1
<b>OXIDO DE MANOÍLO</b>	2016	-	-	t	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ABIETATIENO</b>	2057	-	-	t	-	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	t	-	t	-	t	-	t	-	t
<b>SANDARACOPIMARINAL</b>	2200	t	t	t	-	t	-	-	t	t	-	t	-	t	-	t	-	t	-	-	-	t	-	t