



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 2019-2020

**Influencia del grado de maduración en el  
rendimiento y composición del aceite esencial  
extraído de la piel de *Citrus Fortunella  
Margarita* (Kumquat Nagami)**

**Autor: Jose Antonio, Mira Castelló**

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

**Directora experimental: Dra. Sandra Vacas González**

## Resumen

### **Influencia del grado de maduración en el rendimiento y composición del aceite esencial extraído de la piel de *Fortunella Margarita*.**

Los aceites esenciales han sido tradicionalmente conocidos y utilizados por su capacidad de transferir agradables aromas utilizados por ejemplo en perfumería y en la industria alimentaria y farmacéutica como aditivos saborizantes. Actualmente, son objeto de creciente interés por sus diferentes modos de actividad biológica. Entre ellas, cabe destacar su aplicación en tecnología de alimentos como conservantes naturales debido a las propiedades antioxidantes, antifúngicas y antibacterianas. También es importante hacer referencia a sus numerosas aplicaciones farmacológicas, entre las que destaca su actividad inhibidora de cierto tipo de cánceres.

La capacidad antimicrobiana y antifúngica, que justifica su empleo en la industria agroalimentaria, viene determinada por la composición de los aceites y esta varía como lo hace el rendimiento, según distintos factores como el estado de maduración del fruto.

El color, es un indicativo del estado de maduración, y ha sido la variable elegida para distinguir los distintos estadios, pero la determinación del color a nivel visual carece de objetividad, por lo tanto, encontramos la necesidad de aplicar un método físico que defina bajo unos valores objetivos, cada estado de maduración de modo que se permita caracterizar cada muestra con exactitud y fiabilidad pudiéndose tomar como referencia a la hora elegir posteriormente futuras muestras objetivo.

En este trabajo se aplica la medida colorimétrica basada en las coordenadas CIE-L\*A\*B\* a la clasificación de los frutos de *Fortunella Margarita* según cuatro diferentes niveles de maduración. Se estudia posteriormente la influencia de dichos niveles en la composición y rendimiento del aceite esencial obtenido de la corteza de dichos frutos. Las determinaciones analíticas se realizan mediante extracción del aceite por hidrodestilación y posterior aplicación de la cromatografía de gases con detección por espectroscopía de masas (identificación) y con ionización de llama (cuantificación).

La clasificación de los frutos en cuatro estados por el color fue plenamente satisfactoria y aunque no se encontraron grandes diferencias en la composición de los aceites, si se encontraron en los rendimientos expresados en base seca. Los compuestos mayoritarios fueron los monoterpenos y el compuesto por excelencia el limoneno, el cual, mostró su mayor valor para la muestra más madura.

**Palabras clave:** *Fortunella Margarita*, aceites esenciales, grado de maduración.

**Autor del TFG:** Jose Antonio, Mira Castelló

**Tutor del TFG:** Dr. D. Juan Antonio Llorens Molina

**Director experimental:** Dra. D<sup>a</sup> Sandra Vacas González

Valencia, Julio 2020

## **Abstract**

### **Influence of the ripening degree on the yield and composition of the peel essential oil extracted of *Citrus Fortunella Margarita* (Kumquat Nagami).**

Essential oils have traditionally been known and used for their ability to transfer pleasant aromas used, for example, in perfumery and in food and pharmaceutical industries as flavoring additives. Currently, they are the object of increasing interest because their different ways of biological activity. Among them, it is worth highlighting its application in food technology as natural preservatives due to its antioxidant, antifungal and antibacterial properties. It is also important to refer to its numerous pharmacological applications, among which its inhibitory activity of certain types of cancers stands out.

The antimicrobial and antifungal capacity, which justifies its use in the agri-food industry, is determined by the composition of the oils and this varies as does the yield, according to different factors such as the degree of fruit ripeness.

Color is an indication of the ripeness degree and it has been the variable chosen to distinguish the different stages, but the visual determination of color lacks objectivity. For this reason, to apply a physical method to determine the ripening level from objective values becomes necessary. This way, to characterize each stage of maturation with accuracy and reliability could be possible in such a way that it could be taken as reference when choosing future target samples.

In this work, the colorimetric measurement based on the CIE-L \* a \* b \* coordinates is applied in order to achieve a classification of *Fortunella Margarita* fruits according to four different levels of ripening. The influence of these levels on the composition and performance of the essential oil obtained from the peel of these fruits is subsequently studied. The analytical determinations are performed by extraction of the oil by hydro-distillation and further application of gas chromatography with detection by mass spectroscopy (identification) and with flame ionization (quantification).

The classification of the fruits in four states by color was fully satisfactory and although no great differences were found in the composition of the oils, they were found in the yields expressed on a dry basis. The main compounds were monoterpenes and, mainly, limonene limonene, which showed its highest value for the most mature sample.

**Keywords:** *Fortunella Margarita*, essential oils, ripening degree

**TFG author:** Jose Antonio, Mira Castelló.

**Academic author:** Dr. D. Juan Antonio Lloren Molina

**Experimental director:** Dra. D<sup>a</sup> Sandra Vacas González

Valencia, July 2020

## **Agradecimientos.**

A mi tutor Dr. Juan Antonio Llorens Molina, por la gran ayuda, dedicación y disponibilidad que ha depositado en mí.

A la directora experimental, Dr. Sandra Vacas, por los excelentes servicios prestados en cuanto a instrumentación analítica y datos experimentales.

A mi familia, por el apoyo y los ánimos que he recibido a lo largo de estos años.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Naturaleza de los aceites esenciales. Modos de extracción.....	1
1.2. Fortunella margarita. Taxonomía.....	2
1.3 Composición.....	5
1.4 Factores de variabilidad en la composición de los aceites esenciales. Efecto del proceso de maduración.....	8
1.5. Aplicaciones y usos.....	9
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1 Material Vegetal.....	11
3.2 Clasificación de las muestras .....	11
3.2.1 Clasificación visual .....	11
3.2.2 Análisis de color por método físico. ....	12
3.3 Destilación por arrastre de vapor. Equipo Clevenger.....	13
3.3.1 Materiales .....	13
3.3.2 Fundamento .....	13
3.3.3 Metodología.....	14
3.4. Identificación y cuantificación. Cromatografía de gases. ....	16
3.4.1. Cromatografía de gases con detector de espectroscopia de masas (CG-EM). ....	17
3.4.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID). ....	17
3.5 Determinación de humedad .....	18
3.5.1 Materiales .....	18
3.5.2 Fundamento .....	18
3.5.3 Metodología.....	18
3.6 Rendimiento.....	18
3.7 Análisis estadístico .....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
4.2 Determinación de la humedad .....	22
4.3 Rendimiento aceites esenciales .....	22
4.4 Composición aceites esenciales.....	24
4.4.1 Cromatografía de gases .....	24
4.4.2 Discusión .....	28
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFÍA .....	30
7. ANEXOS .....	34

## FIGURAS

Figura 1. Árbol, fruto y hoja de *fortunella margarita* y sus características.

Figura 2. a) *Fortunella crassifolia* swingle. Kumquat meiwa. b) *Fortunella hindssi* (champ). Kumquat hong kong. c) *Fortunella polyandra* (ridl) yu tanaka. Kumquat malayo

Figura 3. Frutos de *fortunella margarita* según estado de maduración

Figura 4. Lector de color cr-10 plus (konica minolta)

Figura 5. Espacio de color CIE-L\*a\*b\*

Figura 6. Equipo para hidrodestilación con Clevenger

Figura 7. Material vegetal preparado para triturar

Figura 8. Separación de fases en bureta del Clevenger

Figura 9. a) Secado de muestra con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). b) Vial de vidrio con aceite esencial a puro

Figura 10. Gráfico de funciones discriminantes

Figura 11. Gráfico rendimientos sobre materia fresca

Figura 12. Gráfico rendimientos sobre materia seca

Figura 13. Ejemplo de cromatograma (tic: total ion chromatogram) de la muestra a1

## TABLAS

Tabla 1. Tabla bibliográfica sobre la composición nutricional aproximada del género *Fortunella* en base húmeda por cada 100 g de producto.

Tabla 2. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3%) de la piel de distintas especies e híbridos del género *Fortunella* cultivados bajo las mismas condiciones climáticas y lugar de procedencia.

Tabla 3. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3%) de *Fortunella Margarita* según el método de extracción en mismo lugar de procedencia.

Tabla 4. Tabla bibliográfica sobre los porcentajes de extracción de los tipos de aceites esenciales principales en *Fortunella Margarita* según método de extracción y mismo lugar de procedencia.

Tabla 5. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3) de *Fortunella Margarita* según tipo de muestra y lugar de procedencia.

Tabla 6. Valores medios de L\*, a\* y b\* para cada una de las muestras de las cuatro etapas de maduración definidas

Tabla 7. Resumen estadístico de medias de cada grupo

Tabla 8 y 9. Funciones discriminantes y derivadas

Tabla 10. Valores medios del % de humedad para cada estado de maduración

Tabla 11. Rendimiento de los aceites esenciales según el estado de maduración sobre materia fresca y seca

Tabla 12. Composición del aceite esencial de la corteza de *Citrus Fortunella Margarita* (kumquat). Determinación por espectroscopía de masas a partir de la muestra A1

Tabla 13. Tabla cuantitativa resumen de los distintos estados de maduración del Kumquat obtenidos por FID (letras diferentes: a, b... en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)).

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Naturaleza de los aceites esenciales. Modos de extracción.

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias volátiles y semivolátiles complejas que confieren el olor y el aroma característico a cada planta. Generalmente desprenden olores agradables, aunque en algunos casos como en el ajo y la cebolla, estos pueden ser desagradables debido a la presencia de compuestos azufrados.

Los aceites esenciales se encuentran en diversos órganos de la planta, principalmente en los tricomas glandulares de hojas y flores (menta, eucalipto, romero, manzanilla, tomillo, etc.), así como en la piel del fruto (cítricos), las raíces (azafrán, jengibre, cúrcuma), las semillas (hinojo, anís, comino), el fruto (pimienta, cilantro) e incluso en el tallo (canela) (Stashenko, 1996).

Son extraídos por distintos métodos tanto a escala industrial, como de laboratorio y a microescala (Kubeczka, 2015). Entre los primeros cabe destacar, principalmente, la destilación por arrastre de vapor, la expresión en frío (cortezas de cítricos) y el denominado “enfleurage”, método de extracción específico para materiales como los pétalos de flores. (Carbonnel, 1999) A escala de laboratorio los principales métodos son la hidrodestilación (HD) y la extracción-destilación simultáneas (SDE), aunque cada vez son más utilizados los procesos de extracción asistida por microondas o la realizada mediante fluidos supercríticos (SFE). Entre los métodos a microescala cabe destacar la microextracción en fase sólida (SPME), utilizado para el análisis de las sustancias volátiles emitidas por diferentes materiales, entre ellos los diversos órganos de las plantas.

Estas mezclas se componen principalmente monoterpenos y sesquiterpenos con sus correspondientes derivados oxigenados (abundantes en familias como las Rutáceas). (Guignard *et al.*, 1985), así como de compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcoholes, aldehídos, alcanos...), fenilpropanos y según el método de extracción, de otros compuestos de masa molecular más elevada como cumarinas y algunos ácidos grasos.

Debido a la presencia de infinidad de compuestos bioactivos presentes en ellos, los aceites esenciales se han utilizado en distintos campos:

En tecnología de alimentos como conservante directo o incluso como aditivo en los embalajes resultando en lo que se conoce como embalaje activo, debido a sus propiedades antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes. Por ejemplo, han sido objeto de estudio en embalajes de carne en contra de bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas spp.* (Zinoviadou *et al.*, 2009) y de pescado evitando la oxidación de los lípidos (Giménez, *et al.*, 2004). También como saborizante natural (Burt, 2004). Algunos de los aceites esenciales con mayor capacidad antioxidante son los de orégano y tomillos fenólicos (*Thymus piperella*, por ejemplo) por sus contenidos en carvacrol (Bounatirou *et al.*, 2007) y timol (Bozin *et al.*, 2006).

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales se ha demostrado en diferentes estudios, siendo esta generalmente más elevada frente a Gram positivas que negativas. (Kokoska *et al.*, 2002; Okoh *et al.*, 2010). Un ejemplo claro es el ya citado del carvacrol, presente en el orégano (Veldhuizen *et al.*, 2006) o el de los contenidos en aceites como el obtenido de *Callistemon comboynensis*, que además de ser activo frente a bacterias Gram positivas, también posee

carácter antifúngico contra *Candida albicans* debido a la elevada presencia de compuestos oxigenados (Abdelhady & Aly, 2012).

En tecnología agroalimentaria como tratamiento de plagas y enfermedades de las plantas por las propiedades anteriormente mencionadas y su capacidad insecticida, siendo una alternativa natural a los productos fitosanitarios químicos, la cual está en estudio, como apuesta hacia una agricultura ecológica.

En la industria farmacéutica en jarabes; confitería; perfumería; en medicina popular en lo que se conoce como aromaterapia.

Los aceites esenciales están presentes en unas 60 familias de reino vegetal, en las que se incluye la familia de las *Rutáceas*. Dentro de esta familia, hemos escogido objeto de estudio el género *Fortunella*, también conocido como Kumquat, pues se trata de un género un tanto desconocido para muchos y menos estudiado como pueden ser cítricos como la naranja o el limón.

### **1.2. Fortunella margarita. Taxonomía**

El género *Fortunella* pertenece a la familia de las rutáceas según (Swingle & Reece, 1967), el cual carece de plena claridad sobre su origen. Este se piensa que radica en Asia, concretamente en el sureste de China según Webber, (1967) y Yin-Min, (1985) y su nombre proviene de Robert Fortune, horticultor escocés que la trajo de China para su introducción en Europa.

Al principio, su clasificación se basaba principalmente en sus características morfológicas ya que anteriormente la clasificación de las plantas se realizaba según características como la morfología, la anatomía y la topografía entre otras, como lo indican Thoday, (1925), Smith, (1972) y Kress, (1983). El género *Fortunella* está constituido por cuatro especies:

***Fortunella margarita (Lour.) Swing.*** (estudiado en este trabajo)

*Fortunella japonica (Thunb.) Swing.*

*Fortunella polyandra (Ridl.) Tan.*

*Fortunella hindsii (Champ.) Swing.*

Híbridos:

*Fortunella Crasifolia Swing* (Híbrido *F.margarita* y *F.japonica*)

*Fortunella Obovata*

(Swingle and Reece, 1967)

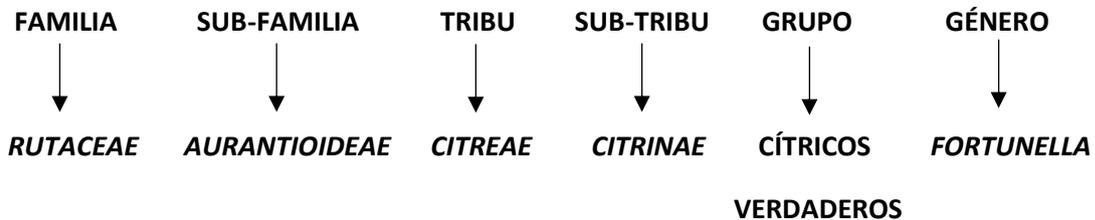
Esta fué la clasificación final resultante de la controversia de las especies, ya que *F.Crasifolia* y *F.Obovata*, eran considerados especies según Tanaka, (1933), pero por otro lado según Swingle, (1915), éstas podrían tener carácter híbrido.

En estudios más recientes atendiendo a los cromosomas, se ha propuesto la hipótesis de que las verdaderas especies son *F.Margarita*, *F.Crasifolia*, *F.Japónica* y *F.Hindsii* quedando *F.Obovata* y *F.Polyandra* como resultado de una hibridación natural (Yasuda *et al.*, 2015).

El sistema taxonómico de los cítricos fue propuesto en el S.XIX por Hooker y Engler, los cuales propusieron 13 géneros y 11 especies. Posteriormente Swingle, pasó a dividir la tribu *Citreae* en

tres subtribus, una de las cuales llamada *Citrinae*, contiene el género *Fortunella*. Todo esto fue debido a la discrepancia en las similitudes y diferencias que presentaban los frutos entre sí, lo que dio lugar a debatir sobre cuál sería la clasificación más idónea.

La clasificación final quedaría de la siguiente manera:



(Swingle and Reece, 1967)

El género *Fortunella* denominado también 'Kumquat' (naranja dorada), se caracteriza por tener frutos muy similares a los del género *Citrus*, pero con la principal diferencia de que su tamaño es pequeño (2 a 3 cm de diámetro) y es comestible en su totalidad debido al dulzor de su corteza además de tener de forma moderada cierta resistencia al frío. Poseen de 3 a 7 gajos con una pulpa jugosa, ácida y alguna semilla. Presentan formas ovoides o globosas y tonalidades naranjas, cuya piel está cargada de glándulas de **aceites esenciales**, que le confieren ese aroma característico y multitud de propiedades tanto a nivel de salud como de otros usos de interés.

En nuestro estudio utilizamos frutos de *Fortunella margarita*, comúnmente conocida como 'Kumquat Nagami'. A continuación, podemos observar en la figura 1, tanto las características principales de esta variedad como una imagen representativa a nivel visual del árbol, fruto y hojas para poder conocer un poco más sobre esta especie. (Ancillo y Medina, 2015). *Monografías botánicas, los cítricos*. Ed. Jardín botánico universidad de Valencia)

<b>Especie</b>	<i>Fortunella margarita</i> (Lour.) Swing.	
<b>Nombre común</b>	Kumquat nagami	
<b>Origen</b>	Sureste China	
<b>Árbol</b>	Pequeño a mediano Ramificado Sin espinas	
<b>Hojas</b>	Lanceolada Pequeña o mediana Finamente dentada Tacto coriáceo Superior verde oscuro Inferior más claro	
<b>Flores</b>	Pequeñas Pétalos blancos Muy aromáticas Solas o en racimos	
<b>Fruto</b>	Pequeño Naranja Forma elipsoidal Glándulas aceites esenciales grandes Corteza gruesa Pulpa ácida con poco zumo Pocas semillas pequeñas Comestible en su totalidad	

FIGURA 1. ÁRBOL, FRUTO Y HOJA DE *FORTUNELLA MARGARITA* Y SUS CARACTERÍSTICAS. Imágenes tomadas de Ancillo y Media (2015)

Como hemos comentado anteriormente, este fruto presenta formas ovoides o globosas con presencia de alguna semilla y es aquí donde encontramos las principales diferencias entre las distintas especies de este género. En las siguientes figuras observamos tres imágenes que nos permiten tener una perspectiva visual de la variabilidad de algunas de las especies más importantes. (Ancillo y Medina, (2015). *Monografías botánicas, los cítricos*. Ed. Jardín botánico universidad de Valencia)

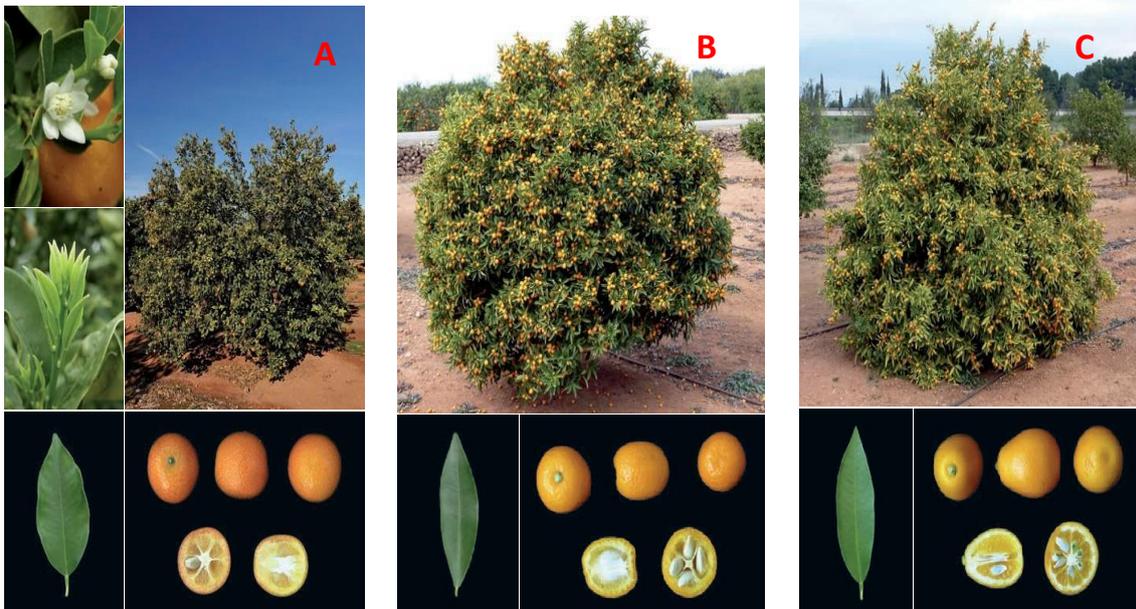


FIGURA 2. A) *FORTUNELLA CRASSIFOLIA* SWINGLE. KUMUQUAT MEIWA. B) *FORTUNELLA HINDSSI* (CHAMP). KUMUQUAT HONG KONG. C) *FORTUNELLA POLYANDRA* (RIDL) YU TANAKA. KUMUQUAT MALAYO. *Imágenes tomadas de Ancillo y Media (2015).*

### 1.3 Composición

Para conocer mejor el género *Fortunella*, debemos prestar atención tanto a su composición nutricional como la de los aceites esenciales ricos en compuestos bioactivos, que le confieren diferentes propiedades de intereses en distintos campos, incluido la tecnología de alimentos.

A continuación, se van a presentar una serie de tablas bibliográficas donde se recoge información extraída de estudios anteriores que nos permitirán saber cuáles son los componentes mayoritarios presentes, basándose en distintos factores.

Tabla 1. Tabla bibliográfica sobre la composición nutricional aproximada del género *Fortunella* en base húmeda por cada 100 g de producto.

Referencias/ Localización	Macros (g)	Minerales (mg)	Vitaminas (mg)
(Lee <i>et al.</i> , 2005)	Humedad.....77.1% Proteínas.....1.03% Grasas.....0.05%	Calcio, Ca.....29.1% Fósforo, P.....21.8% Hierro, Fe.....0.26%	A.....257 RE B1.....0.1% B2.....0.13%
Isla de Jeju, Korea	Carbohidratos.....20.5% Fibra.....0.86% Cenizas.....0.5%	Sodio, Na.....16.4% Potasio, K..... 137.8% Magnesio, Mg.....0.16% Zinc, Zn.....0.16%	C.....56,1% Niacina....0.75%

Tabla 2. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3%) de la piel de distintas especies e híbridos del género *Fortunella* cultivados bajo las mismas condiciones climáticas y lugar de procedencia.

Referencias/ Localización	Especie/Híbrido	Componentes > 0.3 %
(Sutour <i>et al.</i> , 2015)  Corsica, Francia	- Margarita, Kumquat Nagami	- Limoneno (93.1%), Germacreno D (2.4%), Mirceno (1.4%), óxido de trans-Linalool (0.3%), $\gamma$ -Eudesmol (0.3%).
	- Japónica, Kumquat Marami	- Limoneno (96.3%), Mirceno (1.5%), $\alpha$ -Terpineol (0.5%), $\alpha$ -Pino (0.3%).
	- Hindsii, Kumquat Hong Kong	- Limoneno (93.5%), Germacreno D (2.1%), Mirceno (1.3%).
	- Obovata	- Limoneno (95.6%), Mirceno (1.6%), <i>trans</i> -Carveol (0.4%), $\alpha$ -Terpineol (0.3%), Germacreno D (0.3%).
	- Crassifolia, Kumquat Meiwa	- Limoneno (84.2%), Mirceno (12.9%), <i>trans</i> -Carveol (0.6%), $\beta$ -Phenllandreno (0.3%), Germacreno D (0.3%).

Tabla 3. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3%) de *Fortunella Margarita* según el método de extracción en mismo lugar de procedencia.

Referencias/ Localización	Método de extracción	Componentes > 0.3 %
(Sicari & Poiana, 2017)  Calabria, Italia	- Hidrodestilación	- Limoneno (95.95-97.87%), Mirceno (1.69-1.71%), $\alpha$ -Pino (0.40-0.42%), Germacreno D (0.78-0.92%).
	- Solvente	
	- Dióxido de Carbono supercrítico (40º, 80 Bar)	- Limoneno (95.69-97.11%), Mirceno (1.61-1.77%), $\alpha$ -Pino (0.33-0.39%), Germacreno D (1.06-1.28%).
	- Dióxido de Carbono supercrítico (40º, 250 Bar)	- Limoneno (95.79-96.95%), Mirceno (1.73-1.81%), $\alpha$ -Pino (0.32-0.40%), Germacreno D (0.94-1.02%).
		- Limoneno (95.75-96.41%), Myrceno (1.61-1.65%), $\alpha$ -Pino (0.32-0.34%), Germacreno D (1.36-1.52%).

Tabla 4. Tabla bibliográfica sobre los porcentajes de extracción de los tipos de aceites esenciales principales en *Fortunella Margarita* según método de extracción y mismo lugar de procedencia.

Referencias/ Localización	Método	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Ésteres
(Sicari & Poiana, 2017) Calabria, Italia	Hidrodestilación	98,34%	1,04%	0,29%
	Solvente	98,87%	1,38%	0,36%
	CO2 sup. 80 Bar	98,61%	1,14%	0,3%
	CO2 sup. 250 Bar	98,29%	1,68%	0,52%

Tabla 5. Tabla bibliográfica de los componentes (>0.3) de *Fortunella Margarita* según tipo de muestra y lugar de procedencia.

Referencias/ Muestra	Localización	Componentes > 0.3
(Fitsiou <i>et al.</i> , 2016) Piel	- Isla de Corfú, Grecia	- Limoneno (93.78%), Mirceno (2.68%), $\alpha$ -Pineno (0.74%), Germacreno D (1.43%)
(Allam <i>et al.</i> , 2015) Fruto entero	- Egipto	- Limoneno (80.60%), Mirceno (4.7%), Ocimenil acetato (3%), Geranil acetato (1.51%), $\alpha$ -Pineno (1.52%), trans-Carveol (0.78%), $\alpha$ -Terpineol (0.72%), $\gamma$ -Elemeno (0.3%).
(Jayaprakasha <i>et al.</i> , 2012) Fruta fresca	- USA	- Limoneno (41.6%), Mirceno (16.5%), Propionato de linalilo (9.6%), Germacreno D (5.9%).
(Quijano & Pino, 2009) Hojas	- Villavicencio, Colombia	- $\gamma$ -Eudesmol (19.0%), $\gamma$ -Elemol (18.8%) and $\beta$ -Eudesmol (12.4%), germacreno D (8.9%), $\beta$ -pineno (8.3%), Linalool (8.2%).

Como podemos observar, los frutos presentan características similares a la de los cítricos, pero encontrando diferencias en el contenido calórico siendo este más elevado debido a los carbohidratos. Por otro lado, vemos que es rico en micronutrientes y además se encuentran diferencias significativas a favor respecto a los cítricos en Vit A, Vit B, Ca, Na, Mg y Zn. (Lee *et al.*, 2005).

Por otro lado, la composición de los aceites esenciales apenas varía entre muestra y muestra salvo en las hojas, donde esta es completamente distinta a la del fruto. (Quijano & Pino, 2009). El componente por excelencia es el Limoneno, con un porcentaje en la mayoría de los casos superior al 90% y, por lo tanto, como se indica en (Sicari & Poiana, 2017) los monoterpenos son los compuestos principales sea cual sea el método de extracción.

#### **1.4 Factores de variabilidad en la composición de los aceites esenciales. Efecto del proceso de maduración.**

La composición de los aceites esenciales está sujeta a múltiples factores de variabilidad: genéticos, ecológicos, relacionados con el método de extracción y con la preparación de las muestras previa al análisis (Figueiredo *et al.*, 2008). En este sentido, el secado de las muestras es una práctica habitual cuando ha de transcurrir un cierto tiempo entre la obtención de la muestra y el análisis. En efecto, el secado, además de reducir la masa y volumen de material, lo cual es importante de cara al transporte cuando se trata de procesos industriales, disminuye la actividad microbiológica favoreciendo su adecuada conservación. En este sentido, cabe señalar que la composición de los aceites esenciales de los cítricos se ve afectada por tratamientos previos a la extracción como son el tipo de secado empleado. Compuestos mayoritarios como lo es el limoneno y otros minoritarios se ven afectados por el tipo de secado, así como el rendimiento de los aceites, tal como se indica en (Kamal *et al.*, 2011), (Olatunya & Akintayo, 2017) pero en estos trabajos no se han llevado a cabo repeticiones y los datos provienen solo de GC/MS, por lo que las variaciones que observan en rendimiento y composición hay que tomarlas como orientativas y el trabajo se centra en la comparación de la actividad antioxidante y (Adebisi, 2014). Puede concluirse, por tanto, que no se dispone de datos concluyentes de carácter general sobre el efecto de los diferentes métodos de secado sobre la composición del aceite esencial de las cortezas de cítricos.

Un factor que sí es decisivo en muchos casos, tanto en los cítricos como en las plantas aromáticas en general, es el ontogenético, es decir, el relacionado con la evolución de la planta a lo largo de su ciclo vegetativo. Las variables de rendimiento y composición se ven afectadas por el efecto de la maduración en los cítricos como se demuestra en (Bourgou *et al.*, 2011), donde se estudió el efecto de la maduración en cítricos como la mandarina, la naranja y el limón, así como en (Simeone *et al.*, 2019) para diferentes cultivares de limón en distintas fechas del proceso de maduración, o en (Liu *et al.*, 2019), donde se observó el efecto de la maduración en el rendimiento de los aceites esenciales de la piel del Kumquat.

### 1.5. Aplicaciones y usos

Debido a las características tanto organolépticas como químicas del fruto y de sus aceites esenciales, el Kumquat tiene diferentes usos:

- Tradicionalmente es utilizado en el ámbito culinario en mermeladas, encurtidos ya sean ácidos o dulces, en almíbar (muy común en Hong Kong) así como fresco en su totalidad y en la elaboración de bebidas. Algunas personas lo emplean cultivándolo como bonsái.
- También en medicina popular como tratamiento para aliviar dolores de garganta, contra la tos y como estimulante.
- En perfumería y productos de higiene personal.
- En farmacología, ha sido objeto de estudio mostrando diferentes tipos de efectos como, por ejemplo: en un estudio a partir de la piel de *Fortunella Japonica*, resultó contener glucósidos flavonoides con actividad depresora de la presión sanguínea. (Kumamoto *et al.*, 1985). Por otro lado, los aceites esenciales presentes en *Fortunella Margarita*, han mostrado tener actividad inhibitoria del cáncer de próstata, así como antiinflamatoria, en un ensayo donde se observó que, a determinadas concentraciones, inducen apoptosis. (Jayaprakasha *et al.*, 2012).
- En tecnología de alimentos resulta ser de especial interés debido su capacidad antimicrobiana en contra de bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. bulgaricus* y *B. laterosporus*) y Gram-negativas (*E. coli* y *S. typhimurium*), así como actividad antifúngica en contra de *C. albicans*, la cual, fue demostrada en un estudio a partir de la extracción de aceites esenciales de *Fortunella Crassifolia* mediante hidrodestilación, adquiriendo real importancia, como conservante natural de alimentos. (Wang *et al.*, 2012). La actividad antifúngica de los aceites esenciales del Kumquat ha sido objeto de estudio en posteriores trabajos para comprobar su capacidad en contra de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger* en zumos de frutas. (Mitropolou *et al.*, 2018).

## 2. OBJETIVOS

Tomando como referencia los artículos mencionados anteriormente, sabemos que el grado de maduración afecta tanto al rendimiento como a la composición de los aceites esenciales de los cítricos.

Nuestro objetivo, es conocer cómo afecta esta variable a la composición y rendimiento de los aceites esenciales de la piel de *Fortunella Margarita*, denominado también 'Kumquat Nagami', pues existe muy poca bibliografía al respecto, y puede servir como vía u orientación de cara a futuros estudios de interés sobre los aceites presentes en este fruto, pues el Kumquat, a diferencia de otros cítricos, no se caracteriza por un elevado consumo alimenticio.

Por lo tanto, nuestros objetivos quedarían resumidos atendiendo las preguntas siguientes:

- ¿Existen diferencias en el rendimiento de los aceites esenciales?, ¿Este aumenta o disminuye a medida que avanza la maduración?
- ¿Cómo se ve afectada la composición de los aceites esenciales?, ¿Existen diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los distintos estados de maduración?
- Posibles enfoques de cara a otros trabajos con los resultados obtenidos.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Los frutos de Kumquat fueron recolectados de un árbol situado en una parcela experimental de la Universidad Politécnica de Valencia en enero de 2019, perteneciente al Instituto Agroforestal Mediterráneo, localizada en las coordenadas: 39°29'02.2"N 0°20'26.2"W y caracterizada desde el punto de vista bioclimático en el piso termomediterráneo. El muestreo fue simultáneo, pues el árbol presentaba frutos con diferentes estadios de madurez. Las muestras se tomaron tanto de las partes altas y bajas como de las más internas, pues las más maduras eran las más expuestas al sol y a la inversa. Posteriormente se clasificaron por color y se congelaron a -40°C hasta el momento de analizarlas.

#### 3.2 Clasificación de las muestras

Una vez recolectadas las muestras, se procedió a su clasificación por color, separándose en distintos estadios, primero a nivel visual y segundo, mediante el empleo de un método físico. De este modo, se analizaron las muestras previamente clasificadas para confirmar la correcta separación analizando los resultados con el uso de un programa estadístico para verificar las diferencias significativas y concordancias entre y dentro de cada grupo.

##### 3.2.1 Clasificación visual

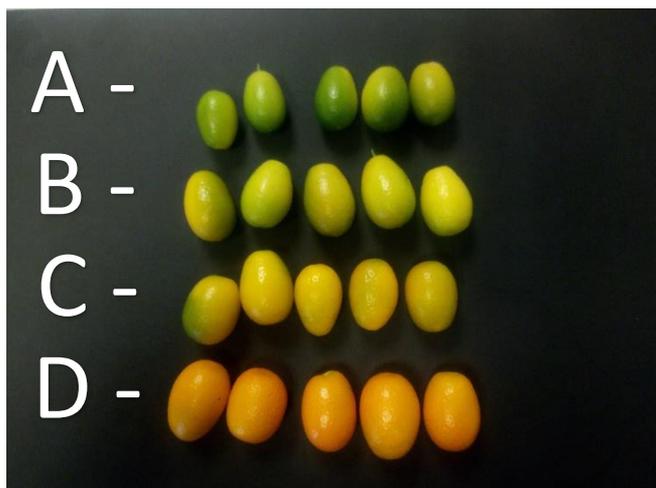


FIGURA 3. FRUTOS DE *FORTUNELLA MARGARITA* SEGÚN ESTADO DE MADURACIÓN

Estadios de maduración identificados según color:

- A: Los frutos presentan un color verde homogéneo entre el 80-90% de la superficie.
- B: Los frutos presentan un color verde claro amarillento alrededor del 80% de la superficie.
- C: Los frutos presentan un color amarillo intenso levemente anaranjado entre el 80 y 90% de la superficie.
- D: Los frutos presentan un color naranja en el 100% de la superficie.

### 3.2.2 Análisis de color por método físico.

#### 3.2.2.1 Materiales.

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



FIGURA 4. LECTOR DE COLOR CR-10 PLUS (KONICA MINOLTA)

#### 3.2.2.2 Fundamento.

El color que presentan los frutos varía a medida que nos acercamos al momento de cosecha u al momento de madurez plena. Esto significa que puede ser utilizado como un indicativo del estado de madurez en que se encuentran. Pese a que el ojo humano es una herramienta rápida y eficaz, carece de objetividad, pues cada individuo puede percibir los colores de modo distinto y, además, se caracteriza por la falta de sensibilidad a pequeñas variaciones.

Mediante el uso del lector de color mencionado anteriormente, obtenemos mediciones del color de cada fruto que los traduce con los valores del espacio de color (CIE  $L^*a^*b^*$ ).

Este sistema cartesiano consta de 3 ejes:

- $L^*$ : eje vertical, mide la luminosidad del color variando desde 0 (negro) a 100 (blanco), pudiendo dar valores superiores a 100 los colores fluorescentes.
- $a^*$ : eje horizontal, mide el contenido de rojo (valores positivos) o verde (valores negativos) de un color.
- $b^*$ : eje horizontal (perpendicular a  $a^*$ ), mide el contenido de amarillo (valores positivos) o azul (valores negativos) de un color.

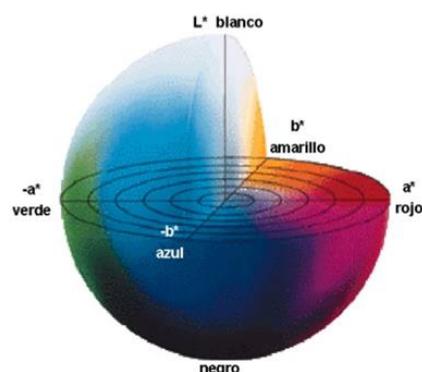


FIGURA 5. ESPACIO DE COLOR CIELAB

### **3.2.2.3 Metodología**

Con el uso del lector de color, se procede a medir cada muestra que previamente ha sido separada en niveles de maduración. El procedimiento lo realizaremos por triplicado, pues cada nivel lo separamos en tres bloques.

El lector de color dispara tres veces para tomar las medidas correspondientes, de las cuales, saca la media de los valores de L\*, a\* y b\* comentados anteriormente. Los disparos los situamos en el ecuador y los extremos del fruto para obtener resultados lo más representativos posibles.

Este mismo método fue empleado en un estudio similar referente a los cítricos (Simeone *et al.*, 2019), por lo que podemos tomarlo como referencia.

Una vez recogidos los datos del color, se procede a su análisis estadístico discriminante (Llorens-Molina *et al.*, 2019).

### **3.3 Destilación por arrastre de vapor. Equipo Clevenger**

La hidrodestilación ha sido el método de extracción de los aceites esenciales elegido para este trabajo.

#### **3.3.1 Materiales**

- Agua destilada
- Triturador doméstico
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A)
- Cronómetro
- Pipetas
- Espátulas
- Vasos de precipitados (PYREX)
- Clevenger (vidraFOC)
- Matraz aforado 500 mL (vidraFOC)
- Vaso de precipitados
- Placa calefactora
- Manta térmica (Ibs-Instruments)
- Refrigerante
- Rotavapor (Laborota 4001, Heidolph Instruments)
- Viales de vidrio
- Sulfato de sodio anhidro
- Algodón

#### **3.3.2 Fundamento**

La hidrodestilación es uno de los métodos más empleados y estandarizados para la extracción de aceites esenciales. (Guenther, 1948).

##### **3.3.2.1 Fundamento físico**

Los aceites, son sustancias inmiscibles en su mayoría o parcialmente miscibles en agua. Esto conlleva, que, al llevar a ebullición, las presiones de vapor del agua y los aceites se vuelven aditivas, ya que el punto de ebullición se dará cuando la suma de presiones se iguale a la atmosférica, disminuyendo así sus presiones parciales. Debido a este fenómeno físico, es posible

destilar aceites esenciales con agua, ya que el punto de ebullición de estos se reduce, el cual, es relativamente elevado en comparación con el agua. Esto permite, a partir del vapor condensado generado durante la ebullición, recuperar los aceites de la materia a destilar.

### 3.3.2.2 Equipo Clevenger

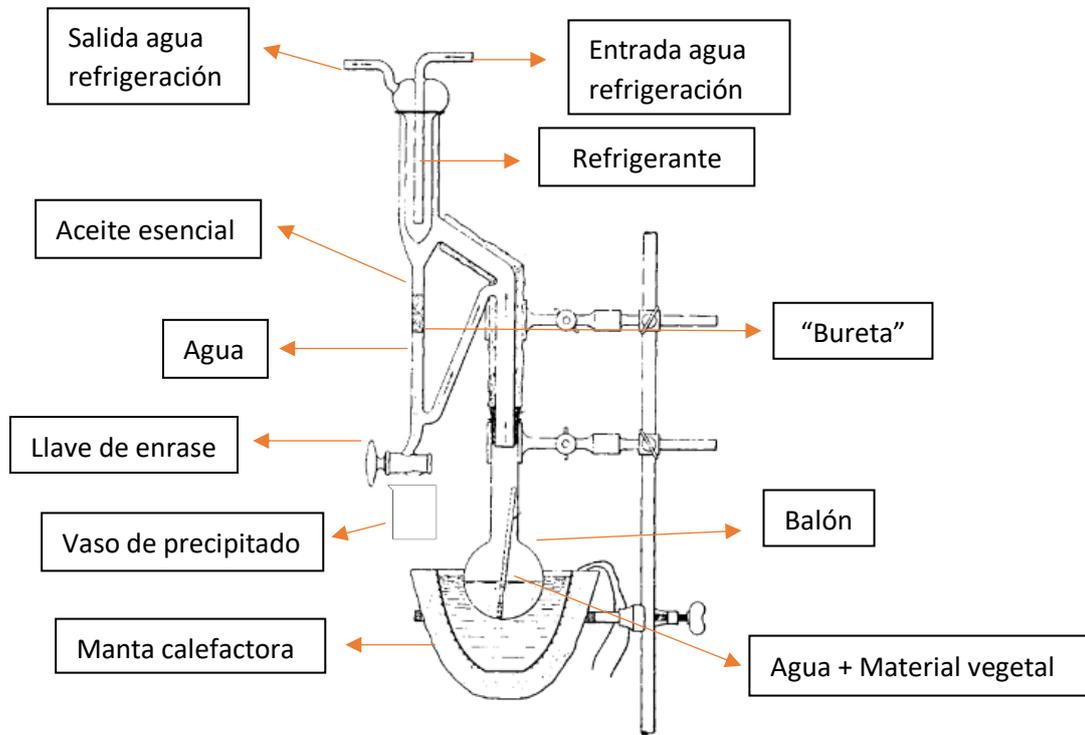


FIGURA 6. EQUIPO PARA HIDRODESTILACIÓN CON CLEVINGER

### 3.3.3 Metodología

Primero de todo, con la ayuda de un cuchillo y una cuchara, se procede a la separación de la piel del Kumquat del resto del fruto para su posterior pesaje. A continuación, se tritura el material con un triturador doméstico con un poco de agua, consiguiendo que sea lo más homogéneo posible y se vierte en un matraz de 500 mL enrasando a 300 mL con agua desionizada, aumentando así el contacto con el agua y mejorando la calidad del proceso



FIGURA 7. MATERIAL VEGETAL PREPARADO PARA TRITURAR

Tras el montaje del equipo Clevenger y la circulación de líquido refrigerante, se pone a hervir con una manta calefactora el material vegetal preparado anteriormente en un balón conectado al equipo, controlando que el hervor no se dé en exceso para evitar que el material vegetal en suspensión ascienda por el Clevenger.

A medida que transcurre el tiempo, el vapor de agua junto con el de los aceites asciende por el equipo y va condensando gracias al líquido refrigerante depositándose en el cuerpo del Clevenger. Debido a la diferencia en las densidades de los compuestos, se produce la separación de las fases, quedando los aceites encima del agua. Con el uso de la llave, se procede a enrasar el aceite, ya que el equipo dispone de bureta y así tomar mediciones del volumen obtenido de aceite esencial y conocer el cual ha sido el rendimiento resultante.

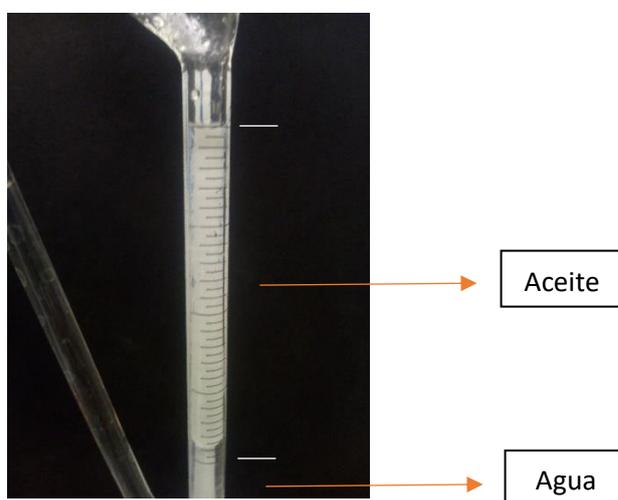


FIGURA 8. SEPARACIÓN DE FASES EN BURETA DEL CLAVENGER

Una vez recogido el aceite en un vaso de precipitado, mediante el uso de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se seca la muestra, ya que es posible que hayan quedado restos de agua, lo que conllevaría posibles modificaciones en la composición del aceite esencial durante su almacenamiento además de no poderse realizar su análisis por cromatografía, pues la muestra debe introducirse en la columna totalmente exenta de agua. Con la ayuda de una pipeta y un poco de algodón que filtre las impurezas, se recoge el aceite ya secado del vaso de precipitado y se vierte en un vial de vidrio bien sellado con parafilm, almacenándolo a  $-25^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

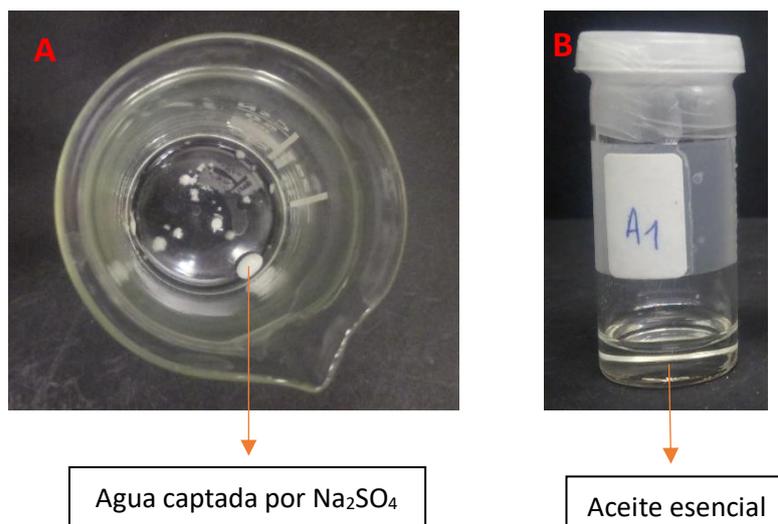


FIGURA 9. A) SECADO DE MUESTRA CON SULFATO DE SODIO ANHIDRO (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). B) VIAL DE VIDRIO CON ACEITE ESENCIAL A PURO

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

Para la identificación y cuantificación de los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación de la cáscara del Kumquat, hemos utilizado como técnica analítica la cromatografía de gases.

La cromatografía de gases se basa en una técnica analítica separativa de los componentes de una mezcla que actúa por la afinidad que presentan los componentes de la mezcla entre una fase estacionaria y una móvil. Se trata de la técnica por excelencia para la separación de compuestos orgánicos, muy sensible y rápida. Dependiendo del detector utilizado, la cromatografía de gases puede utilizarse para la identificación y para la cuantificación de los componentes de un aceite esencial.

Por un lado, se identifican los aceites mediante el uso de un detector de espectroscopia de masas (CG-EM), y por otro, mediante el uso de un detector de ionizador de llama (GC-FID), con el método de la normalización de áreas de los picos, obtenemos una cuantificación aproximada de los aceites esenciales.

La identificación de los compuestos se ha realizado mediante el cálculo de los índices de retención lineales con la siguiente fórmula:

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

Donde:

n es el número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

t<sub>Rx</sub> es el tiempo de retención del compuesto de interés.

t<sub>Rn</sub> es el tiempo de retención del n-alcano anterior al compuesto de interés.

t<sub>RN</sub> es el tiempo de retención del n-alcano posterior al compuesto de interés.

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

#### **3.4.1.1 Materiales.**

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

#### **3.4.1.2 Fundamento**

Como hemos comentado anteriormente la combinación de la cromatografía de gases con detector de espectrómetro de masas, podemos identificar con elevada precisión los compuestos de una mezcla.

El espectrómetro de masas actúa mediante la utilización de un campo electromagnético identificando los iones según su relación masa-carga. Este detector se caracteriza por su elevada selectividad y por ello, es tan utilizado en la identificación de compuestos.

#### **3.4.1.3 Metodología**

Su utilizaron 1,2 mL/min de Helio (He) como fase móvil a una temperatura del inyector de 250°C. La temperatura del horno se aumentó 3°C/min en gradiente desde 50°C a 250°C. Se utilizó el (modo de ionización por impacto electrónico, 70 eV) a una temperatura de ionización de 200°C para la detección. Los espectros, fueron obtenidos con el modo de escaneo total de iones (rango de masas  $m/z$  45-500 uma). Los espectros y cromatogramas obtenidos se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). La identificación se realizó por medio de la comparación de los espectros obtenidos con los de la base de datos NIST MS Search 2.0 (Thermo Electron Corp., Waltham, EEUU), pues esta aplicación tiene la capacidad de mediante las coincidencias de ambos espectros, identificar por probabilidad de cuál se trata. (Adams, 2007)

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

#### **3.4.2.1 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.)

#### **3.4.2.2 Fundamento**

Como su nombre indica, por medio de una llama, se produce la ionización de los compuestos orgánicos presentes en la mezcla. Estos, al tener carga eléctrica, crean una señal en el detector que es captada por unos electrodos.

Esta técnica se caracteriza por su elevada sensibilidad, respuesta y bajo ruido de fondo, aunque por su contra, debido a la pirólisis de los compuestos, se trata de una técnica destructiva.

### 3.4.2.3 Metodología

Se utilizaron 1,2 mL de Helio (He) como fase móvil, un volumen de muestra de 1 o 2 µL, una temperatura de 250°C para el inyector y detector, así como una temperatura del horno en gradiente desde los 50°C hasta los 250°C a 3°C/min. Los cromatogramas obtenidos se procesaron con el *software* Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.).

## 3.5 Determinación de humedad

### 3.5.1 Materiales

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

### 3.5.2 Fundamento

Se utilizó el método de secado en estufa de vacío, el cual, se basa en un método de secado por diferencia de peso en el que se introducen las muestras en la estufa, a una temperatura de 70°C y 2 atm hasta alcanzar peso constante. (24h).

### 3.5.3 Metodología

Se tomaron muestras de la piel del kumquat de los diferentes estados de maduración por triplicado (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>).

Se procedió a pesar las capsulas de vidrio previamente secadas y etiquetadas para posteriormente pesarlas de nuevo junto con las muestras. A continuación, se introdujeron en la estufa para iniciar el secado de las muestras durante 24h.

Transcurrido el tiempo, se retiraron las capsulas junto con las muestras ya secadas y se introdujeron en el desecador dejando que enfriasen unos minutos. Se pesaron de nuevo y se determinó el contenido de humedad, el cual se determina mediante la siguiente fórmula:

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

## 3.6 Rendimiento

Para calcular el rendimiento de los aceites esenciales de *Fortunella Margarita*, se tomó como valor de referencia el volumen (mL) obtenido de aceite de cada muestra y la masa (g) de producto fresco. Posteriormente se calcularon los rendimientos también sobre materia seca.

Este se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Volumen aceite esencial (mL)}}{\text{Peso muestra fresca u mateira seca (g)}} \times 100$$

### 3.7 Análisis estadístico

El primer análisis que se hizo fue para corroborar la correcta separación de los diferentes estados de maduración según color a nivel visual. El método que se empleó se basa en un análisis discriminante de las funciones obtenidas de la combinación de los diferentes valores de (L,a,b) recogidos anteriormente. Mediante la representación de las dos primeras funciones discriminantes obtenemos un gráfico que representa la posición de las diferentes muestras en el espacio definido por los dos factores, definidos en función de las variables consideradas (L, a y b), de modo que visualmente representan la medida en que las citadas muestras están correctamente clasificadas. Por otra parte, la aplicación utilizada (Statgraphics Centurion XVI) proporciona el % de casos correctamente clasificados, así como las ecuaciones que permitirían clasificar una nueva muestra a partir de la medición de las variables consideradas.

En segundo lugar, se estudió la relación entre el grado de maduración y los rendimientos obtenidos, así como la composición química. Para ello, mediante el uso del *software* (Statgraphics Centurion XVI), se hizo un ANOVA, el cual se basa en un análisis de la varianza y mediante la representación en un gráfico LSD (Least Significant Difference), se observa si existen diferencias significativas para un 95% de probabilidad ( $P < 0.05$ ) entre las medias de los diferentes estados de maduración.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis discriminante (clasificación por la medida del color).

De cada una de las etapas de maduración discriminadas visualmente se separaron tres muestras de 20 frutos cada una, que serían posteriormente objeto de análisis químico para determinar la composición del aceite esencial.

En cada una de las muestras se llevó a cabo la medición de las variables  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada fruto, calculándose los valores medios para cada variable. Estos valores fueron sometidos a análisis discriminante para validar la clasificación visual inicialmente aplicada.

Tabla 6. Valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada una de las muestras de las cuatro etapas de maduración definidas

Muestra	L	a	b
D	51.35	-10.27	25.76
D	51.63	-10.46	25.82
D	53.21	-11.49	25.94
C	55.78	-5.38	29.95
C	56.16	-6.50	29.54
C	56.92	-6.78	30.04
B	57.52	1.03	31.92
B	58.25	3.16	32.88
B	55.71	5.30	31.55
A	56.79	16.42	32.99
A	56.57	16.89	32.91
A	57.11	15.65	33.06

A continuación, se procede a mostrar los resultados del análisis discriminante con la correspondiente tabla de los promedios y desviaciones estándar de cada variable para cada nivel de maduración y el gráfico de las funciones discriminantes.

Tabla 7. Resumen estadístico de medias de cada grupo

Muestra	A	B	C	D	TOTAL
RECuento	3	3	3	3	12
MEDIAS					
L	56.8233	57.16	56.2867	52.0633	55.5833
a	16.32	3.16333	-6.22	-10.74	0.630833
b	32.9867	32.1167	29.8433	25.84	30.1967
DESVIACIONES ESTD.					
L	0.271539	1.30771	0.58046	1.00286	2.27593
a	0.626019	2.135	0.74081	0.65643	10.8638
b	0.0750555	0.686464	0.266521	0.0916515	2.90517

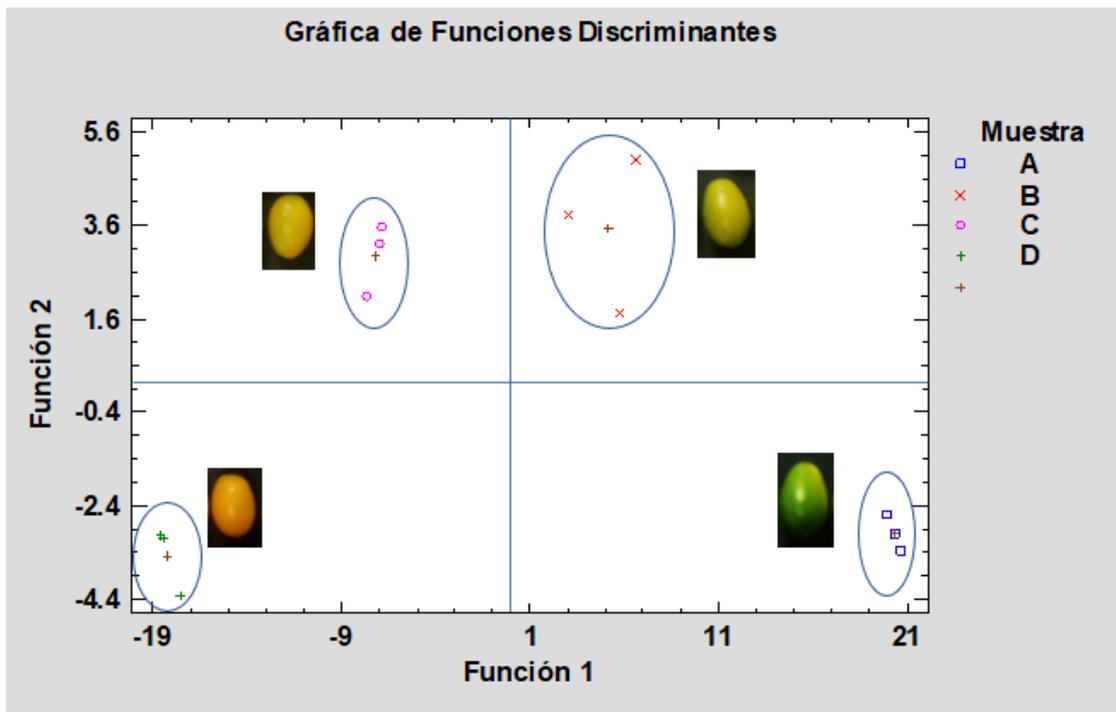


FIGURA 10. GRÁFICO DE FUNCIONES DISCRIMINANTES

Tabla 8 y 9. Funciones discriminantes y derivadas

<i>Función Discriminante</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Porcentaje Relativo de Varianza</i>	<i>Correlación Canónica</i>
1	308.363	95.04	0.99838
2	15.8997	4.90	0.96996
3	0.178468	0.06	0.38915

<i>Funciones Derivadas</i>	<i>Lambda de Wilks</i>	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>GL</i>	<i>Valor-P</i>
1	0.000162306	65.4452	9	0.0000
2	0.0502114	22.4363	4	0.0002
3	0.848559	1.2316	1	0.2671

$$F1: -6009.79 + 148.637*L + 94.4783*a + 61.5059*b$$

$$F2: -4899.71 + 116.765*L + 71.027*a + 90.223*b$$

F1: Discrimina claramente las cuatro etapas de maduración, mientras que F2 discrimina entre los grados intermedios de maduración, que alcanzan valores positivos de la función, de las etapas inicial y final (verde y anaranjado homogéneo).

El 100% de las muestras quedaron bien clasificadas (anexo) y, por tanto, la clasificación visual ha sido satisfactoria, pudiéndose emplear el resultado del análisis discriminante para clasificar nuevos individuos a partir de los valores de sus coordenadas L\*, a\* y b\*.

#### 4.2 Determinación de la humedad

A continuación, se presenta una tabla que recoge todos los datos obtenidos de la determinación de humedad por estufa de vacío.

Tabla 10. Valores medios del % de humedad para cada estado de maduración

	Peso capsula	Peso cápsula + muestra	Peso cápsula + muestra seca	Peso agua	% H	Media %H
A1	21,56	23,64	21,85	1,79	86,05769231	86,4 ± 1,02
A2	25,06	27,7	25,44	2,26	85,60606061	
A3	23,94	26,51	24,26	2,25	87,54863813	
B1	23,38	26,06	23,77	2,29	85,44776119	85,79 ± 0,49
B2	23,73	25,93	24,03	1,9	86,36363636	
B3	23,27	25,28	23,56	1,72	85,5721393	
C1	25,18	27,95	25,61	2,34	84,4765343	84,17 ± 0,30
C2	24,55	27,65	25,05	2,6	83,87096774	
C3	23,34	25,55	23,69	1,86	84,16289593	
D1	18,99	20,95	19,39	1,56	79,59183673	80,09 ± 0,59
D2	19,67	22,11	20,14	1,97	80,73770492	
D3	20,93	23,67	21,48	2,19	79,9270073	

El contenido en humedad desciende a medida que avanza la maduración del *Kumquat*, registrándose el valor más bajo para el nivel D.

#### 4.3 Rendimiento aceites esenciales

A continuación, se muestra una tabla con los rendimientos obtenidos:

Tabla 11. Rendimiento de los aceites esenciales según el estado de maduración sobre materia fresca y seca

Muestra	% Rendimiento	
	V AE / m materia fresca	V AE / m materia seca
A	1,76 ± 0,02	12,96 ± 0,91
B	1,59 ± 0,04	11,17 ± 0,13
C	1,84 ± 0,09	11,64 ± 0,38
D	1,82 ± 0,33	9,11 ± 1,42

Como podemos observar los resultados difieren según se expresen los rendimientos. El nivel D, es el que muestra un menor rendimiento de entre todos los estados de maduración expresado en base seca. Sobre el material fresco, se observa un descenso del rendimiento que luego vuelve a ascender en los últimos estadios de la maduración. Esto ocurre también en cítricos como la naranja amarga o el limón como se indica en Bourgou *et al.*, (2011).

Para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas de los rendimientos expresados tanto en base seca como húmeda, se procede la realización de un ANOVA con Statgraphics. El eje de las ordenadas, los porcentajes han sido transformados con la función  $ASENO(RAIZ(x/100))$  para proceder a su análisis estadístico, para cumplir el criterio de homocedasticidad.

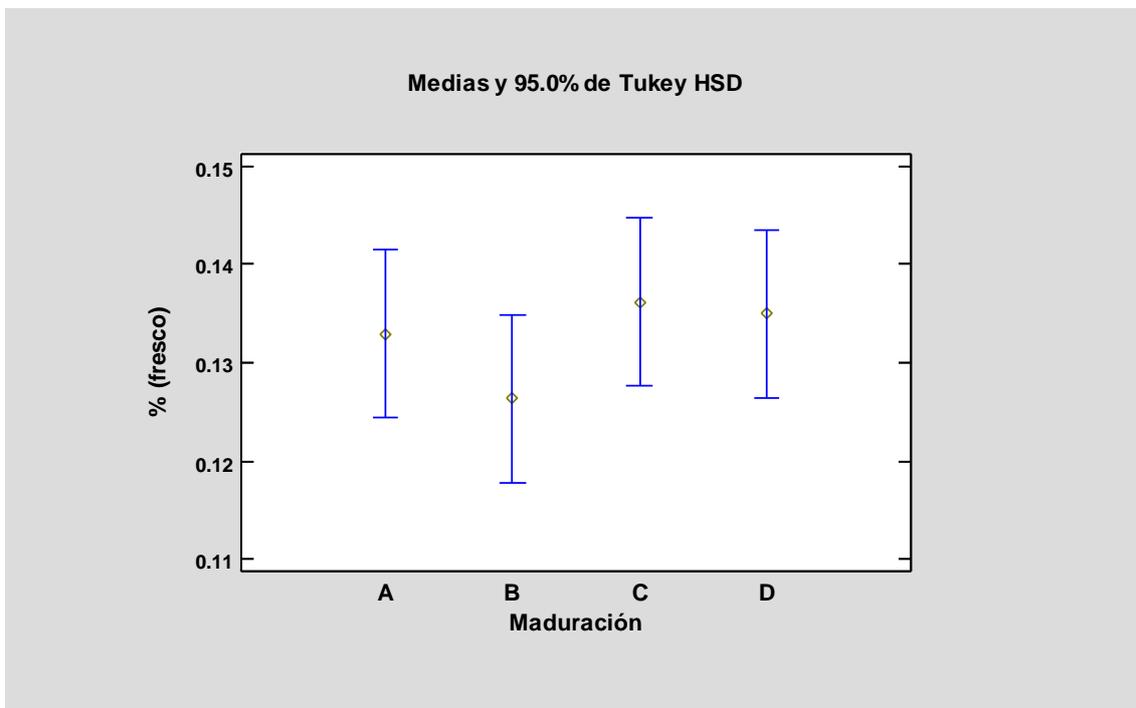


FIGURA 11. GRÁFICO RENDIMIENTOS SOBRE MATERIA FRESCA

Como podemos observar no existen diferencias significativas en los rendimientos expresados sobre materia fresca.

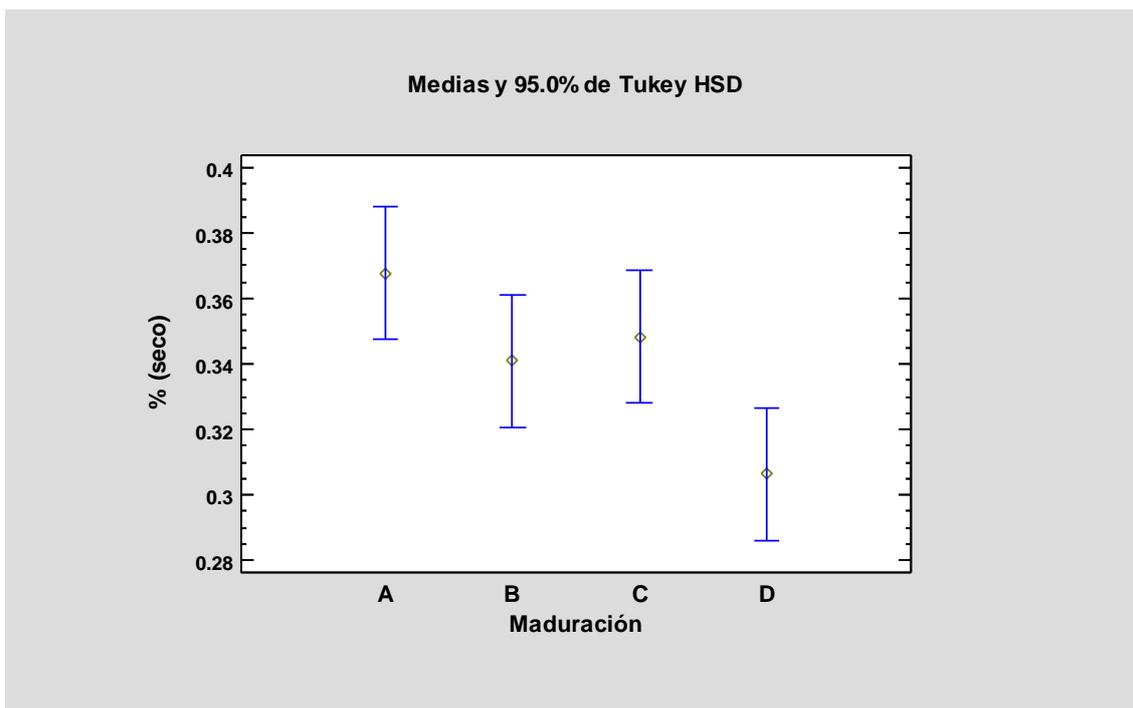


FIGURA 12. GRÁFICO RENDIMIENTOS SOBRE MATERIA SECA

Como podemos observar, existen diferencias estadísticamente significativas del nivel D respecto a los otros, los cuales son homogéneos.

#### 4.4 Composición aceites esenciales

##### 4.4.1 Cromatografía de gases

Para conocer la composición de los aceites esenciales presentes en *Fortunella margarita* (Kumquat), se utilizó un detector de espectrometría de masas debido a su elevada selectividad. Los resultados de las muestras fueron muy similares entre sí, tal como se muestra en los cromatogramas correspondientes a las distintas etapas de maduración (anexo).

Procedemos a mostrar una tabla que recoge los compuestos identificados partiendo como ejemplo de la muestra A1, la cual, pertenece al primer estadio de maduración.

Tabla 12. Composición del aceite esencial de la corteza de *Citrus Fortunella Margarita* (kumquat). Determinación por espectroscopía de masas a partir de la muestra A1

Compuesto <sup>1</sup>	LRI exp. <sup>2</sup>	LRI bib. <sup>3</sup>	% (Total ion-cromatograma)
$\alpha$ -Pino	930	932	1.52
Camfeno	943	946	t <sup>4</sup>
Sabineno	970	969	0.13
Mirceno	991	988	5.40
$\alpha$ -Felandreno	1005	1002	t
$\alpha$ -Terpineno	1015	1014	t
Limoneno	1026	1024	83.33
<i>Trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1051	1044	0.37
$\gamma$ -Terpineno	1059	1054	0.36
Terpinoleno	1087	1086	0.08
Linalool	1100	1095	0.13
Terpinen-4-ol	1177	1174	t
$\alpha$ -Terpineol	1191	1186	0.01
Acetato de octanol	1212	1211	0.04
$\delta$ -Elemeno	1333	1335	0.30
Acetato de nerilo	1365	1359	t
$\alpha$ -Copaeno	1371	1374	0.01
Acetato de geranilo	1383	1379	0.08
$\beta$ -Cubebeno	1386	1387	0.03
$\beta$ -Elemeno	1388	1389	0.10
$\beta$ -Cariofileno	1414	1417	0.03
$\beta$ -Copaeno	1425	1430	t
$\gamma$ -Elemeno	1430	1434	t
$\alpha$ -Humuleno	1449	1452	0.01
Germacreno-D	1478	1484	6.64
Biclogermacreno	1492	1500	1.07
$\alpha$ -Muurolo	1497	1500	0.01
Isodauceno	1501	1500	0.01
<i>Cis</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1504	1502	0.01
$\beta$ -Bisaboleno	1508	1505	t
$\gamma$ -Cadineno	1511	1513	0.01
$\delta$ -Cadineno	1520	1522	0.11
Germacreno B	1553	1559	0.11
<b>Total identificado</b>			99.90

1. Compuestos enumerados en orden de elución en una columna cromatográfica ZB-5
2. Índices de retención lineales determinados mediante patrones de n-alcános (C8-C30)
3. Índices de retención lineales procedentes de Adams, (2007)
4. Trazas (<0.01 %)

A continuación, se procede a mostrar un ejemplo de cromatograma de los compuestos identificados a partir del aceite extraído de la muestra A1, la cual hace referencia al estado menos maduro, cuyos frutos presentaban un color verde en su totalidad.

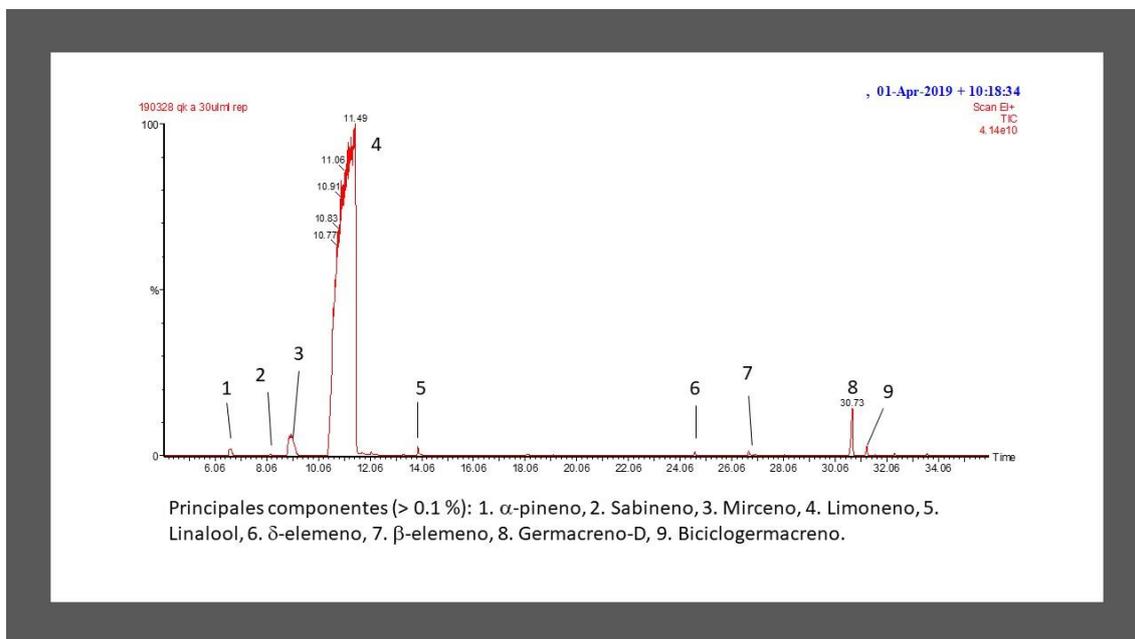


FIGURA 13. EJEMPLO DE CROMATOGRAMA (TIC: TOTAL ION CHROMATOGRAM) DE LA MUESTRA A1

Los valores cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron mediante un detector de ionización de llama a partir de las muestras de los distintos estados de maduración. Estos, se recogen en la tabla 14, donde se observan las diferencias encontradas a medida que avanza la maduración.

Tabla 13. Tabla cuantitativa resumen de los distintos estados de maduración del Kumquat obtenidos por FID (letras diferentes: a, b... en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )).

	LRI	A	B	C	D
<b><math>\alpha</math>-Pineno</b>	933	0.8 $\pm$ 0.1 a	0.9 $\pm$ 0.0 a	0.9 $\pm$ 0.1 a	0.8 $\pm$ 0.2 a
<b>Sabineno</b>	973	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0 a
<b>Mirceno</b>	990	3.8 $\pm$ 0.4 a	4.1 $\pm$ 0.1 a	4.3 $\pm$ 0.3 a	3.9 $\pm$ 0.4 a
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	1008	t	t	t	t
<b>Limoneno</b>	1031	90.5 $\pm$ 0.9 ab	90 $\pm$ 0.4 ab	89.4 $\pm$ 0.4 b	90.7 $\pm$ 0.8 a
<b><math>\gamma</math>-Terpineno</b>	1060	t	t	t	t
<b>Terpinoleno</b>	1087	t	t	t	t
<b>Monoterpenos</b>		95.2 $\pm$ 0.4 ab	95.2 $\pm$ 0.3 b	94.9 $\pm$ 0.2 b	95.7 $\pm$ 0.2 a
<b>Linalool</b>	1101	0.2 $\pm$ 0.1 a	0.2 $\pm$ 0.0 ab	0.2 $\pm$ 0.0 b	0.1 $\pm$ 0.0 c
<b>Terpinen-4-ol</b>	1182	t	t	t	t
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	1197	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0 a	0.1 $\pm$ 0.0
<b>Acetato de geranilo</b>	1380	0.3 $\pm$ 0.1 a	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0 a	0.3 $\pm$ 0.0 a

<b>Monoterpenos oxigenados</b>		0.7 ± 0.1 a	0.7 ± 0.0 a	0.6 ± 0.1 a	0.5 ± 0.0 b
<b>δ-Elemeno</b>	1336	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 b
<b>α-Copaeno</b>	1376	t	t	t	t
<b>β-Cubebeno</b>	1388	t	t	t	t
<b>β-Elemeno</b>	1390	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	t
<b>β-Cariofileno</b>	1419	t	t	t	t
<b>β-Copaeno</b>	1421	-	-	t	t
<b>γ-Elemeno</b>	1430	t	t	t	t
<b>α-Humuleno</b>	1456	t	t	t	t
<b>Germacrene D</b>	1481	2.9 ± 0.2 ab	2.9 ± 0.2 ab	3.2 ± 0.2 a	2.7 ± 0.2 b
<b>Biclogermacreno</b>	1491	t	t	t	t
<b>α-Muuroleno</b>	1495	0.3 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.3 ± 0
<b>Cis-muurolo-4(14),5-dieno</b>	1503	t	t	t	-
<b>β-Bisaboleno</b>	1507	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a
<b>γ-Cadineno</b>	1512	-	t	t	t
<b>δ-Cadineno</b>	1519	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a
<b>Germacrene B</b>	1559	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0.1
<b>Sesquiterpenos</b>		3.8 ± 0.2 ab	3.9 ± 0.2 ab	4.2 ± 0.3 a	3.5 ± 0.2 b
<b>T-Cadinol</b>	1645	t	t	t	t
<b>α-Cadinol</b>	1656	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0	0.1 ± 0.0 a
<b>Acetato de 1-octilo</b>	1213	t	t	t	t
<b>Otros</b>		t	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
<b>TOTAL CLASIFICADO</b>		99.9	99.9	99.9	99.8

- t (trazas): (<0.05 %); - (-): no detectado

Los resultados de la tabla muestran la composición del aceite esencial a medida que avanza el proceso de maduración. A partir del análisis múltiple de rangos, puede indicarse mediante letras diferentes junto a los valores de cada fila, aquellos que muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

#### **Monoterpenos:**

Los monoterpenos, globalmente, presentaron homogeneidad entre (A, B, C) y (A, D), mostrándose diferencias entre (D) y (B, C). El  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y mirceno, no mostraron tener diferencias estadísticamente significativas a medida que avanzaba la maduración, al contrario que el limoneno, el cual, presentó diferencias entre los grupos C y D, los cuales pertenecen a los grupos más maduros, registrándose el valor de la media más alto para el grupo D. Esta pauta de variación coincide con los resultados obtenidos en (Bourgou et al., 2011), donde le ocurre lo mismo en otros cítricos.

### **Monoterpenos oxigenados:**

El  $\alpha$ -Terpineol y el Acetato de geranilo no mostraron tener diferencias significativas según el grado de maduración. Por otro lado, el linalool presentó diferencias entre (A, C, D).

Las medias de los monoterpenos oxigenados se mantuvieron homogéneas hasta el estado D, cuyo valor difiere estadísticamente del resto, y siendo este el más bajo de todos. Podríamos suponer que a partir del momento cumbre de la maduración los valores de este compuesto empiezan a descender.

### **Sesquiterpenos:**

Los sesquiterpenos en conjunto, muestran diferencias entre (C y D). El  $\alpha$ -muuroleno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\delta$ -Cadineno,  $\beta$ -elemeno y el germacreno B, no presentaron diferencias estadísticamente significativas para los distintos niveles de maduración, sin embargo, el  $\delta$ -elemeno presentó diferencias el grupo más maduro (D) del resto, y el germacreno D, el cual, presenta diferencias entre los dos grupos más maduros (C y D).

Cabe indicar, por otra parte, que las variaciones observadas en los monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos, pese a ser en algún caso estadísticamente significativas, deben interpretarse teniendo en cuenta que se trata de compuestos claramente minoritarios.

#### **4.4.2 Discusión**

A la hora de contrastar los resultados de este trabajo con los de otras investigaciones, es importante precisar que existe escasa información a nivel bibliográfico sobre las variaciones en el aceite esencial estudiado, en relación con el grado de maduración. En general, tal como indican (Sicari & Poiana, 2017), los compuestos mayoritarios para *Fortunella Margarita*, son los hidrocarburos monoterpénicos, debido al elevado contenido en limoneno sea cual sea el método de extracción (hidrodestilación, solvente, CO<sub>2</sub> supercrítico), en este caso, la hidrodestilación, lo cual concuerda claramente con los resultados de este trabajo. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran también una clara similitud como los descritos por Fitsiou *et al.*, (2016). En el presente trabajo, compuestos minoritarios como son el biciclogermacreno y el  $\delta$ -germacreno, no están presentes o tan solo a nivel de traza.

Comparando los resultados con los de otras especies (Sutour *et al.*, 2015), en todos los casos, el limoneno es el compuesto mayoritario por excelencia y tan solo se ven afectados compuestos minoritarios en poca medida. El único compuesto que muestra diferencias relevantes es el mirceno para *Fortunella Crasifolia*, el cual está presente en mucha más cantidad que en *Fortunella Margarita*, tanto en nuestro caso como en los citados en la bibliografía.

Si se compara la composición del aceite esencial procedente de la corteza con el obtenido a partir de las hojas, se observa una clara diferencia tanto cualitativa como cuantitativamente. De acuerdo con Quijano y Pino, (2009), el contenido en germacreno D y linalool es significativamente más elevado en las hojas frente a la corteza del Kumquat, además de encontrarse compuestos como el  $\beta$ -pineno y algunos sesquiterpenos oxigenados como  $\gamma$ -eudesmol,  $\gamma$ -elemol,  $\beta$ -eudesmol, los cuales corresponden a los compuestos mayoritarios en estas, no estando presentes en la piel o tan solo a nivel de traza.

## 5. CONCLUSIONES

- El método físico para clasificación de color empleado ha dado resultados satisfactorios validando la clasificación visual hecha previamente. De este modo, ha permitido determinar objetivamente cada nivel de estado de maduración. El análisis discriminante aplicado puede ser útil en posteriores trabajos para seleccionar muestras que posean ciertas características de interés atendiendo a su composición.
- La composición de los aceites esenciales se mantiene notablemente estable entre los diferentes estados de maduración, aunque se encuentran ligeros cambios como es en el caso del limoneno. La presencia de compuestos como los sesquiterpenos oxigenados, aún en muy pequeña proporción, es de especial interés debido a las propiedades sensoriales que le aportan al aceite.
- El limoneno es el compuesto predominante por excelencia, registrándose el valor más alto en el último estado de maduración, a pesar de que sufre un ligero descenso en el estado anterior a este. Esta evolución concuerda con la descrita en otras investigaciones.

El rendimiento obtenido sobre materia seca es más elevado que el obtenido sobre producto fresco, debido obviamente a la menor proporción de agua. Por otra parte, su evolución con la maduración registra un descenso significativo entre el primer y el último estadio de maduración, de manera que puede afirmarse que el mayor rendimiento corresponde a los primeros estadios de esta, es decir, cuando los frutos son en su totalidad verdes.

- Este resultado puede ser de interés si se considera la posibilidad de utilizar el material seco y triturado como punto de partida para la extracción del aceite esencial. Este modo de proceder implica, por otra parte, la necesidad de realizar nuevos estudios para determinar la influencia de diferentes métodos de secado en el rendimiento y composición de los aceites obtenidos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ANCILLO,G; MEDINA,A. (2015). *Monografías botánicas, los cítricos*. Ed. Jardín botánico universidad de Valencia)
- ABDELHADY, M. I., & ALY, H. A. (2012). Antioxidant antimicrobial activities of callistemon comboyensis essential oil. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(1), 37-41.
- ADAMS, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- ADEBISI, O. (2014). Comparative study of essential oil composition of fresh and dry peel and seed of Citrus sinensis (L) Osbeck var shamuti and Citrus Paradise Macfadyen var Marsh. *Ife Journal of Science*, 16(2), 211-217.
- ALLAM, M., KHEDR, A. A., & BELTAGY, A. (2015). Kumquat As A Potent Natural Material To Improve Lipid Profile Of Hypercholestromic Rats. *Biolife An International Quarterly Journal of Biology and Life Sciences*, 3(1), 171-181.
- BOUNATIROU, S., SMITI, S., MIGUEL, M. G., FALEIRO, L., REJEB, M. N., NEFFATI, M., ... & PEDRO, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155.
- BOURGOU, S., RAHALI, F. Z., OURGHEMMI, I., & SAÏDANI TOUNSI, M. (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, 2012.
- BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., & ANACKOV, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1822-1828.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- CARBONNEL, F. (1999). Naturalmente esencial. *Introducción a la Aromaterapia Ed. Martorell, Barcelona*, 81-83.
- DI RAUSO SIMEONE, G., DI MATTEO, A., RAO, M. A., & DI VAIO, C. (2020). Variations of peel essential oils during fruit ripening in four lemon (Citrus limon (L.) Burm. F.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 193-200.
- FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., & SCHEFFER, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.
- FITSIOU, E., MITROPOULOU, G., SPYRIDOPOULOU, K., TIPTIRI-KOURPETI, A., VAMVAKIAS, M., BARDOUKI, H., ... & PAPPA, A. (2016). Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the Greek aromatic plant species Ocimum basilicum, Mentha spicata, Pimpinella anisum and Fortunella margarita. *Molecules*, 21(8), 1069.

- GIMÉNEZ, B., RONCALÉS, P., & BELTRÁN, J. A. (2004). The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilt-head sea bream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1053-1060.
- GUENTHER, E., & ALTHAUSEN, D. (1948). *The essential oils* (Vol. 1, p. 774). New York: Van Nostrand.
- GUIGNARD, J. L., HENRY (M.), & COSSON, L. (1985). *Abrégé de phytochimie*. Masson, , Paris-New York-Barcelone, 1985, Capítulo 8.
- JAYAPRAKASHA, G. K., MURTHY, K. C., ETLINGER, M., MANTUR, S. M., & PATIL, B. S. (2012). Radical scavenging capacities and inhibition of human prostate (LNCaP) cell proliferation by *Fortunella margarita*. *Food chemistry*, 131(1), 184-191.
- JAYAPRAKASHA, G. K., MURTHY, K. N. C., DEMARAIS, R., & PATIL, B. S. (2012). Inhibition of prostate cancer (LNCaP) cell proliferation by volatile components from Nagami kumquats. *Planta medica*, 78(10), 974-980.
- KAMAL, G. M., ANWAR, F., HUSSAIN, A. I., SARRI, N., & ASHRAF, M. Y. (2011). Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, 18(4), 1275.
- KOKOSKA, L., POLESNY, Z., RADA, V., NEPOVIM, A., & VANEK, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 82(1), 51-53.
- KRESS, W. J. (1983). Crossability barriers in neotropical *Heliconia*. *Annals of Botany*, 52(2), 131-147.
- KUBECZKA, K.H. (2015). Hystori and Sources of Essential Oils Research, en: Hüsünü, C. B., & Buchbauer, G. Eds. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications.*, (Ed. 2). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- KUMAMOTO, H., MATSUBARA, Y., IIZUKA, Y., OKAMOTO, K., & YOKOI, K. (1985). Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in kinkan (*Fortunella japonica*) peelings. *Agricultural and biological chemistry*, 49(9), 2613-2618.
- LEE, S. H., PARK, H. J., BACK, O. H., CHUN, H. K., RHIE, S. G., & LEE, G. S. (2005). Comparison of the nutritional composition of 3 kinds of citrus produced on Jeju island, Korea. *The Korean Journal of Community Living Science*, 16(1), 15-20.
- LIU, X., LIU, B., JIANG, D., ZHU, S., SHEN, W., YU, X., ... & ZHAO, X. (2019). The accumulation and composition of essential oil in kumquat peel. *Scientia Horticulturae*, 252, 121-129.
- LLORENS-MOLINA, J. A., YGUERAVIDE, B., & VACAS, S. (2019). Essential oil composition of berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* according to their ripening stage. *Journal of Essential Oil Research*, 31(4), 276-285.
- MITROPOULOU, G., BARDOUKI, H., VAMVAKIAS, M., PANAS, P., PARASKEUAS, P., RANGOU, A., & KOURKOUTAS, Y. (2018). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Fortunella margarita* essential oils against *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* in fruit juices. *Journal of Biotechnology*, 280, S62-S63.

- OKOH, O. O., SADIMENKO, A. P., & AFOLAYAN, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food chemistry*, 120(1), 308-312.
- OLATUNYA, A. M., & AKINTAYO, E. T. (2017). Evaluation of the effect of drying on the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of peels from three species of citrus group. *International Food Research Journal*, 24(5), 1991-1997.
- QUIJANO, C. E., & PINO, J. A. (2009). Volatile compounds of kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle) leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3), 194-196.
- SICARI, V., & POIANA, M. (2017). Comparison of the volatile component of the essential oil of kumquat (*Fortunella margarita* swingle) extracted by supercritical carbon dioxide, hydrodistillation and conventional solvent extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(1), 87-94.
- SMITH, P. M. (1972). Serology and species relationships in annual bromes (*Bromus* L. sect. *Bromus*). *Annals of botany*, 36(1), 1-30.
- STASHENKO, E. (1996) In: *Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica*, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, febrero de 1996, pp. 29-53
- SUTOUR, S., LURO, F., BRADESI, P., CASANOVA, J., & TOMI, F. (2016). Chemical Composition of the Fruit Oils of Five *Fortunella* Species Grown in the Same Pedoclimatic Conditions in Corsica (France). *Natural Product Communications*, 11(2), 1934578X1601100231.
- SWINGLE WT, REECE PC (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. *The Citrus Industry*: University of California, Berkeley. 1: 190–430.
- SWINGLE, W. T. (1915). A new genus, *Fortunella*, comprising four species of kumquat oranges. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 5(5), 165-176.
- TANAKA, T. (1933). General remarks on the genus *Fortunella*, (2). *Stud. Citrol.* 6: 19–40.
- THODAY, D. (1925). The geographical distribution and ecology of passerine. *Ann. Bot.* 39: 175–208.
- VELDHUIZEN, E. J., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J. L., ZWEIJTZER, C., BURT, S. A., & HAAGSMAN, H. P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1874-1879.
- WANG, Y. W., ZENG, W. C., XU, P. Y., LAN, Y. J., ZHU, R. X., ZHONG, K., ... & GAO, H. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) peel. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3382-3393.
- WEBBER, H. J. (1967). History and development of the citrus industry. *The citrus industry*, 1-37.
- YASUDA, K., YAHATA, M., & KUNITAKE, H. (2015). Phylogeny and classification of kumquats (*Fortunella* spp.) inferred from CMA karyotype composition. *The Horticulture Journal*, MI-078.

YIN-MIN, Y. (1985). The status of *Fortunella* genetic resources in China. *Fruit Varieties J.* **39**: 17–20.

ZINOVIADOU, K. G., KOUTSOUMANIS, K. P., & BILIADERIS, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, *82*(3), 338-345.

## 7. ANEXOS

### Anexo1. Análisis discriminante (clasificación para el color).

De cada una de las etapas de maduración discriminadas visualmente se separaron tres muestras de 20 frutos cada una, que serían posteriormente objeto de análisis químico para determinar la composición del aceite esencial.

En cada una de las muestras se llevó a cabo la medición de las variables  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada fruto, calculándose los valores medios para cada variable. Estos valores fueron sometidos a análisis discriminante para validar la clasificación visual inicialmente aplicada.

Tabla: Valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada una de las muestras de las cuatro etapas de maduración definidas.

Muestra	L	a	b
D	51.35	-10.27	25.76
D	51.63	-10.46	25.82
D	53.21	-11.49	25.94
C	55.78	-5.38	29.95
C	56.16	-6.50	29.54
C	56.92	-6.78	30.04
B	57.52	1.03	31.92
B	58.25	3.16	32.88
B	55.71	5.30	31.55
A	56.79	16.42	32.99
A	56.57	16.89	32.91
A	57.11	15.65	33.06

Resultados del análisis discriminante:

#### Análisis Discriminante

Variable de clasificación: Muestra

Variabes independientes:

L  
 $a^*$   
 $b^*$

Número de casos completos: 12

Número de grupos: 4

<i>Función Discriminante</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Porcentaje Relativo de Varianza</i>	<i>Correlación Canónica</i>
1	308.363	95.04	0.99838
2	15.8997	4.90	0.96996
3	0.178468	0.06	0.38915

<b>Funciones Derivadas</b>	<b>Lambda de Wilks</b>	<b>Chi-Cuadrada</b>	<b>GL</b>	<b>Valor-P</b>
1	0.000162306	65.4452	9	0.0000
2	0.0502114	22.4363	4	0.0002
3	0.848559	1.2316	1	0.2671

### El StatAdvisor

Este procedimiento está diseñado para desarrollar un conjunto de funciones discriminantes el cual puede ayudar a predecir Muestra con base en los valores de otras variables cuantitativas. 12 casos fueron utilizados para desarrollar un modelo que discrimine entre los 4 niveles de Muestra. 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.

### Coeficientes de la Función de Clasificación para Muestra

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>L</b>	148.637	116.765	103.094	97.8022
<b>a</b>	94.4783	71.027	57.103	49.1637
<b>b</b>	61.5059	90.2231	85.6139	59.2161
<b>CONSTANTE</b>	-6009.79	-4899.71	-4002.69	-3048.4

### El StatAdvisor

Esta ventana muestra las funciones usadas para clasificar observaciones. Hay una función para cada uno de los 4 niveles de Muestra. Por ejemplo, la función usada para el primer nivel de Muestra es

$$F1: -6009.79 + 148.637*L + 94.4783*a + 61.5059*b$$

$$F2: -4899.71 + 116.765*L + 71.027*a + 90.223*b$$

Se utilizan estas funciones para predecir a que nivel de Muestra pertenecen las nuevas observaciones. Para mayores detalles, seleccione Tabla de Clasificación de la lista de Opciones Tabulares.

### Tabla de Clasificación

<b>Actual Muestra</b>	<b>Tamaño de Grupo</b>	<b>Muestra/Predicho</b>			
		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>A</b>	3	3	0	0	0
		(100.00%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
<b>B</b>	3	0	3	0	0
		(0.00%)	(100.00%)	(0.00%)	(0.00%)
<b>C</b>	3	0	0	3	0
		(0.00%)	(0.00%)	(100.00%)	(0.00%)
<b>D</b>	3	0	0	0	3
		(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)	(100.00%)

Porcentaje de casos correctamente clasificados: 100.00%

<b>Grupo</b>	<b>Probabilidad Previa</b>
1	0.2500
2	0.2500
3	0.2500
4	0.2500

<b>Fila</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Grupo Actual</b>	<b>Grupo Más Alto</b>	<b>Valor Más Alto</b>	<b>Distancia Cuadrada</b>	<b>Prob.</b>	<b>2° Grupo Más Alto</b>	<b>2° Valor Más Alto</b>	<b>Distancia Cuadrada</b>	<b>Prob.</b>
1	D	D	D	2994.24	1.47602	1.0000	C	2910.13	169.697	0.0000
2	D	D	D	3015.83	0.713104	1.0000	C	2933.28	165.82	0.0000
3	D	D	D	3126.83	4.22723	1.0000	C	3047.62	162.634	0.0000
4	C	C	C	4004.79	1.41628	1.0000	B	3933.51	143.967	0.0000
5	C	C	C	3944.9	1.09685	1.0000	D	3873.85	143.207	0.0000
6	C	C	C	4050.07	0.523646	1.0000	B	3975.3	150.061	0.0000
7	B	B	B	4769.7	4.6771	1.0000	C	4718.86	106.371	0.0000
8	B	B	B	5092.85	4.50542	1.0000	C	4997.93	194.326	0.0000
9	B	B	B	4828.26	4.68596	1.0000	C	4744.41	172.389	0.0000
10	A	A	A	6011.71	0.00786209	1.0000	B	5874.11	275.208	0.0000
11	A	A	A	6018.5	0.292584	1.0000	B	5874.59	288.108	0.0000
12	A	A	A	5990.83	0.377939	1.0000	B	5863.1	255.841	0.0000

\* = 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 12 observaciones empleadas para ajustar el modelo, así como para cualquier nueva observación. Por ejemplo, la fila 1 tuvo la calificación más alta para Muestra = D y la segunda más alta para Muestra = C. De hecho, el valor verdadero de Muestra era D. Entre las 12 observaciones empleadas para ajustar el modelo, 12, 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 Muestra en blanco.

## Anexo 2. Cromatogramas (MS).

