

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**Análisis por métodos espectroscópicos y estudio del proceso
de envejecimiento de aceites esenciales de cítricos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pedro Carmona Hernández

Madrid, 2015

INSTITUTO DE OPTICA
"DAZA DE VALDES"
C. S. I. C.
MADRID

T1
S44
CAR



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326699310

**ANALISIS POR METODOS ESPECTROSCOPICOS Y ESTUDIO DEL PROCESO
DE ENVEJECIMIENTO DE ACEITES ESENCIALES DE CITRICOS**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro 33969

b 240.33x
C375838S2

*Memoria presentada por
PEDRO CARMONA HERNANDEZ
para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas*

Madrid, diciembre 1973

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se ha efectuado en el Laboratorio de Espectroscopía Molecular del Instituto de Optica "Daza de Valdés", del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Debo expresar mi gratitud a la Dra. Bellanato por la dirección de este trabajo y sus continuas orientaciones durante la realización del mismo.

Al Dr. Antonio Hidalgo, que sugirió el tema y me aconsejó durante su realización.

Asimismo debo gratitud al Prof. Dr. J. Morcillo, por haber aceptado ser ponente de esta tesis.

Al Dr. S. Terol, que me auxilió en la parte de Espectrofluorimetría, y al Dr. L. Plaza, Director del Instituto de Optica, por las facilidades encontradas en sus laboratorios.

Quiero además expresar mi agradecimiento a los doctores M. Dabrio y J. Calderón, del Centro Nacional de Química Orgánica, por su ayuda en la realización de los espectros de masas, y al Dr. J. Serratosa, del Instituto de Edafología y Biología Vegetal, por haber puesto a mi disposición el cromatógrafo de gases.

S U M A R I O

1. INTRODUCCION. JUSTIFICACION DE ESTE TRABAJO.....	1
Técnicas analíticas utilizadas. Antecedentes.....	4
2. PARTE EXPERIMENTAL.	
Aceites esenciales estudiados.....	11
Técnicas analíticas utilizadas:	
Espectroscopía de absorción infrarroja.....	21
Cromatografía en columna.....	32
Cromatografía de gases.....	36
Cromatografía de gases-Espectrometría de masas	40
Espectroscopía ultravioleta.....	42
Espectrofluorimetría.....	43
Métodos utilizados en el envejecimiento de las muestras.....	46
3. RESULTADOS.	
3, 1. ACEITE ESENCIAL DE NARANJA.	
Antecedentes bibliográficos: composición química..	47
Análisis de aceites esenciales de naranja. Varia- ción de la composición química con el área geográ- fica de cultivo.....	52
Análisis infrarrojo de los aceites sin fraccio nar.....	52

Determinación cuantitativa de limoneno. Conte <u>nido</u> relativo aldehidos/limoneno.....	58
Fraccionamiento por cromatografía en columna.	62
Análisis infrarrojo de las fracciones cromato <u>gráficas</u>	64
Cromatografía de gases de la fracción n-hexa- no-acetato de etilo.....	78
Determinación por espectrofluorimetría del an <u>tranilato</u> de metilo en aceites esenciales de naranja.....	81
Envejecimiento del aceite esencial de naranja.	
Antecedentes.....	83
Envejecimiento por acción de la luz ultravio- leta.....	84
Envejecimiento por acción del calor.....	84
Cromatografía de gases de las fracciones del aceite envejecido.....	90
Cromatografía de gases-Espectrometría de ma- sas del aceite envejecido.....	93
Mecanismo del proceso de envejecimiento.....	99
Estabilidad frente a los factores que origi- nan el envejecimiento.....	104
 3, 2. ACEITE ESENCIAL DE LIMON.	
Antecedentes bibliográficos: composición química.	107

Análisis de aceites esenciales de limón. Variación de la composición química con el método de extracción y el área geográfica de cultivo.....	111
Análisis infrarrojo de aceites sin fraccionar.....	111
Determinación semicuantitativa de cumarinas...	121
Determinación cuantitativa de citral.....	123
Valoración de β -pineno y limoneno.....	129
Determinación semicuantitativa de alcoholes...	133
Fraccionamiento por cromatografía en columna..	135
Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.....	137
Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.....	153
Determinación semicuantitativa de cumarinas por espectrofluorimetría.....	157
Estudio de esencias sintéticas.....	159
Envejecimiento del aceite esencial de limón.	
Antecedentes.....	165
Envejecimiento natural.....	166
Envejecimiento por acción de la luz ultravioleta.....	168
Envejecimiento por acción del calor.....	169
Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo del aceite envejecido.....	181
Mecanismo del proceso de envejecimiento.....	183

Estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento.....	187
Control del envejecimiento por espectroscopía infrarroja y determinación cuantitativa de p-cimeno.....	190
3, 3. ACEITE ESENCIAL DE BERGAMOTA.	
Antecedentes bibliográficos: composición química.....	195
Análisis de aceites esenciales de bergamota. <u>V</u> ariación de la composición química con el área geográfica de cultivo.....	197
Análisis infrarrojo de aceites sin fraccionar.....	197
Determinación cuantitativa de acetato de <u>l</u> inalilo, linalol y limoneno.....	204
Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	209
Análisis infrarrojo de las fracciones <u>c</u> romatográficas.....	211
Cromatografía de gases de la fracción <u>o</u> xigenada.....	229
Determinación semicuantitativa de cumarinas por espectroscopía ultravioleta.....	235
Estudio de esencias sintéticas.....	237

Envejecimiento del aceite esencial de bergamota.	
Antecedentes.....	243
Productos de oxidación. Residuos sedimentables.....	243
Estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento.....	245

3, 4. ACEITE ESENCIAL DE MANDARINA.

Antecedentes bibliográficos: composición química	249
Análisis de aceites esenciales de mandarina. Variación de la composición química con el área geográfica de cultivo.....	251
Análisis infrarrojo de los aceites sin fraccionar.....	251
Determinación cuantitativa de N-metil antranilato de metilo por espectroscopía infrarroja.....	257
Determinación cuantitativa de N-metil antranilato de metilo por espectrofluorimetría....	259
Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.....	262

Envejecimiento del aceite esencial de mandarina.	
Antecedentes.....	275
Envejecimiento por acción de la luz ultravioleta.....	275
Envejecimiento por acción del calor.....	275

Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.....	278
Mecanismo del proceso de envejecimiento.....	278
4. CONCLUSIONES	283
5. BIBLIOGRAFIA	291

1. INTRODUCCION. JUSTIFICACION DE ESTE TRABAJO.

Desde el punto de vista de la producción de plantas aromáticas destaca España, entre otros países, por la diversidad, riqueza y finura de los aceites esenciales contenidos en su flora.

En este aspecto, ocupan un lugar importante las esencias derivadas de los cítricos, cuyo volumen de producción ha experimentado un notable desarrollo en los últimos años.

Por consiguiente, parece lógico suponer que esta fuente de riqueza debería estar bien conocida y estudiada. Sin embargo, no sucede así y, a excepción de algunos trabajos parciales (1), (2), (3), (4), no existe ningún estudio de conjunto que se ocupe de una manera sistemática de la composición química de las esencias de los cítricos en relación con las diferentes áreas geográficas de cultivo y métodos de extracción.

El contenido relativo de los componentes de las esencias es un índice de calidad de las mismas y, además, cobra especial interés si se tiene en cuenta que estos aceites esenciales son en muchos casos primera materia para la obtención de especies químicas puras que tienen especial aplicación en numerosas industrias. Las técnicas de análisis instrumental empleadas en este trabajo permiten, relacionándolas convenientemente, un análisis rápido, fácil y seguro de los aceites esenciales.

En un mercado competitivo, tal como el de las esencias, es fundamental que los productos que se ofrecen presenten una calidad al menos normalizada. En este aspecto, se pueden señalar las frecuentes adulteraciones de los aceites naturales y la sustitución de éstos por sus sucedáneos sintéticos. Estos últimos, considerados en su totalidad, cumplen las especificaciones analíticas requeridas (5). Constituye, pues, un capítulo de nuestro trabajo el estudio de los procedimientos analíticos que nos permitan detectar los aceites esenciales producidos sintéticamente.

Por otra parte, un factor asociado a la calidad de las esencias, en general, es su estabilidad frente al proceso de envejecimiento. En efecto, es de sobra conocido que los aceites esenciales sufren con el tiempo transformaciones químicas de oxidación, polimerización, etc., que hacen disminuir sensiblemente su calidad. Con buenas condiciones de almacenamiento se atenúa, pero no se elimina, este proceso que, aún producido en pequeño grado, se acusa notablemente por las propiedades aromáticas de los productos de oxidación (6).

Un conocimiento detallado del mecanismo de envejecimiento contribuiría al hallazgo de la solución más adecuada para la conservación de estos materiales. Por ello, hemos considerado de importancia dedicar una parte de este trabajo a profundizar en el proceso de envejecimiento bajo un triple punto de vista:

a) Identificación de los productos de envejecimiento y de las especies químicas más lábiles que fundamentalmente los originan, así como el mecanismo de dichas transformaciones.

b) Determinación de los componentes más estables y de aquellos de naturaleza antioxidante que contribuyen a la estabilidad de los aceites.

c) Estudio comparativo de aceites esenciales de cítricos, de diferente procedencia geográfica y método de obtención, respecto a su estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento.

TECNICAS ANALITICAS UTILIZADAS. ANTECEDENTES.

Antes de la aparición de las técnicas analíticas instrumentales, se realizaba el análisis de las esencias siguiendo los métodos de determinación de constantes físicas y los llamados métodos húmedos que implican una reacción química (1).

Los métodos de determinación de constantes físicas, los de detección de funciones químicas y los métodos clásicos de análisis, en general, no son siempre adecuados por su falta de especificidad.

Esto no quiere decir que no se haya podido establecer un buen control de la calidad de los aceites, cuando tales determinaciones han sido acompañadas de las pruebas odoríferas, no fáciles de realizar si no es por personal muy especializado.

Los métodos instrumentales modernos, por su especificidad y rapidez dan un impulso notable al conocimiento de las esencias naturales y sustituirán, casi totalmente, a las determinaciones clásicas para detectar posibles adulteraciones y para identificar y valorar con seguridad cada uno de los componentes.

Espectroscopía de absorción infrarroja.

Existe un cierto número de publicaciones en las que la espectroscopía infrarroja ha sido utilizada en el estudio de los aceites esenciales de agrios, pero ninguno de ellos constituye un trabajo sistemático y completo, y mucho menos en lo que se refiere a aceites de origen español. Además, en otros ca-

Los limitaciones instrumentales han obligado a considerar zonas espectrales estrechas y generalmente se utilizaron aparatos de prisma de cloruro sódico que carecen de buena resolución en determinadas regiones espectrales.

Entre los trabajos consultados merecen citarse el de Theile y colaboradores (7), que recurrieron a la espectroscopía infrarroja para detectar la adición de terpenos en la esencia de bergamota; el estudio de aceites esenciales de limón y de sus residuos obtenidos por destilación a vacío por Casu y Reggiani (8) y el de Slater (9), que detectó adulteraciones en las esencias de limón sicilianas.

Pennisi y Di Giacomo (10) registraron los espectros infrarrojos de esencias de limón italiano de diferentes plantaciones, recolectadas en el curso de los años 1964-1967.

Rogers (6) utilizó la espectroscopía infrarroja para determinar el grado de envejecimiento de la esencia de naranja.

Recientemente, J. Bellanato y A. Hidalgo (11) han registrado en un instrumento de red los aceites esenciales de limón, naranja, mandarina y bergamota identificando algunos componentes más e indicando métodos analíticos cuantitativos o semicuantitativos.

Cuando, como ocurre en el caso de los aceites esenciales de los agrios, existe un componente mayoritario, el espectro de éste en los de las esencias totales enmascara y

hace difícilmente identificables las bandas de absorción ca racterísticas de los componentes minoritarios. Por esta razón, un fraccionamiento previo por cromatografía en columna, tal como el que hemos realizado en este trabajo y discutimos más adelante, permite, por la consideración de los espectros infrarrojos de las fracciones obtenidas, un análisis más pre ciso.

Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna, como método de fracciona- miento, casi ha desplazado a la destilación a vacío, debido a que esta última produce, en general, efectos destructivos en los componentes de las esencias (1).

En relación con esta técnica, se reseña en la bibliogra- fía una gran variedad de métodos que se caracterizan por la naturaleza del soporte sólido y los disolventes empleados en la elución (12).

Kirchner y Miller (13) fueron los pioneros en poner a pun to un método para la preparación de aceites esenciales deste rpenados. Utilizando como soporte gel de sílice, los hidrocar- buros terpénicos eran arrastrados con n-hexano y los compues- tos oxigenados con acetato de etilo. Este procedimiento, mo- dificado según se indica más adelante, es el que hemos segu i do para el fraccionamiento de los aceites esenciales conside rados en este trabajo.

Cromatografía de gases.

La cromatografía gas-líquido realiza una separación de las especies químicas componentes de una mezcla, por la distinta capacidad que tiene cada una de ellas para ser retenida por la fase estacionaria y arrastrada por la fase móvil. Es esta una de las técnicas más empleadas en el análisis cuali y cuantitativo de los aceites esenciales y en la bibliografía se describen numerosos métodos que se caracterizan por la naturaleza de la fase estacionaria y relleno de la columna, dimensiones de la misma, gas portador y condiciones termodinámicas (12).

Para determinar los componentes no identificados por espectroscopía infrarroja en unos casos, o para comprobar resultados en otros, hemos recurrido a la utilización de la cromatografía en fase de vapor en el análisis de algunos aceites completos y de las fracciones volátiles obtenidas por cromatografía en columna.

El parámetro que corresponde a la retención de una sustancia puede no ser exclusivo de ésta, sobre todo cuando el número de componentes a analizar es elevado. De ahí que surja la necesidad de utilizar varias fases estacionarias o diferentes condiciones termodinámicas para hacer más segura la identificación de un compuesto, lo que hace relativamente lento el uso de la cromatografía en fase de vapor.

Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

La cromatografía de gases asociada a la espectrometría de masas permite conocer si el espectro de cada pico cromatográfico corresponde o no a una sustancia solamente, además de ayudar a su identificación.

Esta técnica analítica, que se ha aplicado en algunos casos a los aceites esenciales (12), (14), ha sido empleada por nosotros en la identificación de los productos oxigenados que se forman en el proceso de envejecimiento del aceite esencial de naranja. Este último aceite ofrece la ventaja, sobre el de las demás especies estudiadas, de que la cantidad de productos oxigenados propios del aceite fresco es muy pequeña y, por tanto, no interfieren en la identificación de los productos oxigenados que se forman en el aceite envejecido.

Los productos de oxidación derivados del limoneno que hemos identificado en el aceite esencial de naranja envejecido, los hemos hecho tentativamente extensibles a las cuatro especies de aceites estudiados, ya que todos estos contienen limoneno y, cuando están oxidados, presentan en los correspondientes cromatogramas los mismos tiempos de retención para los picos fundamentales que aumentan en el envejecimiento.

Espectroscopía ultravioleta.

En los aceites esenciales derivados de los cítricos existen productos cumarínicos y flavonas que presentan bandas características a 325 nm, correspondientes a una transición de $n \rightarrow \pi^*$ (15). Si bien estas bandas, por su anchura, no son muy útiles para identificar los mencionados productos en los aceites totales, sí son adecuadas para realizar determinaciones semicuantitativas y dar con ello unos valores proporcionales a su concentración, que suele ser alrededor del 0.4 % (16) y, por tanto, no adecuada para ser medida con precisión por espectroscopía infrarroja.

La espectroscopía ultravioleta ha sido utilizada por Navarro Albaladejo (4) y otros autores (12) para determinar las características de los aceites esenciales de limón extraídos por diversos procedimientos, así como para detectar adulteraciones por adición de terpenos.

En nuestro trabajo, hemos aplicado esta técnica para determinar semicuantitativamente el contenido en cumarinas y flavonas en aceites esenciales de bergamota y naranja respectivamente, con cuyos resultados se puede explicar, como se indica más adelante, la estabilidad de las distintas muestras de aceites frente a los factores que originan el envejecimiento.

Espectrofluorimetría.

La espectrofluorimetría ha sido utilizada recientemente para el estudio comparativo de aceites de limón y naranja cultivados en distintas regiones de los Estados Unidos (17), (18), considerando las intensidades de fluorescencia de estos aceites. Asimismo ha sido empleada como método de detección de adulteraciones en aceites esenciales de mandarina (19), y en combinación con la cromatografía en columna, para la identificación de los componentes fluorescentes que existen en el aceite de lima (20).

En este trabajo hemos utilizado la espectrofluorimetría para determinar pequeñas cantidades (indicios) de antranilato de metilo en el aceite esencial de naranja, ya que, entre otros productos, es el que determina su calidad y, dada su pequeña concentración en la esencia, no es detectable por otras técnicas analíticas. Por otro lado, hemos determinado cumarinas en aceites de limón y confirmado las determinaciones cuantitativas del N-metil antranilato de metilo en aceites esenciales de mandarina realizadas por espectroscopía infrarroja.

2. PARTE EXPERIMENTAL

ACEITES ESENCIALES ESTUDIADOS.

Los aceites esenciales considerados en este trabajo son líquidos viscosos extraídos de la corteza del fruto. Químicamente están constituidos por mezclas muy complejas, ya que la cromatografía de gases muestra normalmente la existencia de 30 a 50 componentes, sobrepasando la centena cuando se extremen la sensibilidad y la resolución instrumental. El porcentaje en el que se encuentran los componentes de los aceites esenciales comprende muchos órdenes de magnitud: desde ser uno solo el componente fundamental en porcentaje superior al 60 %, hasta alcanzar concentraciones de trazas, detectables actualmente gracias a separaciones y concentraciones previas y a la extraordinaria sensibilidad de las técnicas modernas de análisis.

1) Aceite esencial de naranja.

Se obtiene de la piel del fruto de Citrus Aurantium Risso. Las zonas principales de producción comprenden fundamentalmente Italia, California, Florida, Israel, Brasil y España. En nuestro país la región más importante es Valencia, cuyos aceites son los más cotizados. El considerable desarrollo que está experimentando la producción de Murcia y Sevilla nos ha llevado al estudio de los aceites de naranja cultivada en estas zonas.

La mayor parte de las muestras de esta esencia consideradas en nuestro trabajo han sido obtenidas por el procedimiento

to denominado expresión, que consiste en someter adecuadamente a compresión mecánica las cáscaras del fruto para que se libere la esencia por ruptura de las glándulas o bolsas donde está almacenada. Este, junto con el método de raspado, son los procedimientos más usados.

En la tabla 1 se da una relación de las muestras de aceite esencial de naranja estudiadas, en la que se indican las correspondientes cosechas, áreas geográficas de cultivo, métodos de extracción e iniciales de las firmas suministradoras. Estas firmas han sido: Bordás (B), Givaudan (G), García de la Fuente (GF), Muñoz Gálvez (MG), Romirón (R), y Puig (P). En las muestras número 1 y 2 de la mencionada tabla no ha sido especificado por las firmas suministradoras el origen concreto dentro de nuestro país, y en las muestras 2 y 3 el método de obtención.

TABLA 1

ACEITES ESENCIALES DE NARANJA

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Proveedor
1. Naranja (expresión)	España	1970	B
2. Naranja (+)	España	"	G
3. Naranja (+)	Valencia	"	GF
4. Naranja (expresión)	Valencia	"	MG
5. Naranja clara (expresión)	Murcia	"	MG
6. Naranja oscura (expresión)	Murcia	"	MG
7. Naranja (1ª presión)	Carcagente	"	R
8. Naranja (destilada)	Brasil	"	R
9. Naranja (expresión)	Israel	"	MG
10. Naranja (expresión)	Rhodesia	"	MG
11. Naranja (expresión), f. p.	Florida	"	MG
12. Naranja (expresión), f. m.	Florida	"	MG
13. Naranja (expresión)	Valencia	1971	G
14. Naranja (expresión)	Murcia	"	P
15. Naranja (expresión)	Sevilla	"	P
16. Naranja (expresión)	Sevilla	"	B
17. Naranja (expresión)	Florida	"	B
18. Naranja (expresión)	Valencia	1972	B
19. Naranja (expresión)	Sevilla	"	B

f. p.: frutos primerizos.

f. m.: frutos maduros.

(+): Método de obtención no especificado.

2) Aceite esencial de limón.

Se extrae de la piel del fruto Citrus limonum Risso, perteneciente a la familia botánica de las Rutáceas, subfamilia de las Auranciáceas.

Actualmente se encuentra la mayor producción en el litoral mediterráneo y muy especialmente entre Niza y Génova, en Calabria, Sicilia, España, Portugal y costas de Liguria. Menos importancia tiene en Australia, habiéndola adquirido recientemente Palestina. En los Estados Unidos, se cultiva en California especialmente. Nuestro país comprende como zonas productivas más importantes Murcia, Sevilla y Málaga.

En nuestro trabajo hemos considerado varios tipos de obtención:

a) Limón esponja.

Este tipo de aceite se obtiene por eliminación previa de la pulpa del fruto, sometiendo después las cáscaras a compresión mediante una esponja por un procedimiento manual.

Suele ser el método de extracción más favorable desde el punto de vista de la calidad, ya que posee una mayor proporción de productos oxigenados con respecto a los demás tipos de extracción.

b) Limón máquina.

Dentro de este método, se incluyen fundamentalmente los aceites obtenidos con la máquina constituida por dos rodillos con superficie cubierta de carborundo, que giran rápidamente

en igual sentido raspando las cáscaras de los frutos, introducidos enteros. Se dirige a ellos, directamente, agua para eliminar por lavados y emulsión la esencia aislada.

c) Limón avena.

Se trata de un método mecánico por el que la esencia se obtiene directamente punzando los frutos enteros por unas púas situadas en el interior de un cilindro giratorio, desde donde la esencia es arrastrada con agua. Es un proceso muy utilizado, por ser el que menos mano de obra necesita y tener gran capacidad de producción.

d) Limón aguja.

Se obtiene también por un procedimiento mecánico, mediante el cual una púa, acabada en unas pequeñas cuchillas en forma de triedro, va recorriendo la superficie del fruto entero y arrancando las raspaduras que posteriormente son prensadas.

En la tabla 2 se indican las muestras de aceites de limón estudiados en este trabajo. Las anotaciones I a V se utilizan para diferenciar las muestras de iguales orígenes obtenidas por el mismo procedimiento y suministradas por diferentes firmas, o bien por la misma firma en fecha distinta dentro de la misma cosecha.

TABLA 2

ACEITES ESENCIALES DE LIMON

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Proveedor
1. Limón (esponja) I	Murcia	1970	B
2. Limón (esponja) II	Murcia	"	R
3. Limón (esponja) III	Murcia	"	MG
4. Limón (máquina)	Murcia	"	MG
5. Limón (avena)	Murcia	"	GF
6. Limón (aguja)	Murcia	"	GF
7. Limón italiano (+)	Italia	"	G
8. Limón (esponja) I	Murcia	1971	R
9. Limón (esponja) II	Murcia	"	G
10. Limón (esponja) III	Murcia	"	B
11. Limón (esponja) IV	Murcia	"	R
12. Limón (esponja) V	Murcia	"	B
13. Limón (máquina) I	Murcia	"	B
14. Limón (máquina) II	Murcia	"	R
15. Limón (máquina)	Sevilla	"	B
16. Limón (máquina)	Italia	"	B
17. Limón (avena) I	Murcia	"	B
18. Limón (avena) II	Murcia	"	R
19. Limón italiano (+)	Italia	"	G
20. Limón (sintético)			D
21. Limón (máquina)	Murcia	1972	B
22. Limón (máquina)	Sevilla	"	B
23. Limón (máquina)	Italia	"	B

(+): Método de obtención no especificado.

3) Aceite esencial de bergamota.

Este aceite se extrae de la epidermis del fruto de *Citrus bergamia* Risso, que es un árbol perteneciente a la familia de las Rutáceas. Se trata de una planta muy sensible a las variaciones climáticas, y una alteración relativamente pequeña puede estropear toda una cosecha (1).

Su producción se limita fundamentalmente a Reggio-Calabria, mas, por su importancia en la industria de los aceites esenciales y derivados, varios países han realizado experimentos para el cultivo del árbol de bergamota y para la producción del citado aceite esencial. Uno de ellos es España en las provincias de Mallorca y Sevilla.

La esencia se suele obtener en frío mediante la máquina calabresa, por la forma redonda propia de los frutos. Consiste esencialmente en un receptáculo que contiene dos discos cuya superficie está recubierta de púas. Estas perforan la epidermis del fruto, liberándose así la esencia.

En la tabla 3 se da una relación de las muestras de aceite de bergamota estudiadas en este trabajo, indicando el área de cultivo y cosecha.

Las iniciales (H. M. S.), (P) y (D) se refieren a las firmas Herederos de Manuel Salas, Puig y Dragoco, respectivamente.

TABLA 3

ACEITES ESENCIALES DE BERGAMOTA

<u>Muestra</u>	<u>Origen</u>	<u>Cosecha</u>	<u>Proveedor</u>
1. Bergamota	Sevilla	1970	H. M. S.
2. Bergamota	Mallorca	"	H. M. S.
3. Bergamota	Mairena (Sevilla)	1971	H. M. S.
4. Bergamota	Sanlúcar (Sevilla)	"	H. M. S.
5. Bergamota	Mallorca	"	P.
6. Bergamota	Mairena (Sevilla)	1972	H. M. S.
7. Bergamota	Italia	1966	P.
8. Bergamota	Sintética		D.

4) Aceite esencial de mandarina.

Se extrae de la epidermis del fruto *Citrus madurensis*.

Su área geográfica de producción comprende fundamentalmente Italia, radicando en Sicilia los principales cultivos. En España se produce especialmente en Murcia y Valencia.

En este trabajo hemos considerado aceites esenciales extraídos de frutos verdes y maduros, mediante un método de expresión por escudilla. Consiste esencialmente en un embudo metálico con el interior recubierto de puntas cónicas; el fruto se introduce entero y mediante un movimiento rotatorio se perfora la epidermis que expulsa la esencia.

En la tabla 4 se da una relación de las muestras de aceite esencial de mandarina estudiadas.

TABLA 4

ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA

Muestra	Origen	Cosecha	Proveedor
1. Mandarina natural	Carcagente	1970	R
2. Mandarina verde	España	"	B
3. Mandarina natural	Italia	"	G
4. Mandarina verde	España	1971	B
5. Mandarina natural	Italia	"	G
6. Mandarina verde	España	1972	B
7. Mandarina natural	Italia	"	G

TECNICAS ANALITICAS UTILIZADAS.

1) ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION INFRARROJA.

En el presente trabajo, para el estudio de la composición química de los aceites esenciales de los agrios hemos empleado como técnica fundamental la espectroscopía infrarroja, que nos ha permitido el análisis cuali y cuantitativo, tanto de las esencias totales como de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna. También hemos utilizado la espectroscopía infrarroja para el estudio del proceso de envejecimiento de los aceites esenciales.

Veamos las razones por las cuales hemos elegido esta técnica fundamentalmente. En el estudio de la composición química de los aceites esenciales se ha utilizado frecuentemente la cromatografía en fase de vapor, cuya función específica reside principalmente en su capacidad separativa. Como técnica analítica de identificación en mezclas tan complejas como los aceites esenciales no es muy segura, pues se sabe que los componentes de estas esencias son muy semejantes y pueden presentar parámetros de retención no específicos. Ello nos ha movido a utilizar una técnica separativa, como la cromatografía en columna, y, por otro lado, la espectroscopía infrarroja, que como es sabido se considera actualmente como una de las técnicas analíticas más idóneas para la identificación de las moléculas. La facilidad de aplicación de esta técnica, unida al hecho de la escasez de datos sobre la mis-

ma encontrados en la bibliografía, es lo que nos decidió a elegirla sin olvidar el complementarla por otras técnicas instrumentales.

Análisis funcional.

Comparando los espectros de un gran número de compuestos se ha observado que la presencia de ciertos enlaces en moléculas diferentes puede relacionarse con la aparición constante de ciertas bandas de absorción infrarroja cuya posición está poco modificada al pasar de un compuesto a otro; se podrá suponer, pues, que el grupo de átomos considerado tiene una vibración independiente con frecuencia propia. Estas frecuencias se conocen con el nombre de frecuencias características de grupo.

Con arreglo a este criterio general se ha confeccionado la tabla 5 en la que se dan las frecuencias características de los grupos funcionales contenidos en los componentes principales de las esencias en estudio.

Análisis cualitativo.

La aplicación de la espectroscopía infrarroja al análisis químico se funda en un conocido principio que puede enunciarse como sigue:

Cuando varios compuestos, que no reaccionan entre sí, que no forman asociaciones moleculares y que no contienen ellos mismos asociaciones entre sus moléculas, se encuentran formando una mezcla, el espectro de esta última es el resul-

TABLA 5

PRINCIPALES BANDAS DE ABSORCION INFRARROJA
DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES DE CITRICOS

<u>Grupo alquilo</u>	<u>Posición (cm⁻¹)</u>	<u>Compuestos</u>
ν (C-H) en CH ₃ : ν a CH ₃	2960	Varios
ν s CH ₃	2870	"
ν (C-H) en -CH ₂ -: ν a -CH ₂ -	2925	"
ν s -CH ₂ -	2850	"
δ (C-H) en -CH ₂ -: δ -CH ₂ -	1465	"
δ (C-H) en CH ₃ : δ a CH ₃	1450	"
δ s CH ₃	1375	"
δ s CH ₃ en (CH ₃) ₂ C	1385-1375 y 1375-1365	α -pineno, β -pineno
δ (C-H) en (CH ₃) ₂ CH-	1175-1165	α -terpineol, γ -terpineno
ρ CH ₂	720	alcoholes y aldehidos alifáticos (C ₃ -4)
<u>Grupo alqueno</u>		
ν (C-H) en R ₂ C=CH ₂	3095-3075	limoneno, β -pineno, mirceno

TABLA 5 (Continuación)

<u>Grupo alqueno</u>	<u>Posición (cm⁻¹)</u>	<u>Compuestos</u>
ν (C-H) en R ₂ C=CHR	3040-3010	varios
ν (C=C) no conjugado	1660-1640	terpenos y derivados con doble enlace
ν (C=C) conjugado	1600	cumarinas, mirceno
ν (C=C) en R ₂ C=CH ₂	1650-1640	limoneno, β -pineno
ν (C=C) tri o tetrasustituído	1680-1670	varios
δ (C-H) en R ₂ C=CH ₂	1420-1410	limoneno, β -pineno, mirceno
δ (C-H) en RHC=CHR trans	1310-1290	trans-2,8-p-mentadien-1-ol
δ (C-H) en RHC=CHR cis	1420-1400	cis-2,8-p-mentadien-1-ol
γ (C-H) en RHC=CH ₂	990' (-CH=)	limoneno, mirceno
γ (C-H) en R ₂ C=CHR	900 (=CH ₂) 840-780	limoneno, mirceno limoneno, linalol, citral
γ (C-H) en RHC=CHR trans	970	trans-2,8-p-mentadien-1-ol
<u>Grupo aromático</u>		
ν (C-H)	3300-3310	p-cimeno, cumarinas, flavonas, N-metil antranilato de metilo
ν (C=C)	1625-1575	Idem.
	1525-1475	

TABLA 5 (Continuación)

<u>Grupo aromático</u>	<u>Posición (cm⁻¹)</u>	<u>Compuestos</u>
γ(C-H)	825 y 747	furocumarinas
γ(C-H)	770-735	derivados 1,2-disustituídos (antranilato y N-metil antranilato de metilo)
γ(C-H)	860-800	derivados 1,4-disustituídos (p-cimeno)
<u>Grupo carbonilo</u>		
ν(C=O) aldehidos	1740-1720	n-decanal, n-nonanal, n-octanal
ν(C=O) ésteres alifáticos	1752-1722	acetatos de geranilo, nerilo, linalilo; caprilato de etilo, caproato de etilo
ν(C=O) aromático	1690	antranilato de metilo, N-metil antranilato de metilo
ν(C=O) aldehidos y cetonas α, β-insaturados	1700-1670	carvona, geranial, neral, 2-hexen-1-al
ν(C-H) aldehido alifático		n-decanal, n-nonanal, n-octanal
<u>Grupo hidroxilo</u>		
ν(O-H) primario	3640-3630	alcoholes primarios libres (n-octanol, geraniol, etc.)
ν(O-H) secundario	3630-3620	alcoholes secundarios libres (carveol, piperitol, etc.)

TABLA 5 (Continuación)

<u>Grupo hidroxilo</u>	<u>Posición (cm⁻¹)</u>	<u>Compuestos</u>
ν (O-H) terciario	3620-3610	alcoholes terciarios libres (α -terpeneol, linalol, etc.)
ν (O-H) asociado	3500-3200	varios
δ (O-H) + ν (C-O)	1050, 1350-1260	alcoholes primarios (n-octanol, geraniol, etc.)
	1100, 1350-1260	alcoholes secundarios (carveol, etc.)
	1150, 1410-1310	alcoholes terciarios (α -terpeneol, linalol, etc.)
<u>Grupo amino</u>		
ν (N-H) primaria	3500 (vas) 3300 (ν s)	antranilato de metilo
ν (N-H) secundaria	3500-3300	N-metil antranilato de metilo
δ (N-H) primaria	1650-1590	antranilato de metilo
δ (N-H) secundaria	1580-1490	N-metil antranilato de metilo
ν (C-N) aromática primaria	1350-1250	antranilato de metilo
ν (C-N) en Ar-NH-R	1350-1280	N-metil antranilato de metilo
	1280-1230	N-metil antranilato de metilo
γ (N-H) y ω NH ₂	900 a 650	antranilato de metilo N-metil antranilato de metilo

tado de la superposición de los espectros de cada uno de los componentes.

La primera condición para poder aplicar el método analítico por espectroscopía infrarroja, es el conocimiento exacto del mayor número posible de espectros de sustancias puras.

Hemos realizado el análisis cualitativo de las distintas esencias comparando sus espectros de absorción infrarroja con los obtenidos por nosotros de noventa sustancias puras, completados con los que cita la bibliografía (21)-(28).

Si bien pueden ser identificados así, en principio, todos los componentes de una esencia natural, se produce frecuentemente el enmascaramiento de las bandas de los minoritarios, lo cual dificulta su reconocimiento. De aquí la importancia, como hemos indicado, de recurrir previamente a un fraccionamiento de las esencias.

Análisis cuantitativo.

La aplicación de la espectroscopía infrarroja permite la valoración de los componentes de una mezcla sin su separación previa. El análisis cuantitativo se funda en la medida de la intensidad de absorción de ciertas bandas clave, de intensidad adecuada, que presenten la mínima superposición posible con bandas de otros componentes.

Como en toda espectrometría de absorción, el cálculo de la concentración se realiza utilizando la ley de Lambert-Beer, que relaciona la densidad óptica o absorbancia, a una deter-

minada frecuencia, con la concentración del componente en la mezcla analítica. Dicha ley se formula así:

$$D = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

donde D es la densidad óptica; I_0 e I son las intensidades de la radiación infrarroja monocromática incidente y transmitida por la sustancia, respectivamente; l es el espesor de la célula de absorción en centímetros; c la concentración en moles/litro del componente analítico y ϵ el coeficiente de extinción molar, característico de cada especie y función de la frecuencia de la banda.

El producto $\epsilon \cdot l$ puede determinarse previamente, midiendo las densidades ópticas de la especie patrón en varias mezclas sintéticas de concentración conocida o en varias disoluciones patrón del componente analítico en el disolvente elegido.

Si la ley de Lambert-Beer no se cumple, no habrá linealidad entre las densidades ópticas y las concentraciones, y habrá que trazar curvas empíricas que representen para cada constituyente de la mezcla las desviaciones de la ley de Beer.

Cuando la transmisión $T = I/I_0$ toma el valor $1/e$, una variación dT acusa el menor cambio de dc/c en la concentración c . Si existe un solo componente, los mejores resultados se obtienen teóricamente con T próximo a 37 % (en la práctica se opera entre 25 y 50 %). Hemos elegido adecuadamente las concentraciones y espesores de las células para aproximarnos lo más

posible a estas condiciones ideales.

En lo posible, deben ser preferidas como bandas clave las bandas anchas, porque en ellas son menores las desviaciones de la ley de Lambert-Beer, que dependen de la relación entre la anchura media de la banda y la anchura espectral de la rendija (29).

Para la medida de I_0 en este trabajo hemos escogido el método de las líneas de base de Wright que se considera más ventajoso cuando se trata de valorar componentes de mezclas complejas. En otros casos, para determinar la línea de base hemos tomado el máximo de transmisión correspondiente a un punto, situado en uno de los lados de la banda clave del componente a valorar.

Hemos calculado, para cada una de las bandas clave y para las diversas concentraciones patrón, los valores de la densidad óptica, construyendo las curvas de valoración correspondientes y ajustando por mínimos cuadrados las ecuaciones de las rectas a los puntos experimentales obtenidos, mediante las ecuaciones:

$$m = \frac{p \cdot \xi(x \cdot y) - \xi(x) \cdot \xi(y)}{p \cdot \xi(x^2) - \xi(x) \cdot \xi(x)}$$
$$n = \frac{\xi(y) \cdot \xi(x^2) - \xi(x) \cdot \xi(x \cdot y)}{p \cdot \xi(x^2) - \xi(x) \cdot \xi(x)}$$

donde \underline{m} es la pendiente de la recta, \underline{n} la ordenada en el origen, \underline{p} el número de puntos experimentales, \underline{x} la concentración de los componentes e \underline{y} la densidad óptica.

Preparación de las muestras.

Los aceites esenciales y sus fracciones líquidas fueron analizados cualitativamente utilizando células de ClNa y/o ICs con espesores de 0.025, 0.05, 0.1 y 1.0 mm. Para el registro de las bandas más intensas se prepararon films entre cristales, sin intercalar separador.

El análisis cuantitativo se realizó mediante disoluciones en Cl_4C y/o S_2C , con células de 0.1-0.2 mm. También utilizamos células de cuarzo de 1 cm. de espesor para estudiar los componentes, que sufren asociaciones moleculares, en disolución muy diluída.

Para el análisis de los productos o fracciones sólidas, empleamos la técnica de los comprimidos de KBr . Para ello pesamos 300 mg de KBr , a los que añadimos aproximadamente 2 mg de muestra, que convenientemente dispersa se sometió durante varios minutos (tres o cuatro) a vacío y presión adecuada.

Espectrofotómetros utilizados.

Todos los espectros de absorción infrarroja que figuran en este trabajo se han obtenido en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 457. Este es un instrumento de haz doble, que utiliza como monocromador dos redes entre $4000\text{-}250\text{ cm}^{-1}$.

En algunos casos los resultados obtenidos se han confir
mado mediante registros realizados en un espectrofotómetro
Beckman IR-7, que es un instrumento de doble haz, dotado de
un monocromador doble formado por un prisma anterior de clo
ruro sódico y una red. La zona espectral registrada con es-
te aparato es la comprendida entre 4000 y 650 cm^{-1} .

2) CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

El procedimiento seguido en este trabajo para el fraccionamiento de los aceites esenciales es el de Kirchner y Miller (13), modificado para obtener una separación de los componentes oxigenados, de acuerdo con el proceso que se describe posteriormente.

Dimensiones y características de la columna.

En la figura 1 se da un esquema en el cual vienen representadas las partes esenciales de la columna utilizada. Posee unas dimensiones de 45 cm de altura y 2.5 cm de diámetro, y sus características responden a las del tipo Sephadex K 25. Consta de un tubo interior de vidrio, donde va introducido el soporte, que en la parte inferior queda retenido por un filtro de superpolioximetileno, soportado a su vez por una rosca de plástico de la misma naturaleza química. Esta última posee un orificio desde el cual son recogidas cada una de las fracciones a través de un tubo capilar de politetrafluoretileno.

La parte superior de la columna está enlazada, por otro capilar de plástico del mismo tipo que el citado anteriormente, con un frasco de Mariotte, desde el cual y por un efecto de sifón se va vertiendo automáticamente el disolvente a la columna, con una velocidad que depende de la diferencia de altura entre el frasco y la parte superior del lecho.

Para evitar la volatilización de los eluyentes y mante-

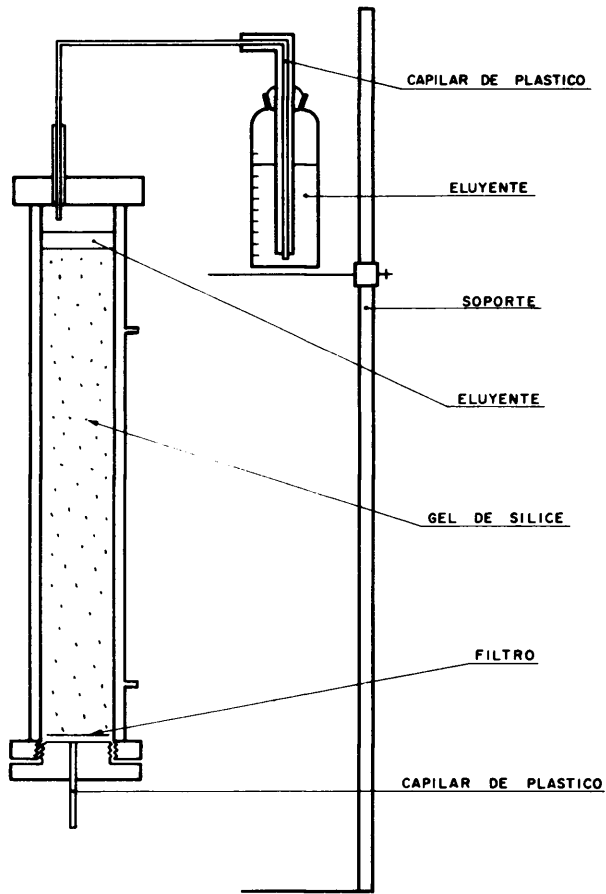


FIG. 1.- COLUMNA CROMATOGRÁFICA EMPLEADA EN EL FRACCIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

ner una temperatura aproximadamente constante, la columna po see una camisa de refrigeración con agua.

Soporte utilizado.

El soporte utilizado en este trabajo ha sido gel de sílice Merck para cromatografía, de un tamaño de grano comprendido entre 0.05 y 0.2 mm.

No hemos procedido a una activación del mismo con la tem peratura, dadas las posibles transformaciones químicas que con ello sufre el aceite esencial (30).

Para introducir el soporte en la columna procedimos del siguiente modo:

Depositamos en el tubo interior una cantidad adecuada de n-hexano y se fue añadiendo sucesivamente gel de sílice, del tamaño de grano indicado anteriormente, hasta una altura de lecho de 42 cm. Entre adiciones sucesivas de sílice, introducíamos una varilla de vidrio con una placa circular en un extremo para ayudar a sedimentar el adsorbente y eliminar las burbujas de aire que permanezcan en el seno del mismo. Con ello se consigue una buena uniformidad a lo largo de la columna y la experiencia se hace reproducible. Con este fin se ha procurado además la existencia permanente de cierta can tidad de líquido puro por encima del soporte, con lo que se ha evitado además el secado parcial de la columna.

Proceso cromatográfico.

Uno de nuestros objetivos perseguidos en el fraccionamiento

to cromatográfico era separar, dentro de los compuestos oxigenados, los volátiles de los no volátiles, lo que en los trabajos de la bibliografía se realiza por destilación en corriente de vapor (31).

En el caso de los aceites esenciales de naranja, limón y mandarina, que poseen una proporción pequeña de productos oxigenados, se tiene que partir, naturalmente de grandes cantidades de aceite (unos veinte centímetros cúbicos) con objeto de obtener cantidad suficiente de cada fracción oxigenada para someter ésta a posterior análisis espectroscópico y a cromatografía en fase de vapor. En el aceite esencial de bergamota, cuya fracción oxigenada es la más abundante, se puede partir de una cantidad menor (10 cc, aproximadamente).

Una vez introducida la muestra en la parte superior de la columna, se pasaron a través de ella unos 300 cc de n-hexano hasta que todos los terpenos fueron eluidos, lo que se comprobó por medidas del índice de refracción, mediante un refractómetro de Abbe, con referencia a la raya D del sodio y a una temperatura aproximada a los 15°C mantenida por refrigeración con agua. Para comprobar la separación de las fracciones, se siguió en algunos casos el fraccionamiento mediante los espectros infrarrojos de las fracciones elementales, recogidas en tubos de ensayo.

Posteriormente se pasaron alrededor de 400 cc de una mezcla de n-hexano-acetato de etilo en las proporciones volumé-

tricas de 88:12, y se obtuvo de esta manera la fracción oxigenada más volátil.

A continuación se pasaron a través de la columna unos 300 cc de acetato de etilo, con lo que se obtuvo una fracción no volátil constituida, principalmente, por productos derivados de la cumarina en el caso de los aceites de limón y bergamota, y por flavonas en los aceites de naranja y mandarina.

Finalmente, procedimos al arrastre de una fracción resinosa pasando a través de la columna alrededor de 300 cc de metanol.

Eliminación de los disolventes.

Para la eliminación de los eluyentes utilizados en el arrastre de cada una de las fracciones cromatográficas recurrimos a la destilación a vacío.

Se utilizó para ello un matraz de 250 cc de tres bocas unido a una columna de destilación, de anillos Rasching, de 45 cm de altura y conectada a una bomba de vacío. Este fue regulado por un capilar introducido en una de las bocas laterales del matraz de destilación. Se obtuvo así un vacío adecuado para eliminar los disolventes a unas temperaturas comprendidas entre 25 y 40° C.

3) CROMATOGRAFIA DE GASES.

Instrumentos utilizados y condiciones experimentales.

Para el análisis de los aceites totales envejecidos y las determinaciones cuali y cuantitativas realizadas en los aceites esenciales de bergamota hemos empleado un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F-11 con las siguientes condiciones experimentales:

Columna capilar rellena de 12 m de longitud y 0.7 mm de diámetro interior.

Relleno: Chromosorb W (AW) IV.

Fase estacionaria: Reoplex 400.

Gas portador: nitrógeno ($P: 1 \text{ kg/cm}^2$).

Flujo de gas portador: 10 ml/min.

Presión de aire: 1 kg/cm^2 .

Detector de ionización de llama ($P_{H_2}: 0.6 \text{ kg/cm}^2$)

Temperatura constante: 140°C .

Repartición de flujo: 1:15.

El análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 990, con las siguientes condiciones experimentales:

Columna capilar rellena de 19 m de longitud y 0.7 mm de diámetro interior.

Relleno: Chromosorb W (AW) IV.

Fase estacionaria: Ucon LB 550-X.

Gas portador: nitrógeno ($P: 1 \text{ kg/cm}^2$).

Flujo de gas portador: 10 ml/min.

Repartición de flujo: 1:15.

Detector de ionización de llama ($P_{\text{H}_2}: 1.2 \text{ kg/cm}^2$).

Presión de aire: 2 kg/cm^2

Temperatura programada de 50°C a 140°C .

Velocidad de programación: 3°C/min. y 2°C/min.

Tiempo inicial: 0 minutos.

Tiempo final: 30 minutos.

Las columnas fueron preparadas en los dos casos pasando por ellas fase estacionaria en solución de cloruro de metileno al 0.2 %. El peso total de fase estacionaria fue de 24 mg y 30 mg, respectivamente.

Las sustancias constitutivas de una mezcla pueden ser identificadas por sus retenciones características en cromatografía de gases.

En cierto modo y a efectos de identificación, los datos de retención de una sustancia son característicos, pero no específicos de ella. De ahí la necesidad de cambiar diversos parámetros operativos, como la temperatura y fase estacionaria para obtener contrapruebas repetidas que hacen más segura la identificación de una sustancia. También se suele recurrir a otras técnicas analíticas.

Para el análisis cualitativo hemos comparado los tiempos de retención de cada componente de la mezcla con los

correspondientes a patrones puros. A efectos de comprobación hemos utilizado las condiciones termodinámicas del trabajo de I. Calvarano y M. Calvarano (5).

Análisis cuantitativo.

Para la determinación cuantitativa de los componentes de los aceites esenciales hemos seguido el cálculo de las áreas de los picos (producto de la altura por la anchura media).

Si llamamos S_i al área de un componente determinado, la concentración aproximada de éste viene dada por la siguiente expresión:

$$\% = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Esta expresión será válida siempre y cuando la sensibilidad del detector para cada componente sea la misma. Hay que aplicar a dichas áreas unos factores de corrección que se pueden definir como la razón existente entre el área del pico que resultaría si la proporcionalidad fuese la misma para todos los componentes y el área del pico que realmente se obtiene en el cromatograma:

$$f_i = \frac{S'_i}{S_i} \quad (2)$$

siendo S' el area corregida.

La ecuación (1) será correcta si se utilizan áreas corregidas:

$$\% = \frac{S'_i}{\sum S'_i} \cdot 100 \quad (3)$$

Introduciendo en la ecuación anterior los factores de de calibrado definidos en la ecuación (2), se obtiene:

$$\%_i = \frac{f_i S_i}{\sum f_i S_i} \cdot 100 \quad (4)$$

Cuando se utiliza, como en este caso, un detector de ionización de llama de hidrógeno y se analizan moléculas análogas, como terpenos y derivados, la multiplicación de las áreas de pico por los valores correspondientes del factor carbono proporciona resultados relativamente buenos en la interpretación cuantitativa de los cromatogramas (32).

El factor carbono es característico de cada componente y se define por la siguiente expresión:

$$F_c = \frac{\text{Peso molecular del componente}}{(\text{N}^\circ \text{ de átomos de C del componente}) \cdot 12}$$

Conviene excluir del recuento de carbonos aquéllos que estén unidos a átomos de oxígeno.

Para calcular semicuantitativamente las proporciones relativas de un componente en los aceites esenciales se aplica la ecuación (4).

4) CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS.

La asociación de estas dos técnicas analíticas puede considerarse como un método nuevo de identificación ideal para el análisis de mezclas tan complejas como los aceites esenciales, donde frecuentemente los componentes inferiores al 0.1 por ciento tienen decisiva influencia sobre el olor y el sabor de la mezcla. Este acoplamiento aprovecha las mejores cualidades de ambas técnicas: la capacidad separadora de la cromatografía gas-líquido y la enorme sensibilidad de la espectrometría de masas, que solo requiere una cantidad del orden del microgramo del componente en estado de vapor.

Como hemos mencionado, en este trabajo hemos obtenido únicamente los espectros de masas de los productos de oxidación del limoneno que se forman en el envejecimiento del aceite esencial de naranja y los resultados pueden aplicarse tentativamente a los demás aceites estudiados.

Instrumento utilizado y condiciones experimentales.

Se ha utilizado un espectrómetro de masas Perkin-Elmer 270 acoplado a un cromatógrafo de la misma firma, modelo 900.

El cromatograma de la mezcla se obtiene por medio de un monitor de iones totales, colocado entre los sectores electrostático y magnético. Este instrumento trabaja a velocidad de ba

rrido de 1 a 100 segundos por diez unidades de masa, lo que permite registrar incluso los picos agudos rápidos.

Hemos utilizado una columna capilar de vidrio, con fase fija Reoplex 400 y trabajado con las condiciones termodinámicas indicadas anteriormente para el cromatógrafo de gases Perkin-Elmer F-11.

El instrumento citado funciona por bombardeo de electrones dotados de una energía aproximada a los 70 ev.

Interpretación de los espectros de masas.

En la cámara de ionización las moléculas orgánicas afectadas absorben una parte de la energía del haz de electrones y se transforman en los correspondientes iones moleculares (la energía de primera ionización es del orden de 10 ev), que están representados casi siempre por la línea de mayor masa del espectro, la cual corresponde, por tanto, al peso molecular del producto químico en cuestión. Todos los electrones de valencia, que son los más lábiles, pueden separarse con igual posibilidad (33). La energía residual absorbida se desplaza a través de la molécula, y cuando se concentra suficiente energía en un enlace determinado éste se rompe y la molécula se fragmenta, apareciendo así cationes de menor masa y fragmentos radicales neutros que no son detectados.

La distribución resultante de fragmentos iónicos depende de la naturaleza del proceso de disociación molecular, que está relacionado con la estructura y estereoquímica de la mo

lécua neutra. La probabilidad de que se asocie un electrón a una molécula neutra dando un ión negativo es del orden de 10^{-2} , y por ser tan pequeña no se considera.

La predicción de las características principales de un espectro de masas exige el conocimiento de los procesos y mecanismos de fragmentación (34). La causa de esta ruptura hay que buscarla en la tendencia del sistema a la estabilidad. Solo se dispone de una teoría de tipo estadístico y se utilizan reglas de fragmentación empíricas.

El procedimiento más sencillo de identificación estriba, naturalmente, en comparar el espectro problema con el de una sustancia patrón, obtenidos ambos en las mismas condiciones experimentales. Desgraciadamente, no hemos dispuesto de patrones puros, por lo que hemos recurrido a los espectros publicados en la bibliografía (35)-(39).

5) ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA.

Los espectros de absorción ultravioleta se han obtenido en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 350, instrumento de doble haz que utiliza un monocromador de red. La zona espectral registrada es la comprendida entre 160 y 400 nm.

Hemos estudiado por esta técnica analítica las flavonas de los aceites esenciales de naranja y las cumarinas de los aceites esenciales de bergamota, que presentan una banda característica a 320-330 nm (25), (29). Aunque estas bandas son muy anchas y corresponden a varios compuestos, hemos de

terminado su densidad óptica en idénticas condiciones para cada muestra. Los valores así hallados son comparativos y proporcionales a las concentraciones.

Los espectros fueron obtenidos en disoluciones en alcohol etílico Uvasol, utilizando concentraciones del orden de 10 mg/cc y células de cuarzo de 1 cm de espesor.

6) ESPECTROFLUORIMETRIA

Los compuestos cumarínicos, por sus propiedades antioxidantes, y el antranilato de metilo y N-metil antranilato de metilo por conferir calidad a los aceites esenciales de mandarina y naranja, ofrecen en su valoración interés indudable.

Los compuestos cumarínicos se encuentran en el aceite esencial de limón con unas concentraciones del orden del 2%. Las densidades ópticas de las bandas de estas sustancias en el espectro infrarrojo del aceite son pequeñas, vienen influenciadas por las de otros componentes y, por tanto, no son adecuadas para realizar con garantía determinaciones cuantitativas por espectroscopía infrarroja.

La estructura aromática de las cumarinas y de los ésteres metílicos del ácido antranílico les confiere propiedades fluorescentes y, por tanto, para su determinación semi o cuantitativa hemos utilizado la espectrofluorimetría, que posee unos límites de detección muy pequeños.

Determinaciones semicuantitativas.

Es de sobra conocido que en el análisis cuantitativo por

espectrofluorimetría se debe operar a bajas concentraciones por ser entonces la intensidad de la radiación fluorescente proporcional a la concentración de la muestra.

Generalmente se cumple esta linealidad para concentraciones menores de 10^{-3} g/l, dependiendo además del compuesto de que se trate. Teniendo presente tal condición de linealidad, preparamos unas disoluciones patrón en alcohol etílico. Las concentraciones elegidas comprendían a la del componente en la muestra de esencia disuelta. Por lectura directa de la intensidad de fluorescencia emitida por las disoluciones patrón se determinó la curva de calibrado en cada caso.

Hemos dado carácter semicuantitativo a las valoraciones que hemos realizado por este método en este trabajo por existir en cada aceite varias sustancias fluorescentes que presentan bandas muy próximas. Valiéndonos, no obstante, del hecho de que la posición de las bandas de excitación y emisión del aceite corresponde a las del compuesto fluorescente mayoritario, las curvas patrón realizadas con este componente nos han dado concentraciones de cumarinas y antranilato que, aparte de ser comparativas en las distintas muestras, son del mismo orden que las indicadas en la bibliografía.

Espectrofluorímetro utilizado.

Los espectros de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer MPF-3, dotado de una lám

para de xenon como fuente productora de energía radiante que excita la muestra. Con este instrumento se registra la región espectral comprendida entre 200 y 800 nm, pudiéndose obtener dos espectros para la identificación analítica de una sustancia: el de excitación y el de emisión.

METODOS UTILIZADOS EN EL ENVEJECIMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Son dos los métodos que hemos seguido para envejecer artificialmente los aceites esenciales:

Por un lado se siguió el procedimiento de someter a 60° C durante diferentes periodos de tiempo (60, 85, 110 y 230 horas) iguales cantidades de diferentes aceites, introducidos en tubos de ensayo del mismo tamaño.

Otro método seguido fue el de someterlos a la acción de la luz ultravioleta de una lámpara de xenon. Para ello se tomaron cantidades iguales de las distintas muestras, introducidas en tubos de cuarzo similares.

Los resultados así obtenidos fueron comparables a los del envejecimiento natural, producido por almacenamiento prolongado de las muestras.

3. RESULTADOS

ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS: COMPOSICION QUIMICA.

Hace una treintena de años sólo se encontraban en el mercado las esencias de naranja procedentes de Sicilia, Calabria, California (de olor débil), Florida, España (muy coloreadas), Jamaica, Japón y Africa del Sur, especialmente. Hacia los años cincuenta aparecieron las esencias procedentes de la Guinea Francesa, Indias Orientales, Palestina y Brasil.

La composición química del aceite esencial extraído de la corteza del fruto ha sido muy estudiada, sobre todo la de las esencias oriundas de Italia, California, Florida y Palestina.

Las sustancias hasta ahora identificadas las podemos asociar, por funciones químicas, en los siguientes grupos:

Hidrocarburos terpénicos.

Constituyen la fracción mayoritaria del aceite, siendo el más abundante el limoneno (alrededor del 90 % en la esencia).

Han sido también identificados el mirceno, α -pineno, canfeno, α -terpineno, Δ^3 -careno, α -felandreno, β -pineno, sabineno y terpinoleno (40), (41). En los aceites oriundos de Florida fueron además detectados α -tujeno, 2,4-p-mentadieno, β -terpineno y p-cimeno (42).

Hidrocarburos sesquiterpénicos.

Estos componentes constituyen en el aceite esencial de naranja una fracción minoritaria que suele encontrarse en concentraciones menores del uno por ciento.

Se han identificado α -copaeno, β -copaeno, cariofileno,

β -elemeno, α -humuleno, β -humuleno, valenceno, Δ -cadineno, y farneseno en aceites procedentes de Italia y Florida. En estas últimas, se detectaron además α -ylangeno (42) y α y β -cubeneno en las de origen italiano (43).

Alcoholes.

Esta fracción constituye alrededor del 0.5 % del aceite total. Los alcoholes identificados hasta ahora son numerosos (41). De la serie alifática se han detectado los de números de átomos de carbono comprendidos entre 1 y 12, ambos inclusive, más los alcoholes isobutilico e isoamílico.

En los aceites de origen valenciano, se han identificado varios alcoholes de la serie alifática, desde el C_7 al C_{12} , y varios alcoholes terpénicos (linalol, α -terpineol, citronelol, geraniol, nerol, elemol, cis-carveol, trans-carveol, cis-2,8-p-mentadien-1-ol, trans-2,8-p-mentadien-1-ol, 1,8-p-mentadien-9-ol, 1-p-menten-9-ol y 8-p-menten-1,2-diol (44).

Aldehidos.

De los compuestos aldehídicos se han identificado los correspondientes a la serie alifática, desde el hexanal hasta el aldehido palmítico, más los aldehidos fórmico y acético (41).

En esencias de origen valenciano se han encontrado otros aldehidos α , β -insaturados: α -hexil- β -heptil, α -hexil- β -octil, α -heptil- β -heptil, α -octil- β -heptil y α -hexil- β -nonil acroleína (45).

Cetonas.

Entre los compuestos cetónicos del aceite esencial de naranja se encuentran la metilheptenona, carvona, piperitona y 6-metil-5-hepten-2-ona (41).

Esteres.

Los ésteres constituyen una fracción que se encuentra en el aceite de naranja en proporciones del 0.5 %, aproximadamente (1).

Los citados en la bibliografía son los ésteres del ácido fórmico (formiato de geranilo y de terpenilo), acético (acetato de isobutilo, octilo, decilo, citronelilo, linalilo, geranilo, terpenilo y bornilo), hexanoico (hexanoato de etilo y metil etilo), caprílico (caprilato de etilo y nonilo), propiónico (propionato de etilo) y butírico (butirato de geranilo) (41).

Acidos.

Los ácidos identificados comprenden los de la serie alifática hasta el butírico, más el hexanoico, caprílico, cáprico, palmítico y hexacosanoico (41). La cantidad total de ácidos en este aceite es del orden del 0.5 %. No se disponen de antecedentes acerca del estudio de la fracción ácida en aceites esenciales de naranja de procedencia española.

Oxidos, compuestos nitrogenados, terpenoides y parafinas.

Otros compuestos que han sido identificados en este aceite son los óxidos de linalilo cis y trans, antranilato de me

tilo, β -sitosterol, friedelina y citrostadienol. Sin embargo, carecemos de antecedentes sobre la identificación de estos productos en aceites esenciales de naranja oriundos de España.

G. D'Amore (43) en las esencias italianas ha identificado un conjunto de parafinas que corresponden al pentadecano y todos los términos de la serie comprendidos entre el C_{21} y el C_{31} , ambos inclusive.

Cumarinas y flavonas.

Constituyen fundamentalmente el residuo no volátil obtenido por destilación a vacío.

La bibliografía (41) cita como componentes cumarínicos de este aceite a la 5,7-dimetoxicumarina (citropteno), 7-metoxi-8-epoxi-2,3-isopentilcumarina (merancina), 7-geranoxicumarina (aurapteno), 5-hidroxipsoraleno (bergaptol), y 5-(γ,γ -dimetil aliloxipsoraleno) (isoimperatorina).

Como componentes flavónicos vienen citados los siguientes: 5,8-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona, 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona (tangeretina), 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina), 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona, 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (sinensetina) y 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona (41).

No existen antecedentes en la bibliografía sobre el análisis de cumarinas y flavonas en aceites de naranja españoles.

Carotenoides.

Son treinta y tres los componentes de esta naturaleza que

mica que la bibliografía cita como sustancias constitutivas de este aceite (41). Omitimos su descripción por haber prescindido del estudio correspondiente, ya que las concentraciones son mínimas.

Nuestro estudio de aceites esenciales de naranja, así como de otros aceites, no tiene como fin fundamental hacer un análisis completo de todos los componentes, ya que la proporción de muchos de ellos está por debajo de los límites de detección de la técnica analítica que fundamentalmente hemos utilizado, la espectroscopía infrarroja. Nos hemos limitado a aplicar las diferentes técnicas mencionadas al análisis cualitativo, y cuantitativo en muchos casos, de los componentes más importantes y característicos que nos han permitido por otra parte un estudio comparativo de las esencias.

A continuación indicamos los resultados obtenidos.

ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA. VARIACION DE LA
COMPOSICION QUIMICA CON EL AREA DE CULTIVO.

1) Análisis infrarrojo de los aceites sin fraccionar.

En el espectro infrarrojo del aceite esencial de naranja hemos identificado todas las bandas visibles (tabla 6), completando los resultados obtenidos por anteriores autores (11).

Los componentes que se indican en primer lugar son los que más contribuyen a la absorción infrarroja a la frecuencia correspondiente.

Las figuras 2-4 corresponden a tres muestras de "aceite ex presión" de naranja cultivada en las provincias de Valencia, Murcia y Sevilla (cosecha 1971), respectivamente, y las 5-6 corresponden a dos componentes del mismo aceite.

El limoneno se encuentra en esta esencia en concentraciones del orden del 90 %; por ello, la mayoría de las bandas visibles del espectro pertenecen a este compuesto. El mirceno se observa por el aumento de intensidad a 1595 cm^{-1} , en donde aparece la banda $\nu\text{C}=\text{C}$ de los dobles enlaces conjugados, superpuesta a una banda débil del limoneno. Los demás terpenos que cita la bibliografía y que se encuentran en concentraciones menores del 1 %, tienen una estructura similar y, por tanto, no son observables mediante esta técnica analítica.

La fracción oxigenada total constituye alrededor del 5 % del aceite, por lo cual sólo son visibles las bandas más in-

tensas (véase tabla 6), como las del n-octanal y n-decanal, (1730 cm^{-1}), esterés (1740 cm^{-1}), citral (1680 cm^{-1}) y flavonas ($1515, 835\text{ cm}^{-1}$).

La banda a 1515 cm^{-1} ha sido atribuída al p-cimeno en este aceite (11). Sin embargo, generalmente esta banda es originada por las flavonas, compuestos también con núcleo aromático, que presentan una absorción en la misma frecuencia. La posibilidad de la presencia de p-cimeno en los aceites esenciales de naranja será discutida más adelante.

Los ácidos alifáticos (fundamentalmente caproico, caprílico y cáprico) son identificables por la banda $\nu_{\text{C=O}}$ a 1712 cm^{-1} , que viene superpuesta a una banda muy débil del limoneno.

Teniendo en cuenta las indicaciones anteriores, en las figuras 2-4 pueden observarse a simple vista variaciones significativas en el contenido en flavonas, aldehídos y ácidos. Datos más concretos se darán en el apartado de análisis cuantitativo y en el estudio separado de fracciones.

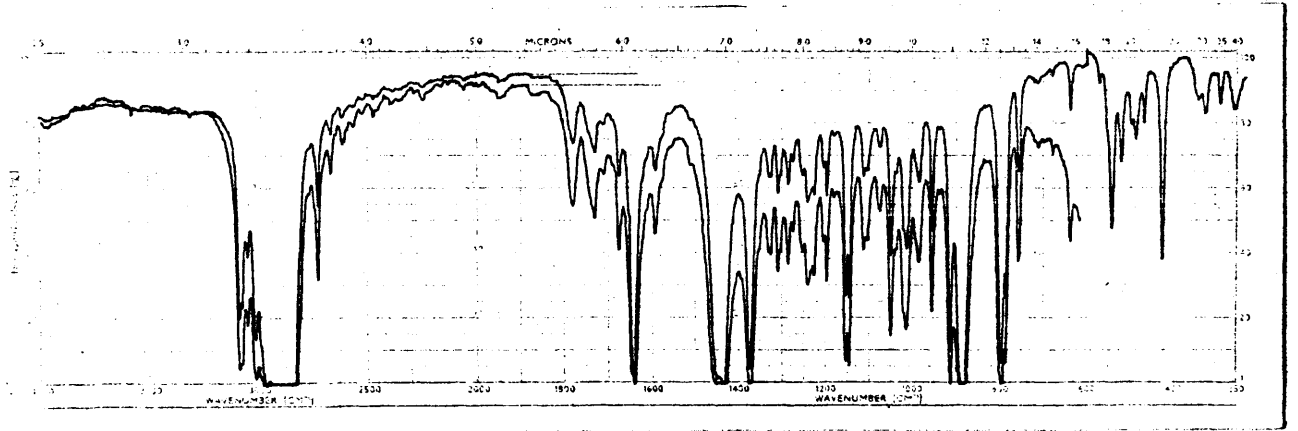


Fig. 2. Aceite de naranja expresión Valencia (1971);
l = 0.1 mm y 0.05 mm.

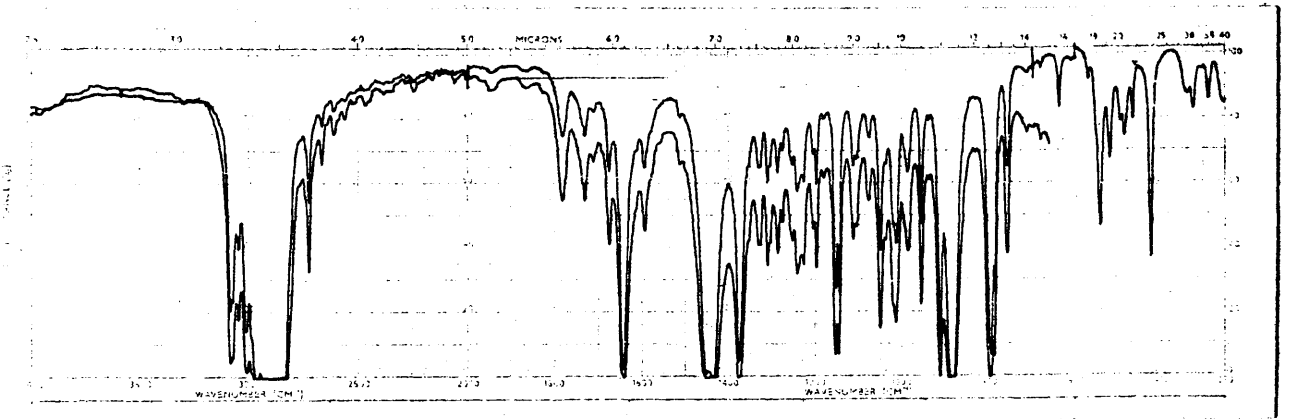


Fig. 3. Idem, Murcia (1971).

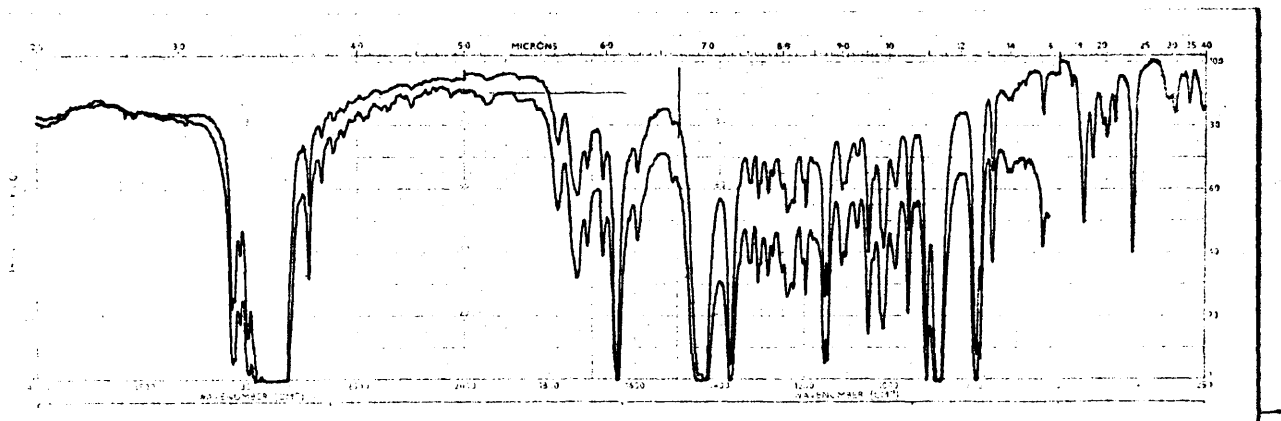


Fig. 4. Idem, Sevilla (1971).

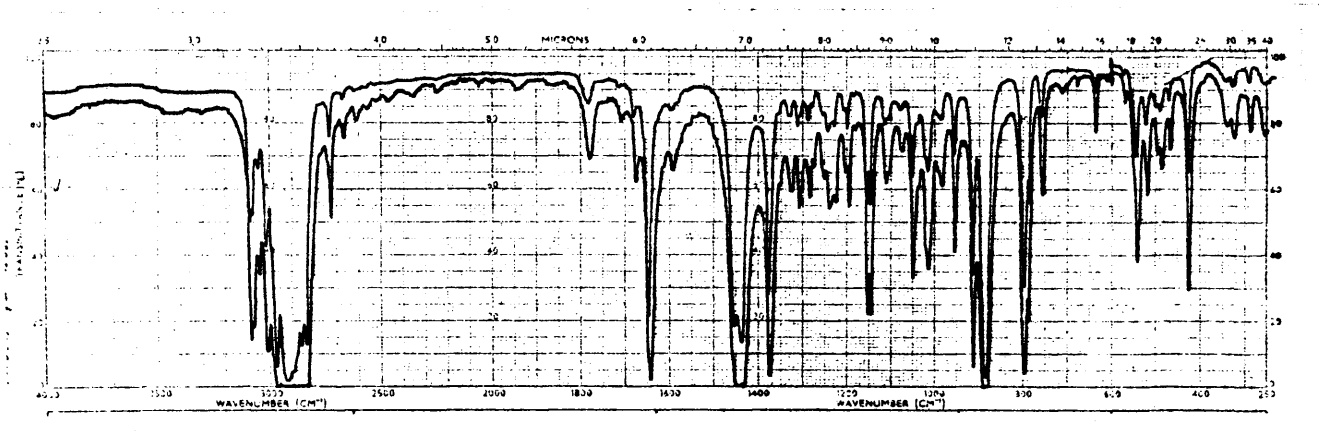


Fig. 5. Limoneno; $l = 0.05$ mm y 0.025 mm.

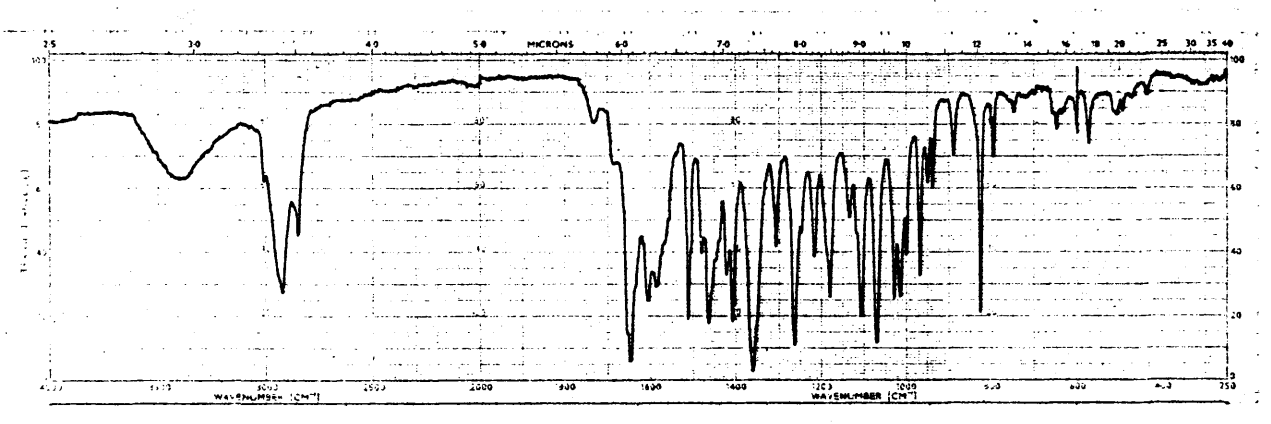


Fig. 6. Tangeretina obtenida del residuo sedimentable de mandarina (impurificada), en KBr.

TABLA 6

Aceite esencial de naranja.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3085	limoneno
3075	limoneno
3042	limoneno
3010	limoneno
2965	limoneno
2920	limoneno
2860	limoneno
2840	limoneno
2725	limoneno
1780	limoneno
1740	esteres (caprilato de etilo, caproato de etilo, acetato de geranilo)
1730	aldehidos (n-octanal, n-decanal)
1712	limoneno + ácidos (caproico, caprílico)
1692	2-hexen-1-al + 2-octen-1-al
1680	citral + limoneno
1645	limoneno
1595	mirceno + limoneno
1515	flavonas (tangeretina + nobiletina)
1455	limoneno
1438	limoneno
1378	limoneno
1331	limoneno
1310	limoneno
1287	limoneno
1275	limoneno
1255	limoneno
1245	limoneno
1228	limoneno
1208	limoneno

TABLA 6 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1198	limoneno
1180	limoneno
1155	limoneno
1145	limoneno
1115	limoneno
1105	limoneno
1078	limoneno
1050	limoneno
1040	limoneno
1018	limoneno
985	limoneno + mirceno
955	limoneno
940	limoneno
913	limoneno
890	limoneno + mirceno
835	flavonas (tangeretina + nobiletina)
798	limoneno
789	limoneno
755	limoneno
720	terpinoleno
712	limoneno
678	limoneno
638	limoneno
570	limoneno
540	limoneno
520	limoneno
498	limoneno
488	limoneno
468	limoneno
425	limoneno
342	limoneno
325	limoneno
288	limoneno

Determinación cuantitativa de limoneno. Contenido relativo aldehydos/limoneno.

Como este producto constituye alrededor del 90 % del aceite esencial de naranja, la medida de su concentración vendrá poco afectada por los demás componentes de la esencia. Para obtener la curva de calibrado (fig. 7) hemos partido de disoluciones de limoneno en tetracloruro de carbono, empleando concentraciones 0.072-1.51 M. ($l = 0.098$ mm). Como banda clave elegimos la situada a 1645 cm^{-1} .

La ecuación resultante, ajustada por mínimos cuadrados es:

$$\frac{D}{l} = 6.18 \cdot M + 0.081$$

donde D es la densidad óptica de la banda clave, l el espesor de la célula en mm y M la concentración molar.

En la tabla 7 se dan los resultados en diversas muestras correspondientes a tres cosechas.

Los aldehidos alifáticos presentan la banda $\nu_{C=O}$ a la misma frecuencia y por encontrarse, además, en baja proporción no pueden ser valorados de un modo absoluto. Hemos realizado unas determinaciones semicuantitativas considerando el cociente entre las densidades ópticas de las bandas a 1730 cm^{-1} (n-octanal y n-decanal fundamentalmente, según los datos cromatográficos) y 1645 cm^{-1} (limoneno). Los resultados para diversas muestras se dan en la tabla 8.

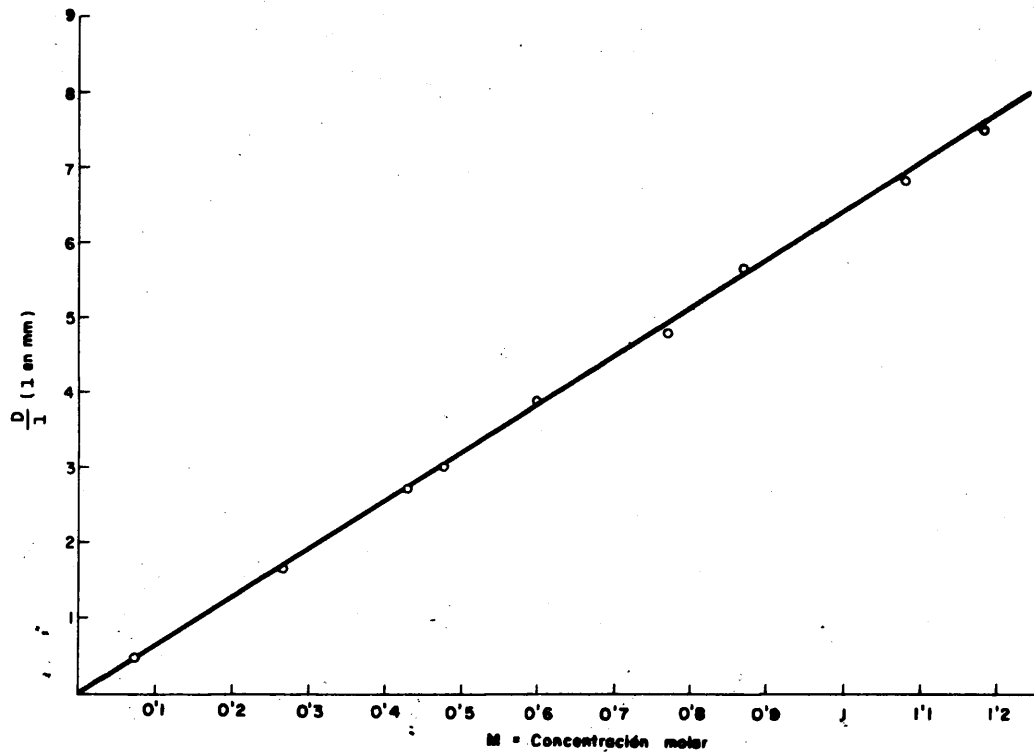


Fig. 7. Curva de calibrado del limoneno. Banda a 1645 cm^{-1} .

TABLA 7

ACEITES ESENCIALES DE NARANJA

CONTENIDO EN LIMONENO (% EN PESO)

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	% en peso
1. Naranja (expresión) B	España	1970	89.2
2. Naranja (+) G	España	"	92.9
3. Naranja (+) GF	Valencia	"	95.4
4. Naranja (expresión) MG	Valencia	"	93.2
5. Naranja oscura (expresión) MG	Murcia	"	89.6
6. Naranja clara (expresión) MG	Murcia	"	92.8
7. Naranja (la presión) R	Carcagente	"	90.5
8. Naranja (destilada) R	Brasil	"	94.2
9. Naranja (expresión) MG	Israel	"	94.3
10. Naranja (expresión) MG	Rhodesia	"	95.1
11. Naranja (expresión) f. p. MG	Florida	"	93.2
12. Naranja (expresión) f. m. MG	Florida	"	93.5
13. Naranja (expresión) G	Valencia	1971	93.1
14. Naranja (expresión) P	Murcia	"	95.1
15. Naranja (expresión) P	Sevilla	"	92.6
16. Naranja (expresión) B	Sevilla	"	91.5
17. Naranja (expresión) B	Florida	"	95.5
18. Naranja (expresión) B	Valencia	1972	92.0
19. Naranja (expresión) B	Sevilla	"	89.1

(+): método de obtención no especificado.

TABLA 8

ACEITES ESENCIALES DE NARANJA

RELACION ENTRE LAS DENSIDADES OPTICAS A 1730 cm^{-1} Y 1645 cm^{-1}

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	D 1730 cm^{-1} / D 1645 cm^{-1}
1. Naranja (expresión) B	España	1970	0.141
2. Naranja (+) G	España	"	0.100
3. Naranja (+) GF	Valencia	"	0.046
4. Naranja (expresión) MG	Valencia	"	0.076
5. Naranja oscura (expresión) MG	Murcia	"	0.148
6. Naranja clara (expresión) MG	Murcia	"	0.083
7. Naranja (la presión) R	Carcagente	"	0.120
8. Naranja (destilada) R	Brasil	"	0.067
9. Naranja (expresión) MG	Israel	"	0.067
10. Naranja (expresión) MG	Rhodesia	"	0.046
11. Naranja (expresión) f. p. MG	Florida	"	0.063
12. Naranja (expresión) f. m. MG	Florida	"	0.061
13. Naranja (expresión) G	Valencia	1971	0.095
14. Naranja (expresión) P	Murcia	"	0.079
15. Naranja (expresión) P	Sevilla	"	0.101
16. Naranja (expresión) B	Sevilla	"	0.136
17. Naranja (expresión) B	Florida	"	0.073
18. Naranja (expresión) B	Valencia	1972	0.108
19. Naranja (expresión) B	Sevilla	"	0.153

(+): método de obtención no especificado.

Los tantos por ciento en peso de limoneno y su concentración relativa respecto a los aldehidos no son, según muestran las mencionadas tablas, característicos del origen. Sólo dentro de una misma cosecha el contenido en limoneno se ha mostrado inferior en las muestras de origen sevillano con respecto a las procedentes de Valencia o Murcia.

2) Fraccionamiento por cromatografía en columna.

En la tabla 9 se dan los tantos por ciento en peso de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de tres muestras de aceites esenciales de naranja cultivada en las provincias de Sevilla, Valencia y Murcia (5, 18 y 19 de la tabla 7).

Los resultados indican que las proporciones de limoneno (arrastrado con n-hexano) y aldehidos (arrastrados con n-hexano-acetato de etilo) siguen en las mencionadas muestras unas diferencias concordantes con las obtenidas en el análisis infrarrojo de los aceites totales.

TABLA 9

ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

Fraccionamiento cromatográfico de las muestras (1)

Eluyente	Muestras		
	Valencia	Murcia	Sevilla
n-hexano	92.20	91.30	90.95
n-hexano-acetato de etilo	4.91	5.35	5.73
acetato de etilo	2.50	2.47	2.41
metanol	0.40	0.41	0.32

(1) Tanto por ciento en peso.

3) Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.

a) Fracción terpénica.

La concentración de limoneno en la fracción terpénica del aceite esencial de naranja es del orden del 98 %. Por ello las bandas de este componente son las que dominan en el espectro.

A pesar de su pequeña concentración, (alrededor del 1 %), el mirceno puede observarse a 1595 cm^{-1} superpuesto a una banda del limoneno. La banda a 720 cm^{-1} es probablemente debida al terpinoleno. Los demás componentes de esta fracción terpénica son minoritarios y de estructura molecular semejante a la del limoneno y, por tanto, como ya hemos indicado, no son observables por la técnica infrarroja, al menos con suficiente certeza.

Las figuras 8 y 10 corresponden a las fracciones terpénicas de tres muestras de aceite esencial de naranja (5, 18 y 19 de la tabla 7). Aunque no existen diferencias muy marcadas, las relaciones entre las densidades ópticas de las bandas a 1680 y 1595 cm^{-1} muestran que el contenido relativo mirceno/limoneno es superior en la muestra de origen sevilliano.

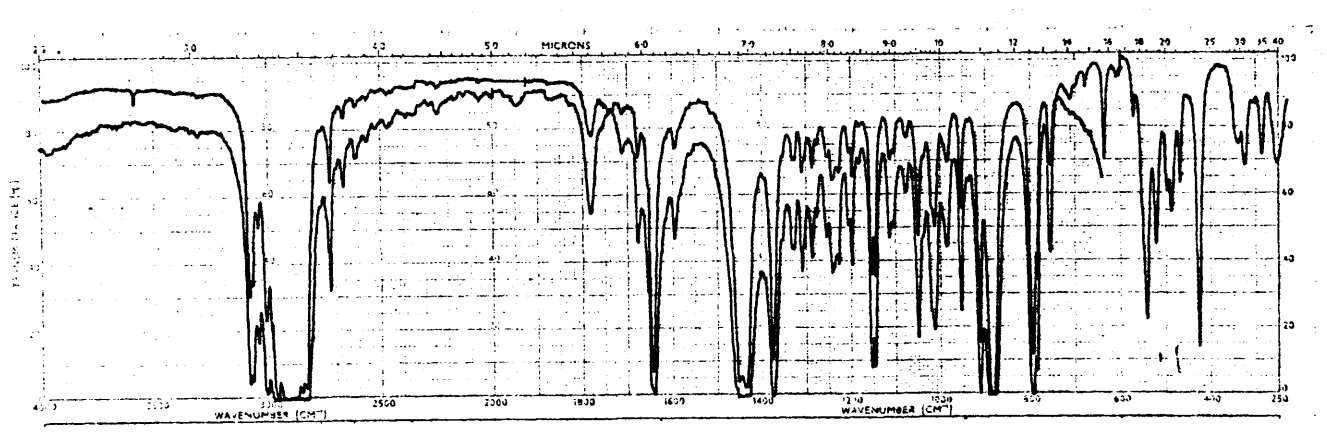


Fig. 8. Fracción terpénica. Naranja expresión Valencia (1972);
l = 0.1 mm y 0.03 mm.

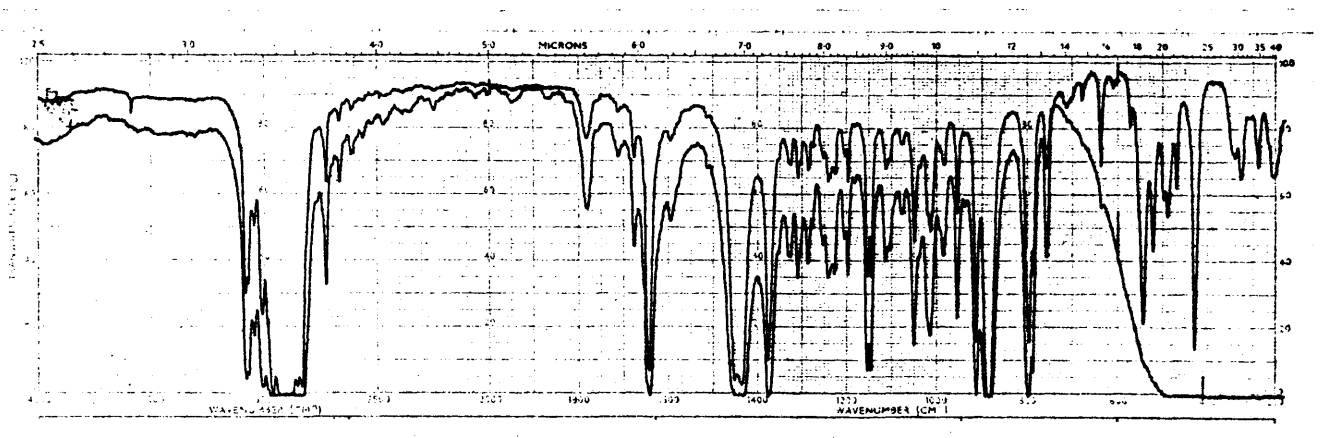


Fig. 9. Idem, Murcia (1970).

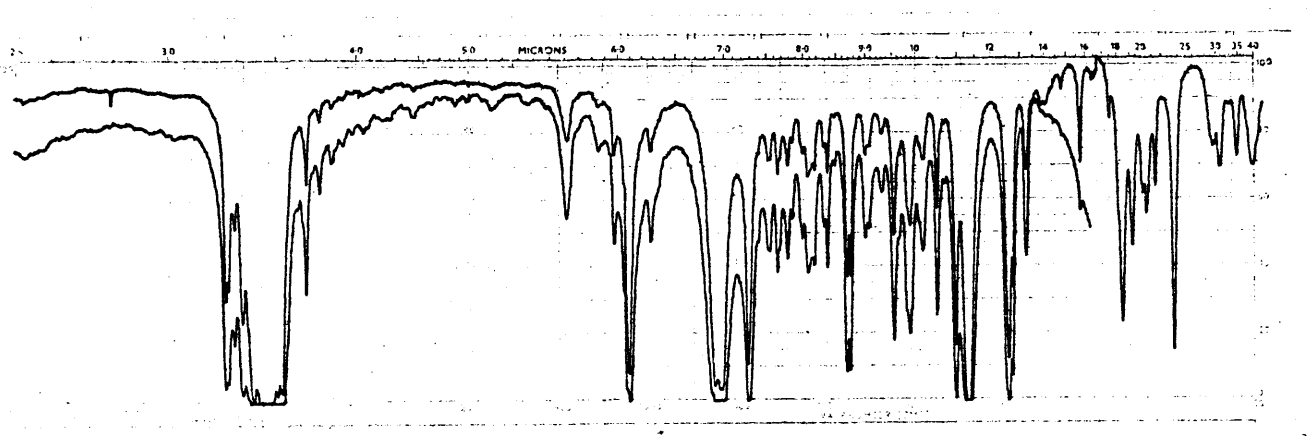


Fig. 10. Idem, Sevilla (1972).

b) Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Está constituida fundamentalmente por aldehidos, esterres y alcoholes. Las figuras 11-13 corresponden a los espectros de tres fracciones en disolución en tetracloruro de carbono.

Son características las bandas de los aldehidos de larga cadena, como n-octanal y n-decanal (2930, 2855, 1730 y 1720 cm^{-1}) y la del grupo carbonilo del citral (1680 cm^{-1}). Los aldehidos α, β -insaturados de cadena lineal, como el 2-hexen-1-al, 2-octen-1-al y 2-decen-1-al se hacen visibles en la banda a 1692 cm^{-1} .

La relación de las densidades ópticas de las bandas a 1692 y 1680 cm^{-1} , distinta para cada muestra, depende, por tanto, de la relación aldehidos α, β -insaturados lineales/citral.

Los esterres normales absorben en la región de 1740 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$). La banda correspondiente se solapa con la de los aldehidos alifáticos de cadena lineal; sin embargo, existen otras bandas características, por ejemplo a 1240 cm^{-1} (acetato de geranilo), 1170, 1100 y 1035 cm^{-1} (caprilato y caproato de etilo) etc., que pueden dar una información importante sobre este tipo de compuestos.

En esta fracción pueden identificarse por infrarrojo varios alcoholes, como el linalol (3615 y 3545 cm^{-1} , en disolución diluida en Cl_4C y 920 cm^{-1}) y carveol (bandas más características a 1642 y 890 cm^{-1} , correspondientes a vibracioo

nes del doble enlace terminal). El estudio de la región ν_{O-H} en disoluciones muy diluidas (con células de 1 cm y 4 cm de espesor a fin de eliminar las asociaciones moleculares) permite detectar la presencia de otros alcoholes. Así, los alcoholes primarios del tipo octanol, nonanol, etc., se revelan por el hombro a 3640 cm^{-1} . Por otra parte, el desplazamiento de la banda del linalol a 3615 cm^{-1} hacia mayores frecuencias así como el aumento de la relación de densidades ópticas D_{3615}/D_{3545} dan información sobre la presencia de alcoholes como geraniol y citronelol, que se confirma además en otras regiones del espectro.

El examen cuidadoso de los espectros de las tres fracciones estudiadas, registrados en diferentes condiciones, muestra diferencias apreciables, por ejemplo, contenidos en citral y otros aldehidos α, β -insaturados que pueden relacionarse con la calidad de la esencia.

En la tabla 10 se dan los números de onda medidos en los espectros registrados en disolución o en fase líquida y las atribuciones correspondientes.

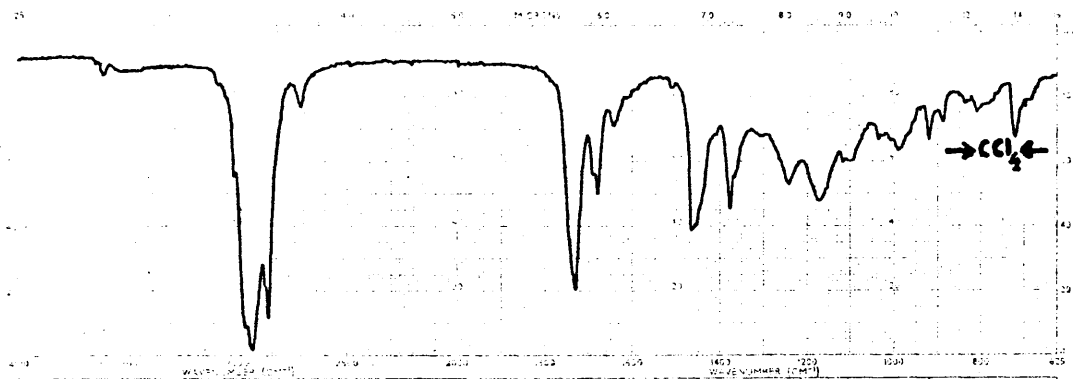


Fig. 11. Fracción n-hexano-acetato de etilo en CCl_4 0.1 g/cc; $l = 0.1$ mm. Naranja expresión Valencia (1972).

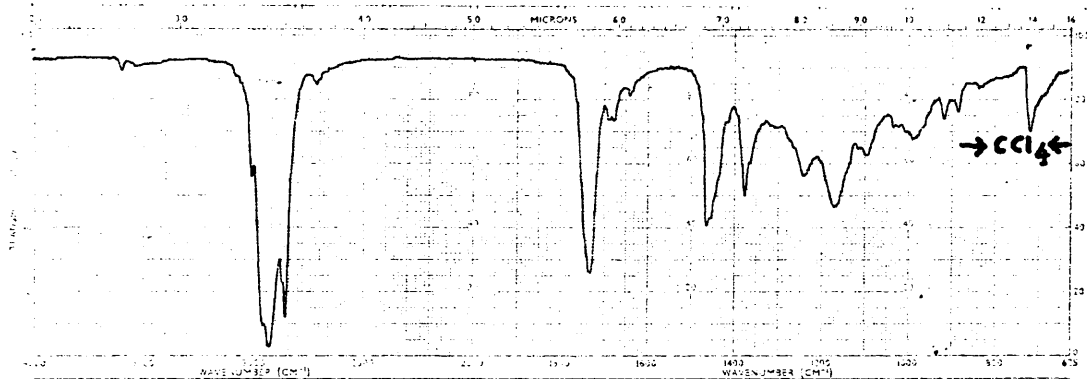


Fig. 12. Idem, Murcia (1970).

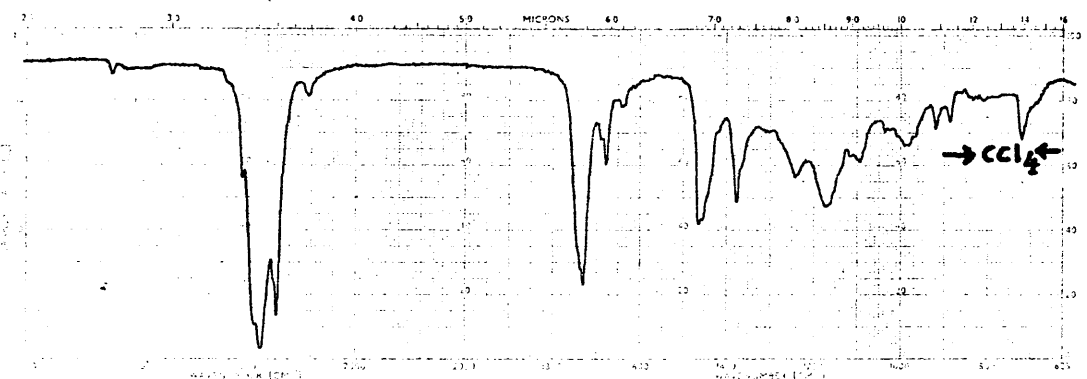


Fig. 13. Idem, Sevilla (1972).

TABLA 10Aceite esencial de naranjaFracción n-hexano-acetato de etilo. En Cl_4C Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

cm^{-1}	Componente
3640 L	alcoholes primarios (n-octanol)
3610	linalol
3540	linalol
3080	linalol
3010	linalol + citral
2960	n-decanal + n-octanal + linalol + citral
2930	n-decanal + n-octanal + linalol + citral
2860	n-decanal + n-octanal
2720	n-decanal + n-octanal + citronelal
1740	esteres (caproato de etilo + caprilato de etilo + acetato de geranilo)
1730	n-decanal + n-octanal + citronelal
1692	2-octen-1-al + 2-hexen-1-al + 2-decen-1-al
1680	citral (geranial + neral)
1642	linalol + carveol + citronelal
1612	citral
1465	n-decanal + n-octanal + linalol
1455	varios
1445	varios
1420	varios
1380	linalol + n-decanal + n-octanal + citral
1370	varios
1240	acetato de geranilo + caprilato de etilo + caproato de etilo
1170	n-decanal + caprilato de etilo + caproato de etilo

TABLA 10 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1160 L	
1140 L	
1115	linalol + citronelal + citral
1110	
1100	caprilato de etilo + caproato de etilo
1055	citronelol + alcoholes alifáticos primarios
1035	n-decanal + n-octanal + caprilato de etilo + caproato de etilo
1025	citronelal
1010	
995	linalol
990	n-decanal + n-octanal
980	citronelal
920	linalol
890	carveol + n-octanal
835 (+)	linalol
830 (+)	citronelal
720 (+)	n-decanal + n-octanal etc.
695 (+)	linalol
540 (+)	citral

(+): medidos en fase líquida.

c) Fracción acetato de etilo.

Con este disolvente se arrastra de la columna cromatográfica una fracción constituida en su mayor parte por sustancias no volátiles, como flavonas, cumarinas y ácidos.

Las figuras 14-16 corresponden a los espectros de las fracciones acetato de etilo, en forma líquida, de las tres muestras cromatografiadas. Los números de onda y la interpretación de las bandas correspondientes se indican en la tabla 11.

En los citados espectros aparecen bien definidas las bandas de la tangeretina (1513, 1268, 1077, 1020, 1008, 655, 572, 510 cm^{-1}) y nobiletina (1513, 1268, 1331, 1302 cm^{-1}). Otras flavonas por ser minoritarias y de estructura similar, presentan bandas que se superponen a las de la tangeretina y nobiletina, y por tanto son difícilmente observables. Esto sucede con la sinensetina (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona) (1513, 1055 cm^{-1}), 5,8-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (3430 cm^{-1}) y 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (1248, 1145 cm^{-1}).

La absorción a 3400 cm^{-1} es debida al grupo O-H de alcoholes, fundamentalmente α -terpineol, que también absorbe a 1145 y 915 cm^{-1} .

Las bandas situadas a 1735 y 1715 cm^{-1} corresponden, respectivamente, a cumarinas y ácidos. Estos últimos también se ponen de manifiesto por la absorción compleja a

2800-2500 cm^{-1} .

Los espectros de las tres muestras estudiadas revelan notables diferencias en cuanto al contenido relativo de flavonas, cumarinas y ácidos, lo que se hace patente mediante la relación de las densidades ópticas de las bandas a 1735, 1715, 1640, 1605, 1513 cm^{-1} , etc.

d) Fracción metanol.

Las figuras 17-19 muestran los espectros infrarrojos de las fracciones arrastradas con alcohol metílico. No hemos identificado los componentes de esta fracción, sin embargo, algunas de las bandas son características de parafinas, ceras y compuestos con grupos OH e insaturados.

El análisis de esta fracción indica la existencia de un residuo inorgánico que contiene sobre todo calcio y sodio.

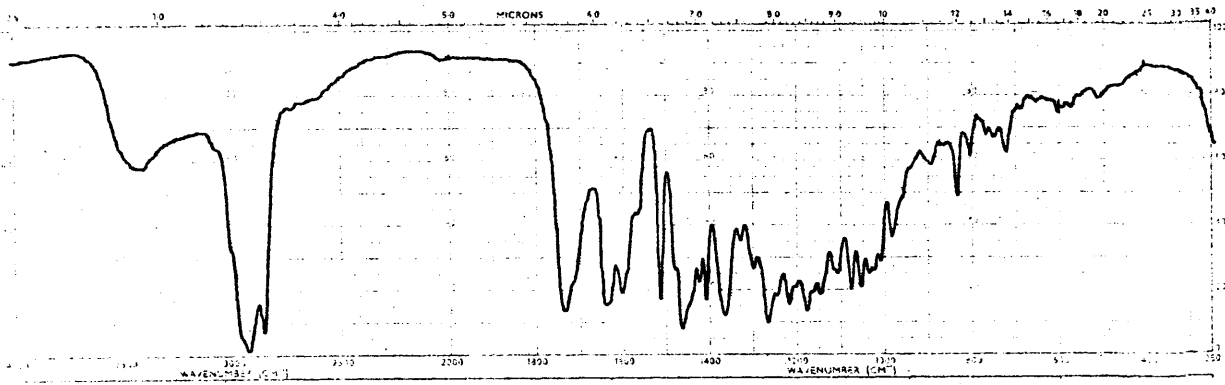


Fig. 14. Fracción acetato de etilo, film.
Naranja expresión Valencia (1972).

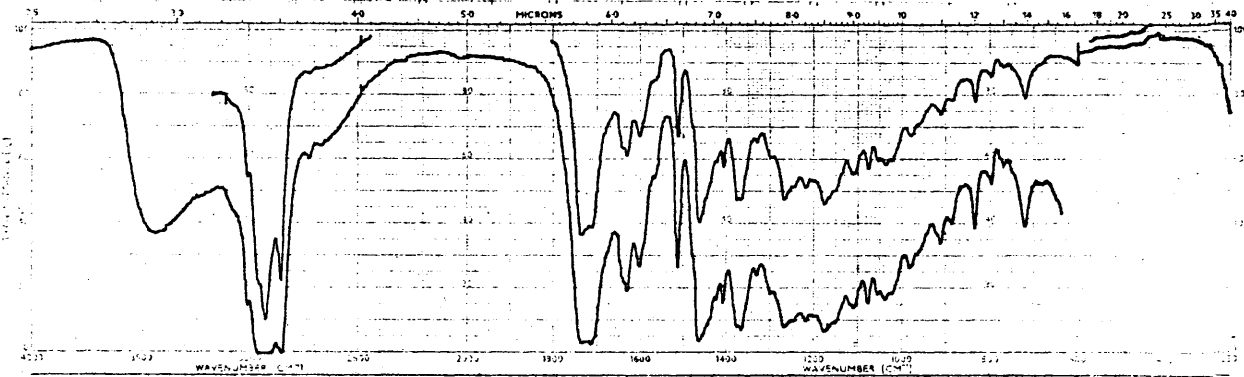


Fig. 15. Idem, Murcia (1970).

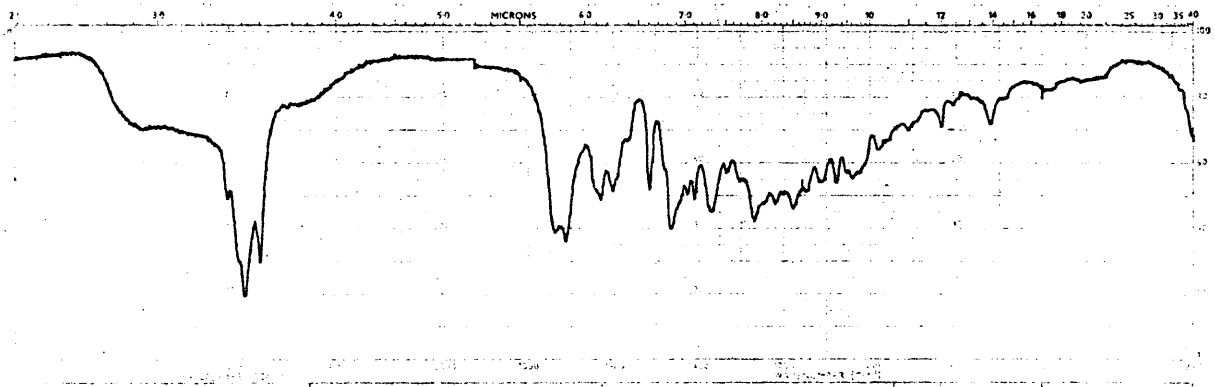


Fig. 16. Idem, Sevilla (1972).

TABLA 11

Aceite esencial de naranja

Fracción acetato de etilo

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3625 (+)	terpineol + linalol
3540 (+)	linalol
3430	terpineol
3010	tangeretina
2960	tangeretina + terpineol + ceras
2930	terpineol + ceras
2855	tangeretina + nobiletina + terpineol + + ceras
1735	cumarinas + ceras
1715	ácidos
1645	flavonas (tangeretina + nobiletina)
1635 L (+)	sinensetina
1605	cumarinas + sinensetina + tangeretina
1590 L	tangeretina + nobiletina
1560	nobiletina
1513	tangeretina + nobiletina + sinensetina
1480	tangeretina + nobiletina
1462	tangeretina + nobiletina + ceras
1448 (+)	
1440 (+)	tangeretina
1422	nobiletina
1408	tangeretina
1378 L	tangeretina + nobiletina + terpineol
1365 (+)	
1331	nobiletina
1309	tangeretina
1302	nobiletina

TABLA 11 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1268	tangeretina + nobiletina
1260 (+)	
1255 (+)	
1248	ceras + heptametoxiflavona
1235 (+)	
1220	tangeretina + nobiletina + terpineol
1210 (+)	
1200 (+)	
1175	nobiletina + tangeretina
1165 (+)	
1145	nobiletina + heptametoxiflavona
1135 L (+)	terpineol
1115 (+)	
1110	nobiletina + tangeretina
1077	tangeretina
1055	heptametoxiflavona + sinensetina + terpineol
1038	tangeretina + nobiletina + terpineol
1020	tangeretina
1008	tangeretina
980	tangeretina + nobiletina
960 L	tangeretina + nobiletina
950 (+)	terpineol
940 L	ácidos
920 L	terpineol
910	nobiletina + terpineol
892	tangeretina

TABLA 11 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
778	terpineol
770	nobiletina + sinensetina + terpineol
748	nobiletina + sinensetina + cumarinas
720	ceras + nobiletina + sinensetina
688	sinensetina + heptametoxiflavona
655	tangeretina
600	tangeretina
572	tangeretina
510	tangeretina

(+): medidos en solución en Cl₄C

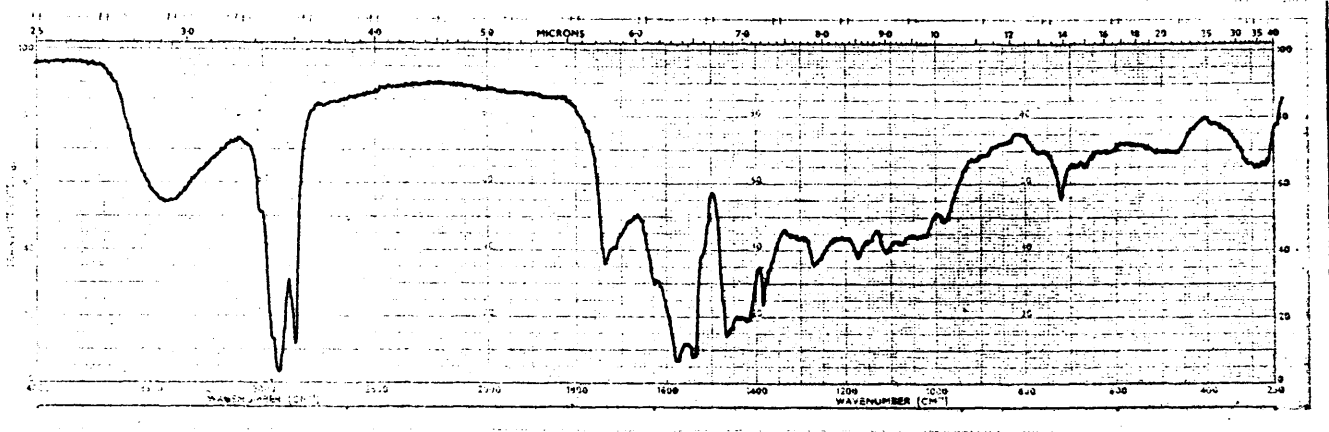


Fig. 17. Fracción metanol, en KBr.
Naranja expresión Valencia (1972).

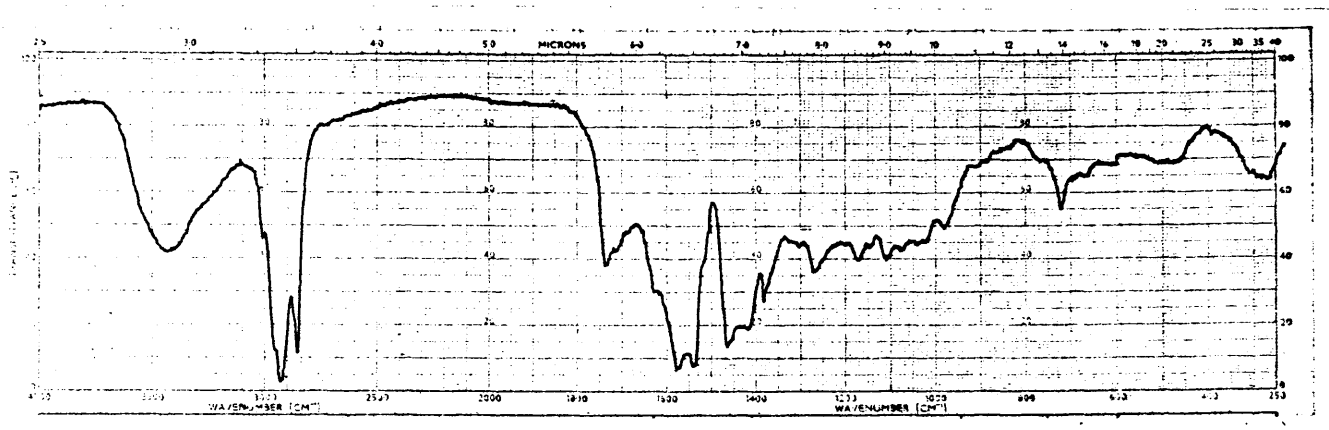


Fig. 18. Idem, Murcia (1970).

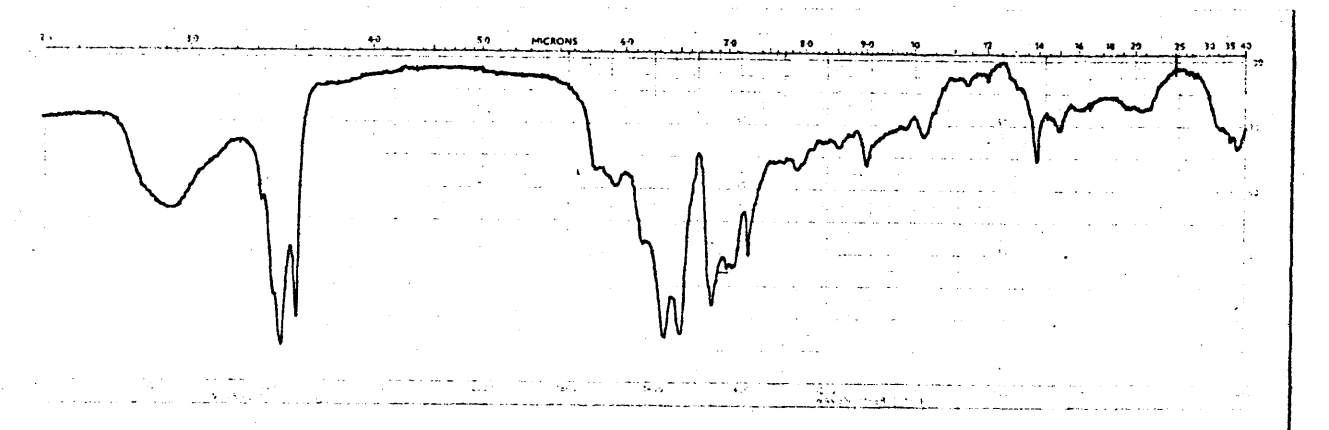


Fig. 19. Idem, Sevilla (1972).

4) Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.

El valor comercial de la esencia de naranja viene determinado fundamentalmente por su contenido en compuestos oxigenados y distribución porcentual de estos últimos.

Además de las especies químicas que hemos analizado en esta fracción por espectroscopía infrarroja, la bibliografía (41) cita otros componentes, que están en concentraciones pequeñas y que se pueden identificar por otras técnicas analíticas más precisas, como la cromatografía de gases.

La gran similitud que, por ejemplo, existe entre las estructuras moleculares de los aldehidos alifáticos de cadena lineal no permite que éstos puedan ser diferenciados por sus espectros infrarrojos en el caso del aceite esencial de naranja. Sin embargo, es fácil distinguirlos por cromatografía en fase de vapor.

Utilizando las condiciones experimentales ya citadas hemos identificado por los tiempos de retención de patrones puros los siguientes componentes: n-heptanal (1), n-octanal (2), n-nonanal (3), citronelal (4), linalol (5), n-decanal (6), neral (8), geranial (9) y acetato de geranilo (10). La numeración de estos componentes corresponde a la indicada en las figuras 20 y 21. El pico número siete lo hemos identificado tentativamente como terpinen-4-ol, comparando su retención relativa con la citada por la bibliografía (5).

Si bien los resultados no son genuinamente cuantitativos, al comparar los cromatogramas de las figuras 20 y 21 se advierten a simple vista diferencias significativas. El octanal, nonanal y linalol están en concentraciones superiores en la fracción de la esencia sevillana, que, sin embargo, es más pobre en neral y geranial. Se confirman así los resultados sobre el contenido en citral obtenidos mediante el estudio de los espectros infrarrojos de esta fracción.

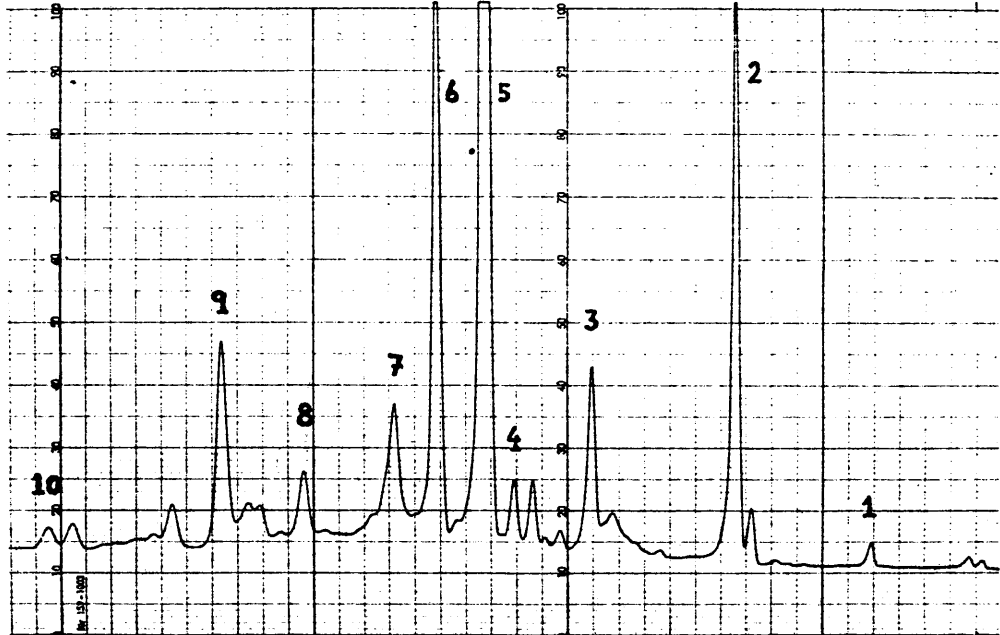


Fig. 20. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Naranja expresión Sevilla (1972).

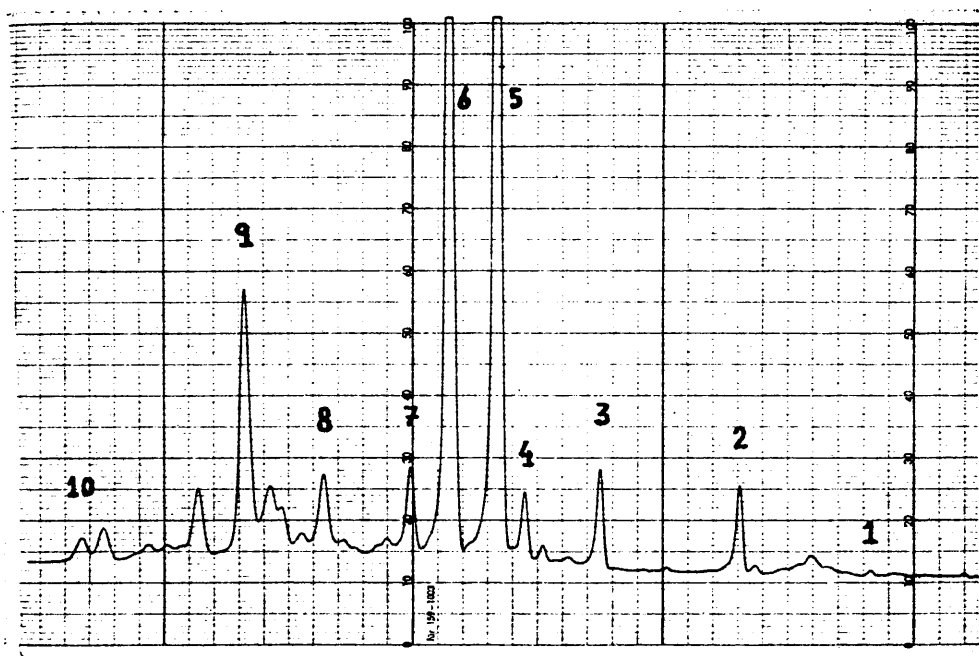


Fig. 21. Idem, Valencia (1972).

5) Determinación por espectrofluorimetría del antranilato de metilo en aceites esenciales de naranja.

Sobre el antranilato de metilo como componente del aceite esencial de naranja no existen resultados concordantes en los trabajos de la bibliografía (1), (12), (40), (41).

Aunque dentro de la instrumentación analítica la cromatografía de gases no tenga igual por su capacidad separadora, ésta se hace insuficiente cuando el número de componentes es elevado, como en el caso de los aceites esenciales.

Surge además otra limitación en esta técnica si las sustancias a analizar se encuentran en concentraciones tan pequeñas que rozan los límites de detección del instrumento. Por ello, no hemos visto con esta técnica el antranilato de metilo y hemos recurrido a la espectrofluorimetría, tan sensible a los compuestos aromáticos de este tipo, para la investigación de dicho componente en la esencia de naranja.

El espectro de excitación de las disoluciones de aceite esencial de naranja en alcohol etílico muestra una banda ancha entre 250 y 700 nm. En esta misma región espectral presenta excitación las cumarinas, flavonas y antranilato de metilo, por lo que la identificación de este último no se puede tampoco realizar por esta técnica de una manera categórica. De hecho, las disoluciones de esencia de naranja en alcohol etílico presentan una fluorescencia débil. Para obtener su espectro de excitación hay que utilizar sensibili-

dad y apertura de rendija considerables, de forma que en estas condiciones se advierte la influencia del disolvente.

Para determinar en los aceites esenciales de naranja los límites máximos de concentración de antranilato de metilo preparamos unas disoluciones de este producto en alcohol etílico. Cuando la concentración de antranilato es de $2.5 \cdot 10^{-8}$ g/l, la intensidad de fluorescencia de esta disolución se hace igual a la de aquella que contiene el aceite en 0.1 g/l. De donde se deduce inmediatamente que la concentración máxima de antranilato sería del $2.5 \cdot 10^{-5}$ % en peso.

ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE NARANJA.

1) Antecedentes.

Hasta la aparición de las modernas técnicas instrumentales de análisis, los estudios sobre el envejecimiento de las esencias se realizaban con objeto de establecer un criterio de control, basado en la medida de constantes físicas y químicas, tales como la densidad, índice de refracción, índice de peróxido y de acidez (1).

Se consideraba el proceso de envejecimiento como un fenómeno de polimerización y autooxidación que podía atenuarse mediante algunas sustancias dadoras de hidrógenos en forma de radicales (46).

Hasta el año 1963 no se comenzó a profundizar sobre el mecanismo del envejecimiento de los aceites esenciales de naranja. Rogers (6), por espectroscopía infrarroja y cromatografía de gases identificó algunos productos de oxidación de este aceite, como carveol, carvona, óxido de limoneno-1,2, así como los componentes más estables frente a los factores que originan este proceso. Algunos trabajos que cita la bibliografía tratan del estudio sobre la autooxidación del limoneno (47), (48), operando a una temperatura de 50° C en la oscuridad y a la luz, en ausencia de sensibilizadores. Los autores pudieron identificar nueve de los productos formados; sin embargo, los mencionados trabajos omiten el mecanismo de formación de los óxidos de limoneno.

2) Productos de oxidación.

Envejecimiento por acción de la luz ultravioleta.

Se han sometido seis muestras de aceite esencial de naranja de diferente origen (Murcia, Valencia, Florida frutos primerizos y frutos maduros, Rhodesia e Israel) a la acción de una lámpara de xenon durante 8, 24 y 102 horas. Los cambios más importantes observados en los espectros totales han sido: aumento de la banda típica de ácidos a 1715 cm^{-1} ; aumento de la absorción a 1678 cm^{-1} (carvona); disminución de la absorción a 1595 cm^{-1} (mirceno); disminución de la banda a 1510 cm^{-1} (flavonas); aumento de la absorción a 1105, 1075, 1040, 940 cm^{-1} .

En igualdad de condiciones, la esencia más vulnerable es la procedente de Rhodesia, y dentro de las dos muestras españolas estudiadas, la procedente de Valencia es más afectada que la de Murcia. Esto se puede explicar por el contenido en flavonas, como veremos más adelante.

Envejecimiento por acción del calor.

Con el fin de acelerar el proceso de envejecimiento, se han sometido 17 muestras a la acción del calor (60°C) durante 30, 85 y 230 horas (muestras 1-17 de la tabla 7).

Los cambios experimentados son mayores que por acción de la luz ultravioleta y similares, por otra parte, a los que se producen por un prolongado almacenamiento (fig. 22-24). Las muestras calentadas 30 horas a 60°C no muestran diferen

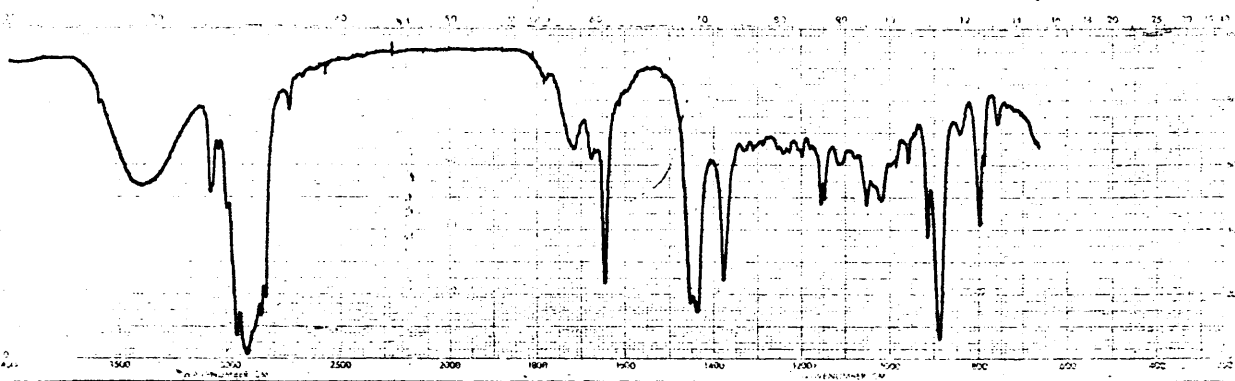


Fig. 22. Aceite esencial de naranja envejecido naturalmente (8 meses almacenado); $l = 0.03$ mm.

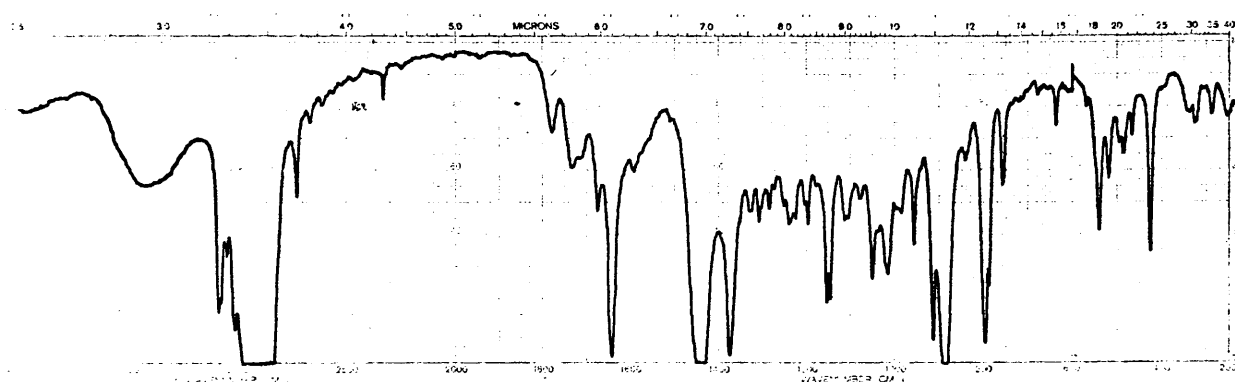


Fig. 23. Aceite esencial de naranja envejecido 85 h. a 60° C; $l = 0.05$ mm.

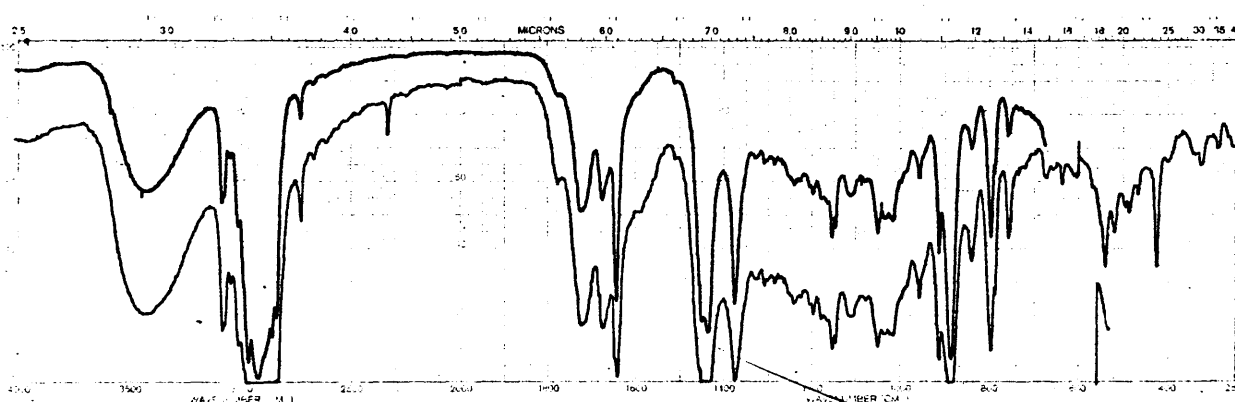


Fig. 24. Aceite esencial de naranja envejecido 230 h. a 60° C; $l = 0.05$ mm y 0.03 mm.

cias apreciables en los espectros, únicamente se observa una disminución de la banda a 1730 cm^{-1} , debida a la absorción carbonilo de los aldehidos, y también se hace patente la absorción O-H característica de oxidación.

El calentamiento durante 85 horas ya altera notablemente la mayoría de los aceites esenciales. En estas condiciones, las muestras menos estropeadas son la naranja oscura expresión (Murcia) y la naranja destilada del Brasil.

Los espectros de las muestras calentadas durante 230 horas muestran profundas alteraciones: gran absorción en la región O-H, originada por los diversos alcoholes formados; aumento de la absorción a 1715 cm^{-1} , debida a la formación de ácidos; incremento de las densidades ópticas de las bandas a $1678, 1250, 1110, 700, 400\text{ cm}^{-1}$ (carvona), 840 cm^{-1} (atribuida a los óxidos de limoneno), 1035 cm^{-1} (cis-carveol), 960 y 940 cm^{-1} (trans-carveol), 735 cm^{-1} (cis-2,8-p-mentadien-1-ol) y otras variaciones más difícilmente atribuibles por coincidir con bandas del limoneno.

Las muestras más alterables de las estudiadas han sido, en general, las españolas con excepción de la naranja oscura expresión (Murcia).

De nuevo la esencia prácticamente inalterable es la brasileña, lo que hay que atribuirlo a una gran proporción de flavonas.

Las figuras 22-24 representan los espectros correspondien-

tes a una muestra envejecida por almacenamiento durante 8 me ses y por calentamiento a 60° C durante 85 y 230 horas.

Los espectros infrarrojos de las fracciones correspondientes a una muestra envejecida permiten detectar con más facilidad los productos de envejecimiento que en el aceite esencial total.

El espectro infrarrojo de la fracción terpénica muestra que la densidad óptica de la banda a 1595 cm^{-1} , en donde absorbe el mirceno, ha disminuído, lo que parece indicar que es te componente es especialmente lábil. Como no se observan nue vas bandas correspondientes a otros terpenos, podemos descartar, en principio, la posibilidad de que existan isomerizaciones (por ejemplo, limoneno a terpinoleno), lo que en cierto modo es lógico por ocurrir estos procesos de isomerización en condiciones ácidas y energéticas.

Los espectros de las figuras 26-27 muestran los cambios producidos en la fracción n-hexano-acetato de etilo. Solo de la muestra más estable al envejecimiento hemos tenido volumen suficiente para realizar una cromatografía en columna. A pesar de ser poco alterable la citada muestra, se hacen patentes en los espectros de las figuras 26-27 el aumento de la densidad óptica de la banda a 890 cm^{-1} (productos oxigenados derivados del limoneno con doble enlace terminal $=\text{CH}_2$, como carvona, carveol, etc.) y a 840 cm^{-1} correspondiente a la for mación de óxidos de limoneno.

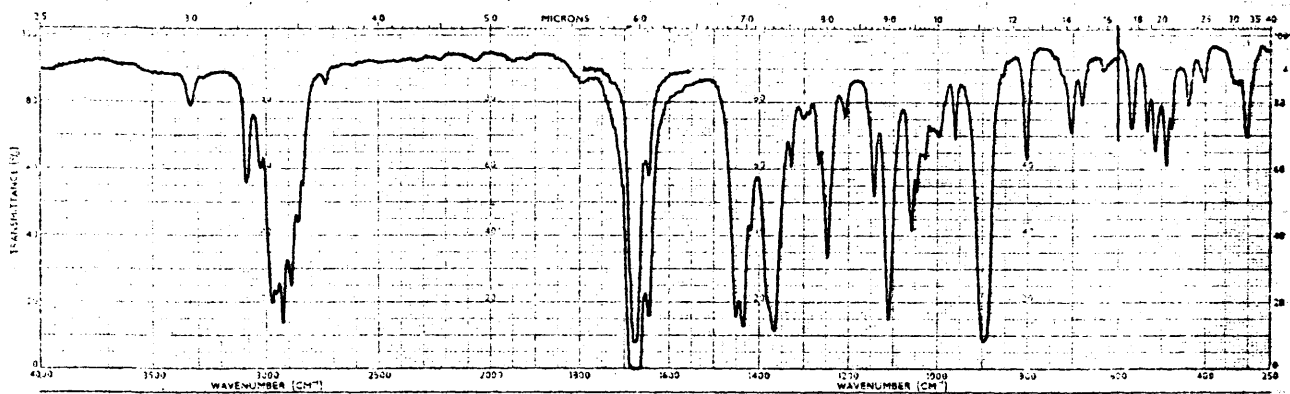


Fig. 25. Carvona; $l = 0.03$ mm.

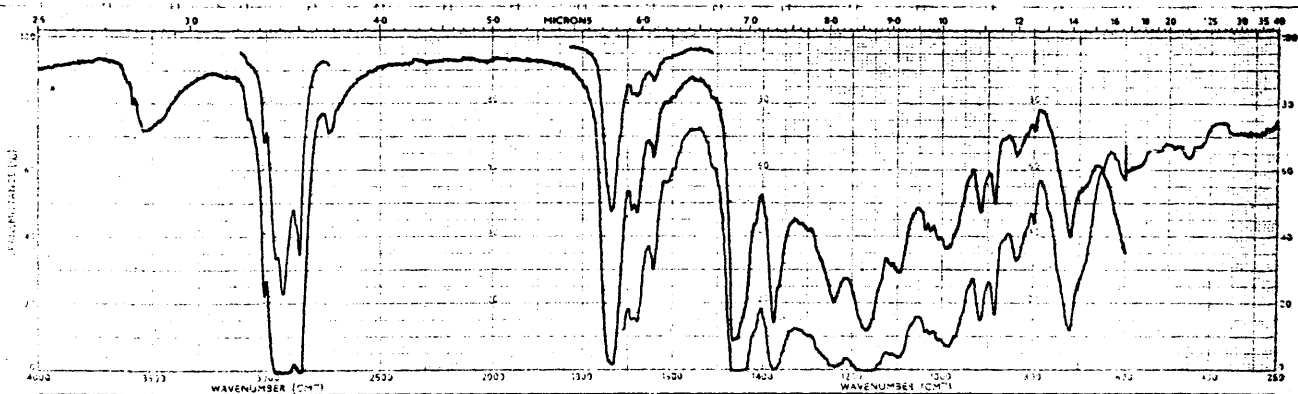


Fig. 26. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Naranja oscura expresión Murcia (1970); $l = 0.1$ mm, 0.03 mm y film.

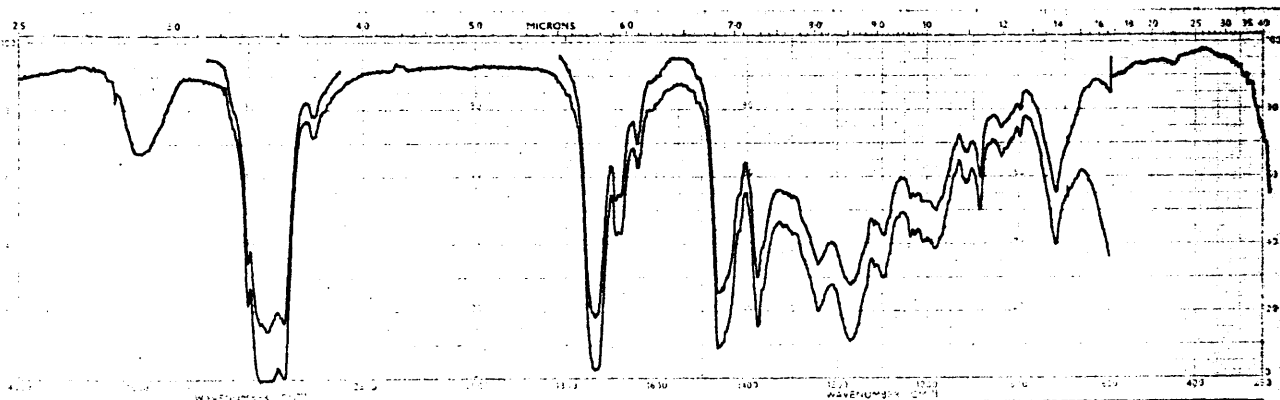


Fig. 27. Idem, envejecida 230 h. a 60° C; $l = 0.03$ mm y film.

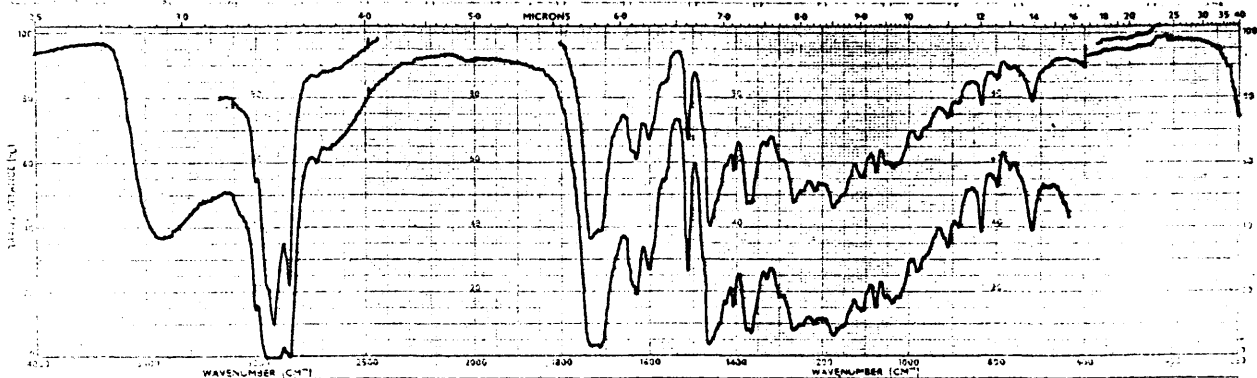


Fig. 28. Fracción acetato de etilo. Naranja oscura expresión Murcia (1970); $l = 0.03$ mm y film.

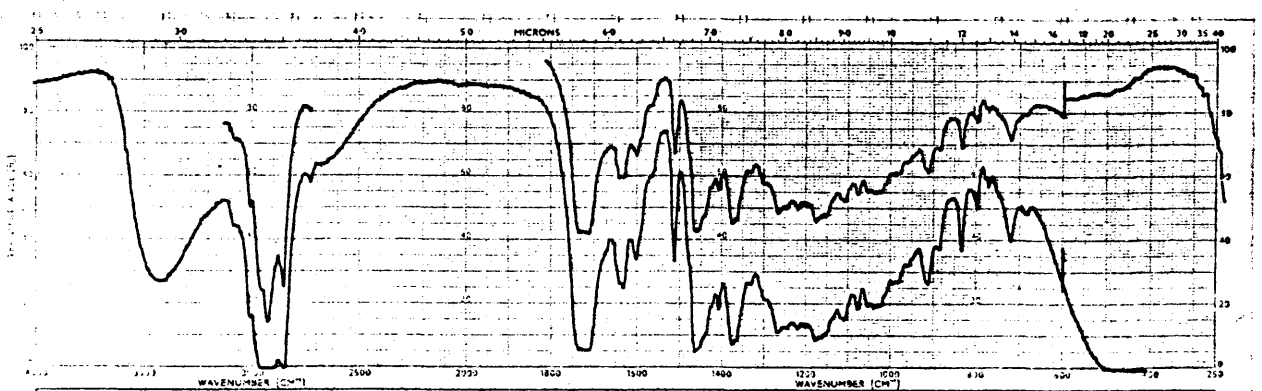


Fig. 29. Idem, envejecida 230 h. a 60° C; $l = 0.03$ mm y film.

La fracción acetato de etilo muestra un pequeño aumento de la concentración de terpineol (3450, 915, 835, 805 cm^{-1}) y disminución de flavonas (1640, 1513 cm^{-1}) (figs. 28-29).

Por último, la composición química de la fracción arrazada con metanol permanece prácticamente invariable.

Cromatografía de gases de las fracciones del aceite envejecido. Con objeto de determinar cuáles son las especies químicas más estables frente al proceso de envejecimiento y confirmar algunos resultados obtenidos por espectroscopía infraroja, hemos analizado por cromatografía de gases las fracciones de una muestra envejecida artificialmente por acción de la temperatura (60° C).

Los componentes que hemos identificado en la fracción terpénica son:

limoneno, α -pineno, β -pineno y mirceno. En la muestra envejecida, el área de pico del β -pineno permanece prácticamente constante, lo que parece indicar que esta sustancia es más estable que los demás terpenos mencionados. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Widmark y S. H. Blohm (49) que estudiaron la autooxidación de estas sustancias.

En las figuras 30 y 31 damos los resultados cromatográficos del análisis de la fracción oxigenada total obtenida de un aceite esencial de naranja envejecido 230 horas a 60°C. Se identificaron los siguientes componentes: n-octanal (1),

n-nonanal (2), citronelal (5), linalol (6), n-decanal (7), terpineol + neral (9), carvona (10), geranial (11) y acetato de geranilo (12).

Aunque por la naturaleza viscosa de esta fracción no ha ya sido posible reproducir la cantidad inyectada, puede observarse cómo la carvona aumenta con relación al geranial. También aumentan los picos 3 y 4 que hemos identificado como óxidos de limoneno por espectrometría de masas. El área del pico del n-decanal sufre una disminución con respecto a la del terpineol.

A la vista de estos resultados, los componentes más vulnerables frente a los factores que originan el envejecimiento son los aldehidos y terpenos. De estos últimos, y dentro de los identificados por nosotros, el más estable es el β-pinenos. Dentro de los compuestos oxigenados, los más estables son los alcoholes y ésteres.

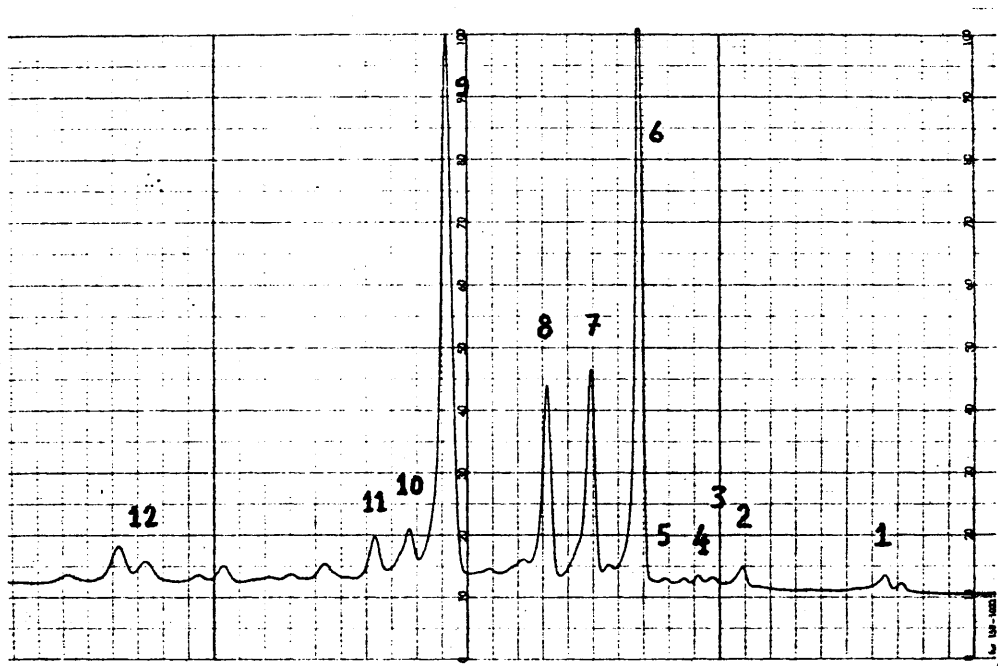


Fig. 30. Fracción oxigenada total.
Aceite esencial de naranja.

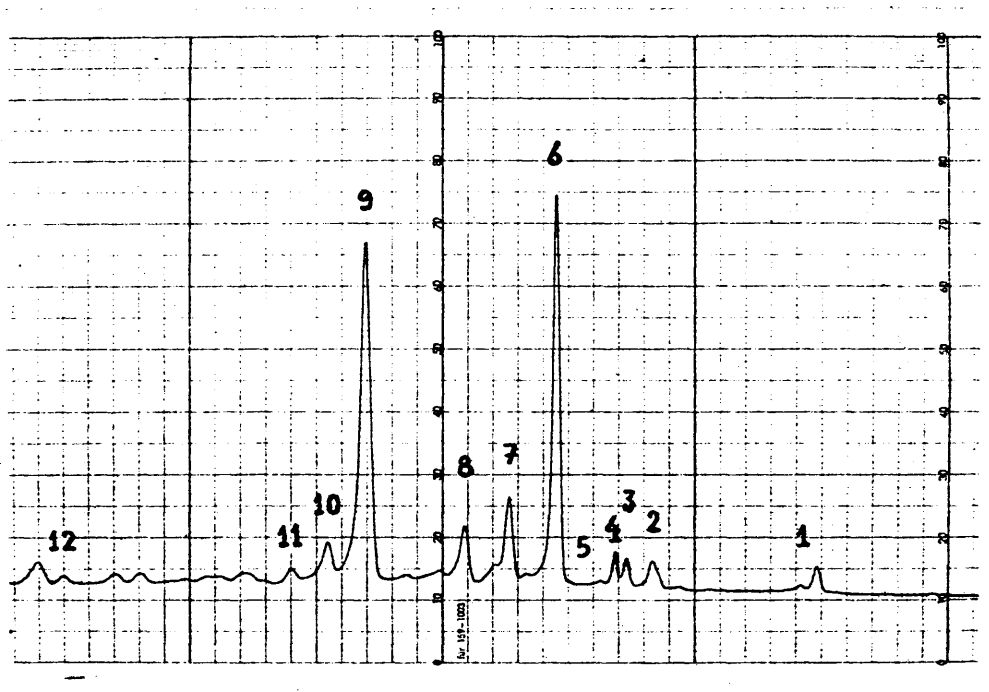


Fig. 31. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

Cromatografía de gases-espectrometría de masas. Con el fin de precisar mejor los productos de envejecimiento y comprobar si se forman los compuestos esperados de la autooxidación del limoneno, hemos analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas tres muestras de aceite esencial de naranja envejecido 230 horas a 60° C.

Los productos que hemos identificado corresponden a varios alcoholes, cetonas y óxidos derivados del limoneno, y son los siguientes:

Oxidos de limoneno-1,2 cis y trans:

En las condiciones experimentales utilizadas no nos ha sido posible conseguir una buena separación cromatográfica de ambos isómeros, por lo que hemos obtenido para los dos productos el mismo espectro, correspondiente a la mezcla de estas dos sustancias (36).

El espectro de masas (fig. 32) presenta un ion molecular a 152, lo que se demuestra por la existencia de los fragmentos a $m/e = M - 15$ y $M - 43$, que corresponden respectivamente a la pérdida de un grupo metilo e isopropileno (35).

cis y trans-2,8-p-mentadien-1-ol:

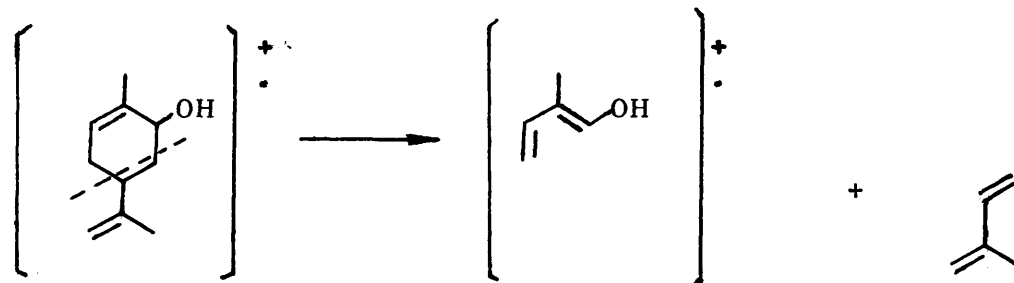
Los espectros de masas obtenidos para ambos isómeros se dan en las figuras 33 y 34. Presentan un ion molecular a 152 unidades de masa. Los fragmentos iónicos a $M - 18$ y $M - 15$ proceden de la pérdida de una molécula de agua y de un grupo metilo. El grupo isopropileno se deduce por la aparición de

iones a $M - 15 - 43$. Estos espectros de masas corresponden a los publicados en la bibliografía para estos productos (39).

Cis y trans-carveol:

Los espectros de masas de las figuras 35 y 36 corresponden a los dos isómeros del carveol ($P_m = 152$). Como era de esperar, aparecen los iones a $m/e = M - 15$ y $M - 18$, correspondientes a la pérdida de un grupo metilo y una molécula de agua.

El ion a $m/e = 84$ procede de la ruptura de la molécula por un proceso de retro-Diels-Alder:



Los espectros de ambos isómeros corresponden a los publicados en la bibliografía (39).

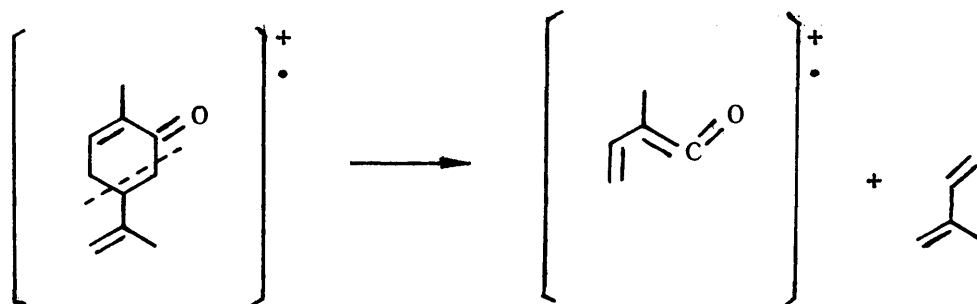
Carvona:

La figura 37 muestra el espectro de masas obtenido para esta sustancia.

Aparece un ion molecular a 150, lo que se confirma por los valores de los fragmentos a $M - 15$ y $M - 43$, que corres

ponden, respectivamente, a la pérdida de un grupo metilo e isopropileno.

El pico a 82 unidades de masa procede de la ruptura de la molécula por un proceso de retro-Diels-Alder, análogo al citado anteriormente:



El espectro coincide con el publicado en la bibliografía para esta sustancia (38).

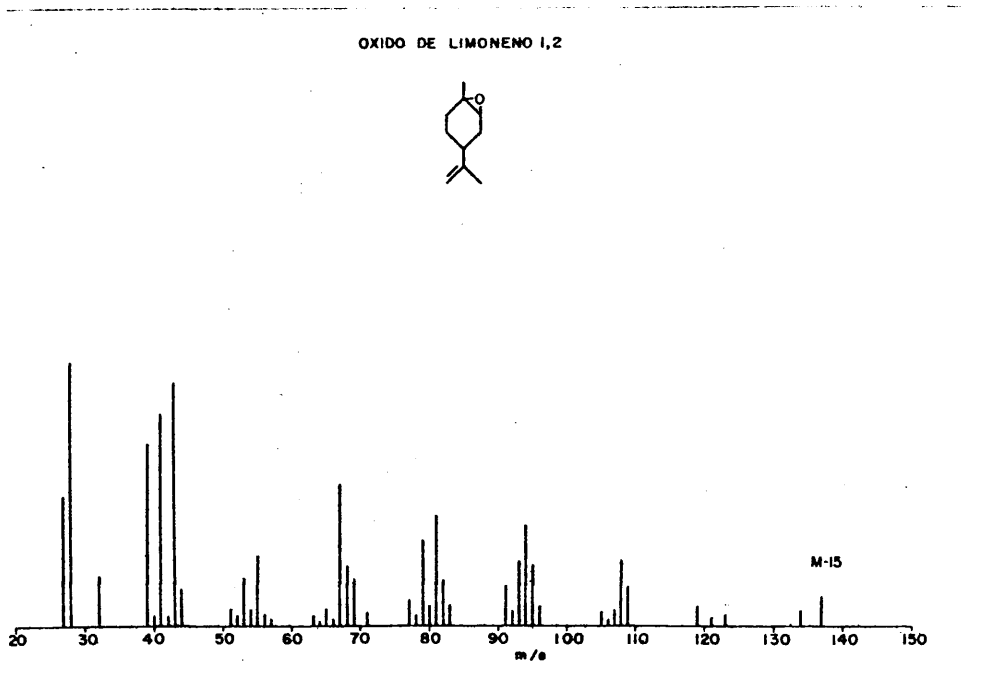


Fig. 32. Espectro de masas del óxido de limoneno-1,2.

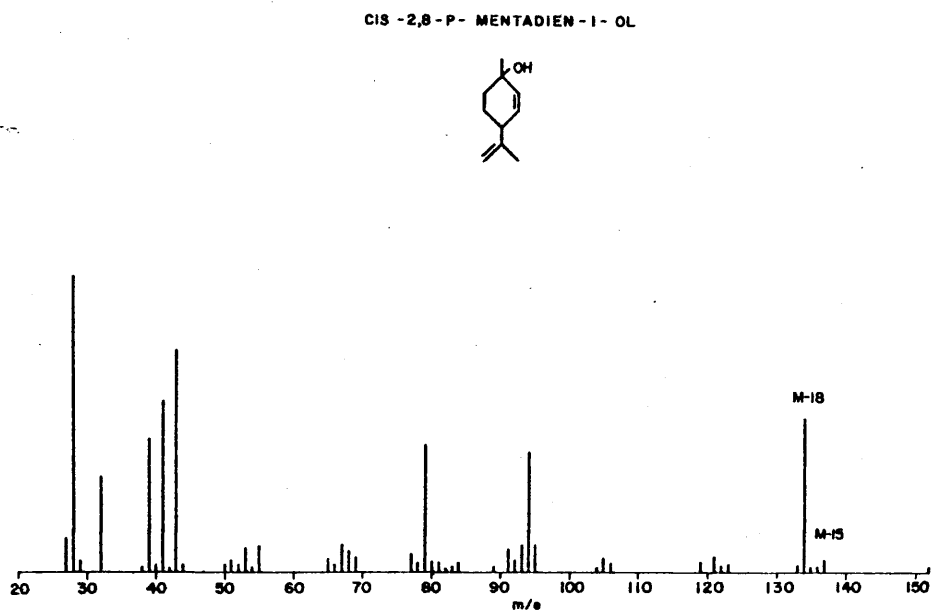


Fig. 33. Espectro de masas del cis-2,8-p-mentadien-1-ol.

TRANS-2,8 - P-MENTADIEN-1-OL

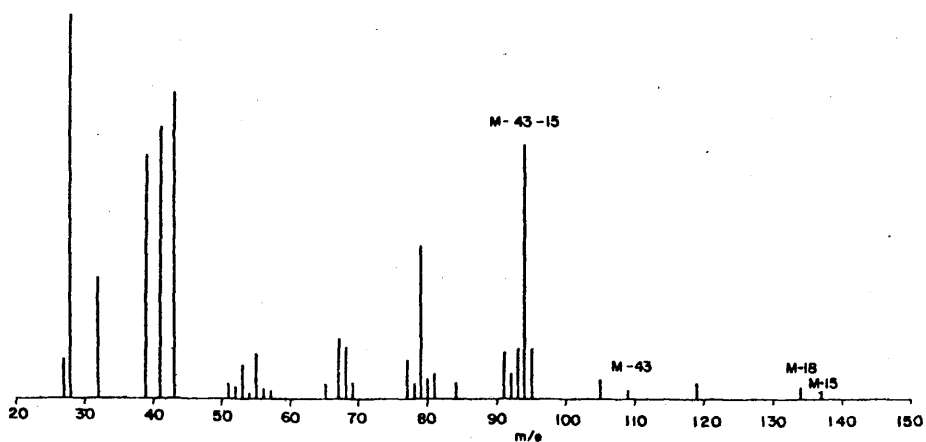


Fig. 34. Espectro de masas del trans-2,8-p-mentadien-1-ol.

TRANS - CARVEOL

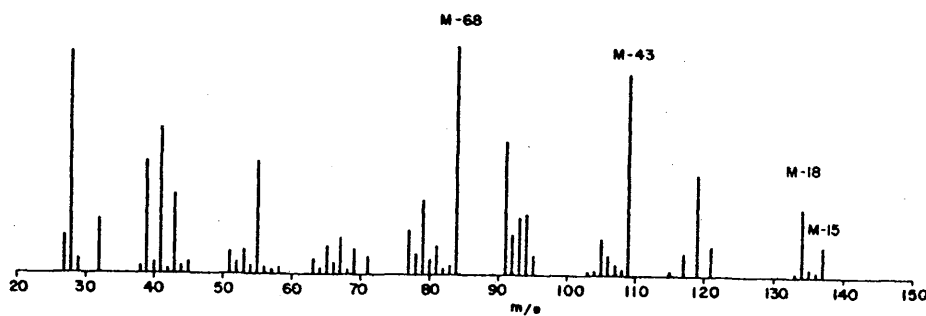
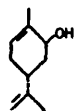


Fig. 35. Espectro de masas del trans-carveol.

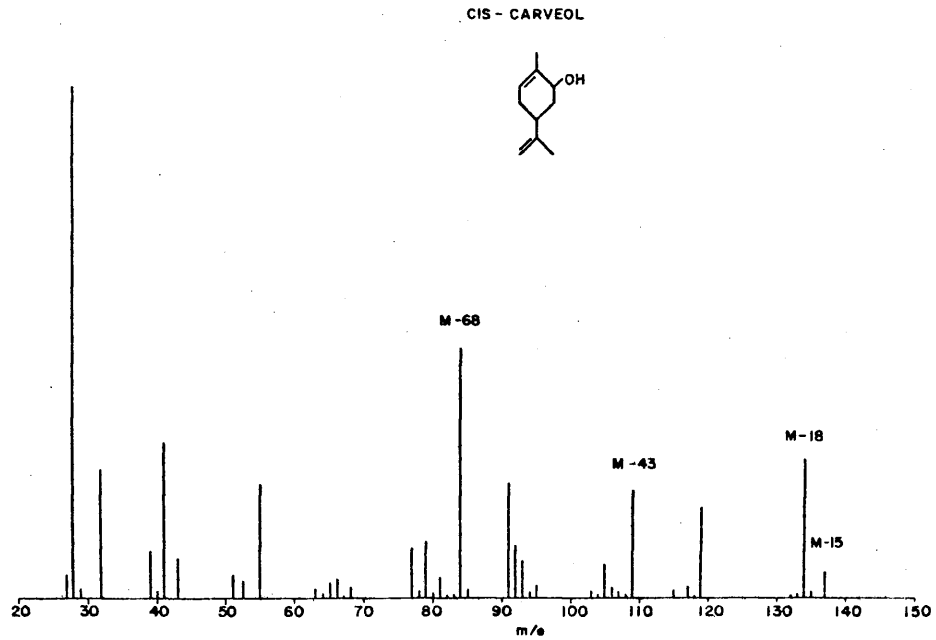


Fig. 36. Espectro de masas del cis-carveol.

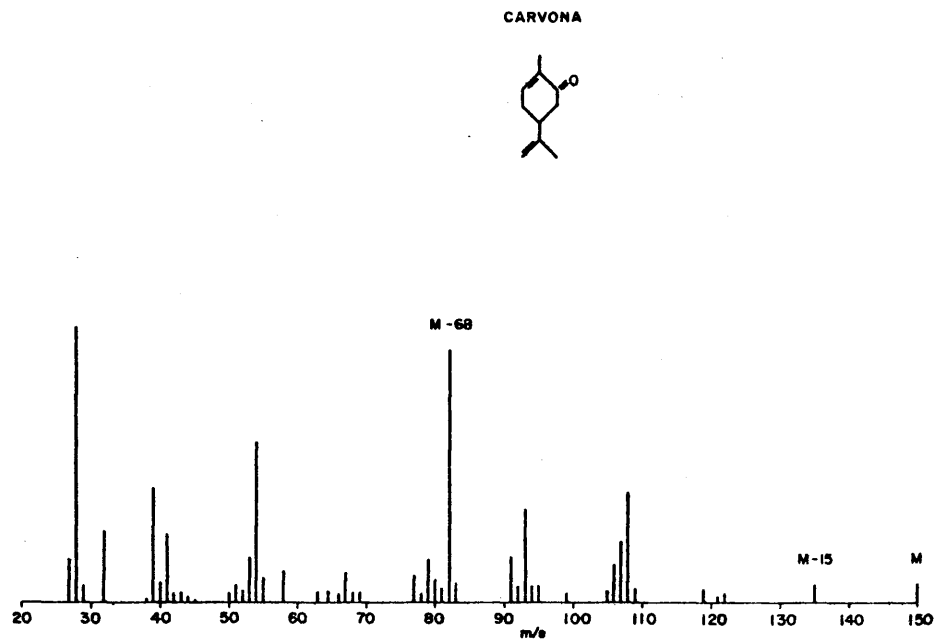


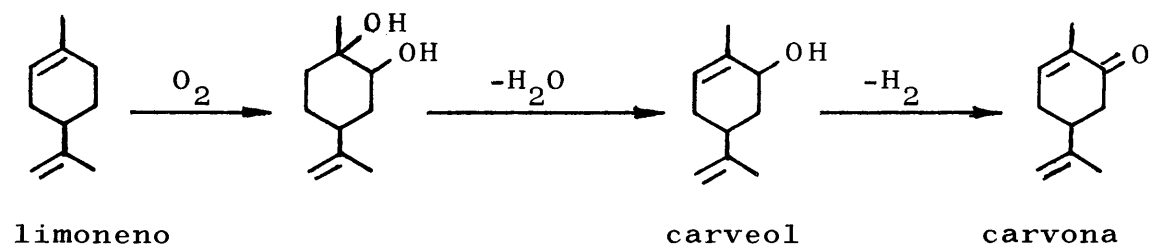
Fig. 37. Espectro de masas de carvona.

3) Mecanismo del proceso de envejecimiento.

De acuerdo a lo anterior, los productos de oxidación que hemos identificado en el proceso de envejecimiento del aceite esencial de naranja son los siguientes: óxido de limoneno-1,2 cis y trans; cis y trans-2,8-p-mentadien-1-ol; cis y trans-carveol y carvona.

Varias han sido las reacciones que se han postulado para explicar la formación de carveol y carvona a partir del limoneno. Según Simonsen (50) el oxígeno del aire forma un peróxido entre las posiciones 1 y 2. En esta molécula, se rompe el enlace O-O para dar un biradical que, en presencia de un hidrocarburo terpénico, daría limonenglicol-1,2.

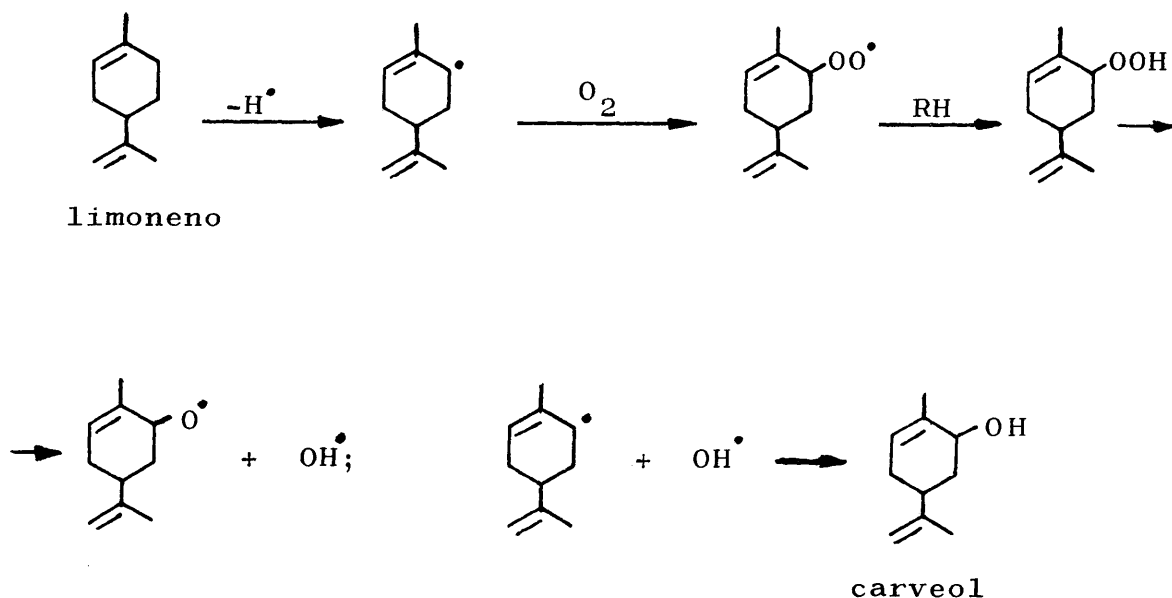
Este, por deshidratación, da carveol que se oxida posteriormente a carvona. El mecanismo transcurre así:



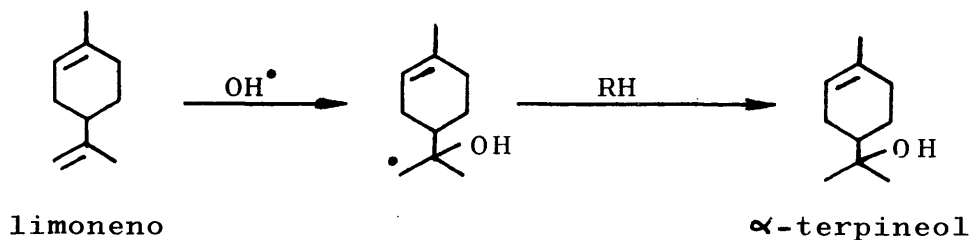
Aunque este proceso es teóricamente posible, realmente exige unas condiciones fuertemente ácidas para producirse

la deshidratación del glicol que conduce al carveol. El medio, débilmente ácido, del aceite esencial de naranja no es suficiente para justificar este mecanismo.

H. Flores (51) postuló para la formación del carveol y carvona la siguiente vía que implica formación de radicales:



La intervención de hidropéroxidos, por otra parte, podría explicar en el aceite envejecido el pequeño aumento de la concentración de terpineol que hemos observado y cuya formación se discute en la bibliografía (6). Así, los radicales OH^\bullet que intervienen en el proceso anterior reaccionarían de la siguiente forma:



Los resultados indican que este proceso sólo tiene lugar para un pequeño número de moléculas, dada la pequeña elevación que se produce en la concentración de terpineol cuando el aceite se envejece.

Si en los cromatogramas de las esencias envejecidas de naranja (fig. 38) sumamos las áreas corregidas de los picos de alcoholes y carvona y por otro lado las áreas de los óxidos de limoneno y hallamos el cociente entre ambas sumas, los valores así obtenidos se aproximan a uno en menos de dos décimas. Esto parece indicar que, por cada molécula de óxido de limoneno que se forme, se producirá al mismo tiempo otra de alcohol o carvona.

Todos estos resultados apoyan el mecanismo que se indica en la figura 39 y que no es más que un caso particular del propuesto por G. A. Russell (52) para la autooxidación de sustancias hidrocarbonadas. Por tanto, pensamos que ésta es la vía por la que fundamentalmente transcurre la oxidación del limoneno en el aceite esencial de naranja, con intervención de radicales, cuando se forman óxidos de limoneno.

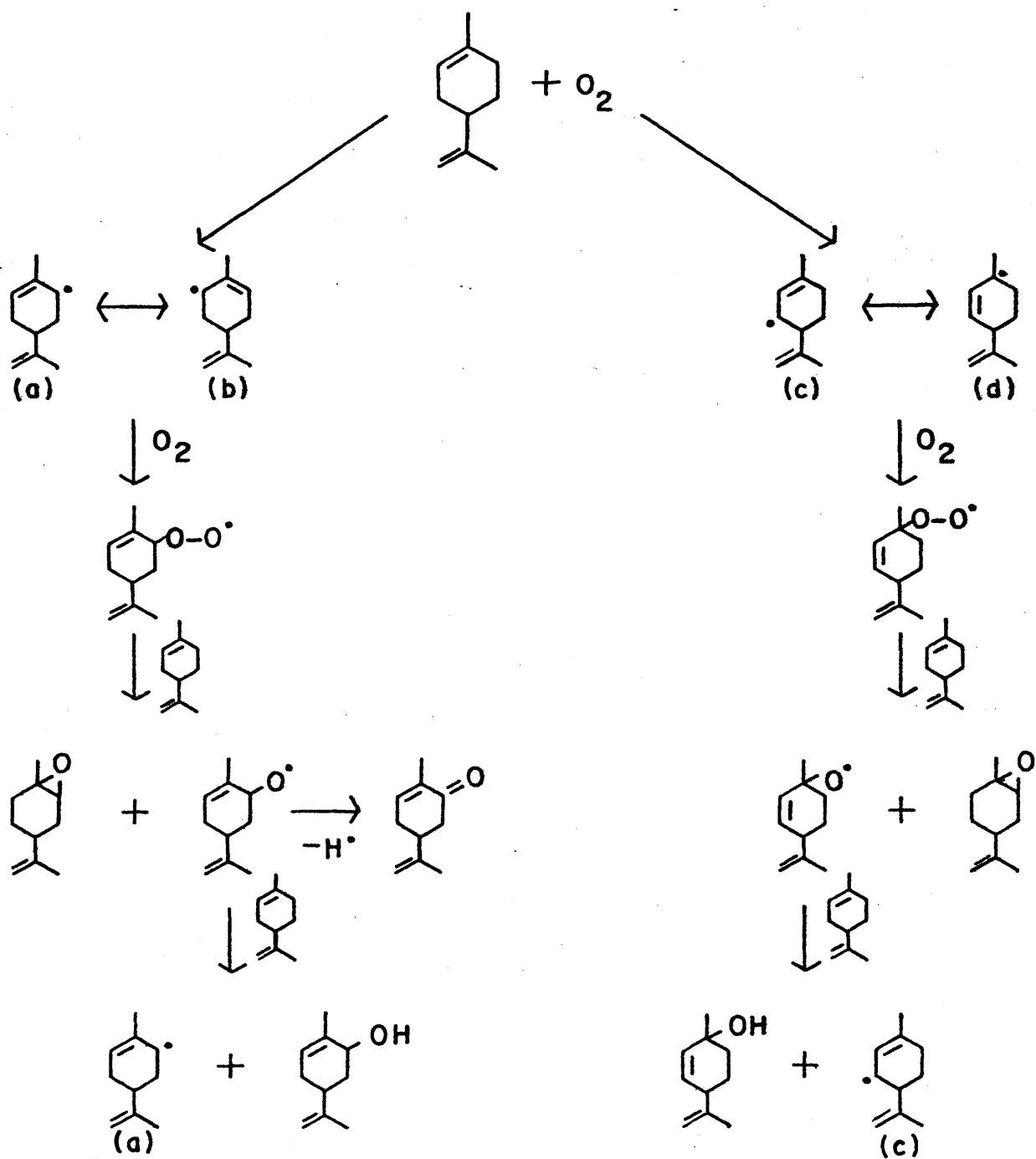


FIG. 39

Estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento. De acuerdo con el mecanismo mencionado, la oxidación del aceite se atenuaría inhibiendo la actuación de los radicales. Las sustancias que gozan de esta propiedad se llaman antioxidantes.

Un antioxidante puede inhibir una oxidación cediendo radicales hidrógeno (53):

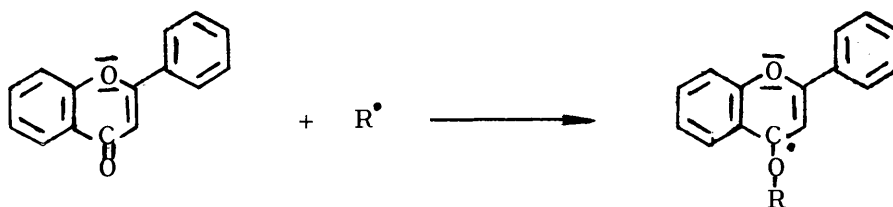


El nuevo radical puede estabilizarse por deslocalización de su carga electrónica o dimerizándose consigo mismo.

En el caso de que el antioxidante no posea hidrógenos lábiles, se puede unir a un radical para dar otro nuevo que puede dimerizarse (53):



Las flavonas, como antioxidantes, están incluidas en este último caso. Los radicales terpénicos que se unen a ellas forman un nuevo radical que se estabiliza por deslocalización de la carga en los tres ciclos, del siguiente modo:



La unión del radical R^\bullet en el grupo carbonilo de la flavona está de acuerdo con la disminución de la banda $n \rightarrow \pi^*$ (330 nm) en el espectro ultravioleta conforme avanza el envejecimiento del aceite (54).

El radical flavónico de la reacción anterior puede unirse a otro radical terpénico o dimerizarse, inhibiéndose así la autooxidación.

La naturaleza antioxidante de las flavonas queda demostrada experimentalmente cuando se mide la densidad óptica de la banda de absorción infrarroja a 3500 cm^{-1} en un aceite oxidado y se compara con la intensidad de la banda $n \rightarrow \pi^*$ (330 nm), proporcional a la concentración de flavonas, en el correspondiente aceite fresco. El grado de envejecimiento de la esencia, medido por la absorción a 3500 cm^{-1} , es mayor cuanto menor es el contenido en flavonas. Un ejemplo lo presenta la figura 40.

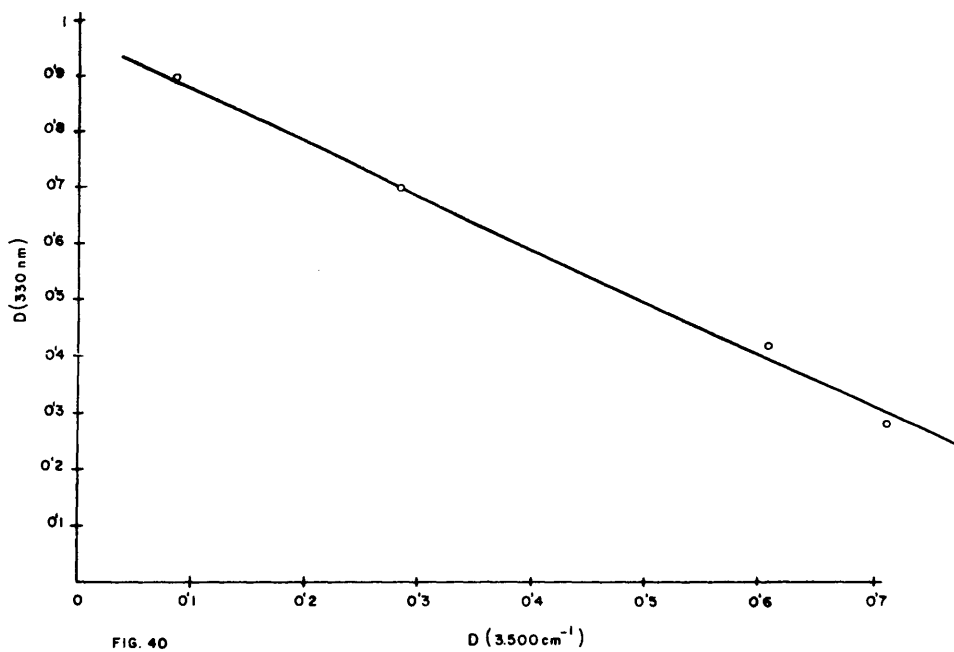


FIG. 40

Relación entre el grado de envejecimiento (absorbancia a 3500 cm^{-1}) y la absorbancia de la banda a 330 nm característica de las flavonas.

ACEITE ESENCIAL DE LIMON

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS: COMPOSICION QUIMICA.

Empleando diversos metodos analíticos se ha podido determinar la existencia de muchos componentes en el aceite esencial de limón que, agrupados por sus características químicas reseñamos a continuación:

Hidrocarburos terpénicos.

Esta fracción constituye alrededor del 60-70 % del aceite.

A. Di Giacomo (55) identificó en las esencias italianas α -pineno, trazas de canfeno, β -pineno, sabineno, mirceno, limoneno y γ -terpineno.

En los aceites esenciales de California Mac Leod (56) detectó además Δ^3 -careno, α -felandreno, α -terpineno, p-cimeno, terpinoleno y α ,p-dimetilestireno.

Hidrocarburos sesquiterpénicos.

Se trata de una fracción minoritaria (concentraciones de alrededor del 1 %).

Se disponen de pocos antecedentes acerca del análisis de la fracción sesquiterpénica del aceite de limón. Mac Leod (56), usando temperatura programada y columnas capilares identificó bergamoteno, cariofileno, bisaboleno y γ -cadineno, y A. Di Giacomo (41) cita además como componentes de este aceite al α -humuleno y β -humuleno.

Aldehidos y cetonas.

En las esencias de origen italiano A. Di Giacomo (55) de

tectó los aldehidos n-octílico (0.29 %), n-nonílico (0.15 %), n-decílico (0.04 %), citronelal (0.08 %), neral (1.1 %) y geranial (2.3 %). Se conoce también como componente la metilheptenona (0.15 %).

Además de los compuestos anteriores, O. Carpena (57) detectó en las esencias de origen español undecanal y dodecanal.

R. M. Ikeda (58) cita como componentes probables en las esencias de California todos los aldehidos de la serie alifática, desde el n-octanal hasta el heptadecanal, ambos inclusive.

Esteres.

Esta fracción se encuentra aproximadamente en las proporciones del 1.5 % y está constituida por los ésteres del ácido acético (acetato de geranilo, nerilo, linalilo, octilo, nonilo, decilo y citronelilo) y caprílico (caprilato de nonilo) (41). De ellos, en los aceites esenciales españoles se han detectado acetato de octilo, linalilo, geranilo y nerilo (57).

Alcoholes.

A. Di Giacomo (41) cita como componentes alcohólicos del aceite esencial de limón el n-octanol, n-nonanol, n-decanol, terpinen-4-ol, linalol, citronelol, geraniol, nerol, α -terpineol, carveol y tetrahydrogeraniol. En las esencias españolas se han identificado, dentro de la serie alifática, el n-heptanol y n-dodecanol (57).

La fracción alcohólica constituye alrededor del 0.8 % del aceite total.

Acidos, derivados nitrogenados y parafinas.

La bibliografía (41) solo cita los ácidos alifáticos de número par de átomos de carbono, desde el C₈ al C₁₆, más el oleico, linoleico y linolénico. Como componentes de este aceite se consideran también el antranilato de metilo, tetradecano y pentadecano.

Los ácidos se encuentran en la proporción del 0.5 %. No existen antecedentes sobre su análisis en los aceites esenciales de limón español.

Cumarinas.

En las esencias oriundas de California, Stanley (59) identificó 5,7-dimetoxicumarina (citropteno), 7-metoxi-5-geranoxicumarina, 5-isopenteniloxi-7-metoxicumarina, 5,8-psoraleno, 5-hidroxipsoraleno (bergaptol), 5,8-dimetoxipsoraleno (isopimpinellina), 5-(γ, γ -dimetil)-aliloxipsoraleno (isoperatorina), 8-(2,3-dihidroxi-3-metilbutiloxi)-5-metoxipsoraleno (biacangelicina), 8-geranoxipsoraleno y 5-geranoxipsoraleno (bergamotina). Constituyen alrededor del 1 % del aceite. Sobre el análisis de los compuestos cumarínicos en los aceites españoles no existen antecedentes bibliográficos.

Carotenoides.

Son veintidós los componentes que cita la bibliografía

(41), de cuya descripción prescindimos por estar en concentraciones muy pequeñas y, por tanto, no haber sido estudiados por nosotros.

ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES DE LIMÓN. VARIACION DE LA COMPOSICION QUIMICA CON EL METODO DE OBTENCION Y EL AREA GEOGRAFICA DE CULTIVO.

1) Análisis infrarrojo de aceites sin fraccionar.

Recientemente, J. Bellanato y A. Hidalgo (11) han estudiado en la región $4000-650\text{ cm}^{-1}$ los espectros de absorción infrarroja de aceites esenciales de limón de diversas procedencias e identificaron las bandas correspondientes al limoneno, α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, p-cimeno, canfeno, geranial, neral, acetato de geranilo y trazas de β -felandreno.

En nuestro trabajo hemos hecho uso de la región $4000-250\text{ cm}^{-1}$ para el análisis de aceites esenciales extraídos por diversos procedimientos y de diferente origen. En las figuras 41-45 se dan algunos ejemplos de muestras representativas en forma líquida y en las 46-50 de las mismas muestras en disolución. Los correspondientes números de onda los damos en la tabla 12.

Los componentes identificados, agrupados por sus funciones químicas se clasifican como sigue:

Terpenos. El componente más abundante en este aceite es el limoneno (fig. 5) (60-70 %) y, por tanto, la mayoría de las bandas visibles del espectro se deben a este producto. No obstante, se pueden identificar otros componentes, completando así los resultados obtenidos por otros autores (11).

El limoneno se pone de manifiesto por las bandas del doble enlace terminal ($=CH_2$) a 1645 cm^{-1} y 890 cm^{-1} . En esta última región absorbe también el β -pineno, a 875 y 855 cm^{-1} . Otras bandas características del mismo son las situadas a 602 y 524 cm^{-1} . Las bandas a 949 y 780 cm^{-1} corresponden al γ -terpineno ($\gamma(=C-H)$ en dobles enlaces trisustituídos).

El α -pineno presenta bandas que coinciden con las de los terpenos ya citados y dada su baja concentración es difícil de identificar. Sin embargo, la relación de las absorbancias a 789 y 798 cm^{-1} unido a la existencia de los hombros a 1125 y 1217 cm^{-1} permite dar una idea de la concentración de este terpeno en el aceite esencial total.

Dado el carácter aromático del p-cimeno, es fácilmente detectable por sus bandas a 1513 , 815 y 720 cm^{-1} .

Por último, se puede identificar el sabineno por su banda a 865 cm^{-1} . Este componente se encuentra en el aceite esencial de limón en proporciones muy pequeñas (menos del 1%), por lo que solo puede observarse su banda más intensa que es la indicada.

Compuestos oxigenados. El linalol, terpineol y nerol dan una banda ν_{O-H} en las proximidades de 3620 cm^{-1} cuando se obtiene el espectro en disolución diluida de tetracloruro de carbono. El linalol presenta además otra banda a 3540 cm^{-1} .

El citral origina una banda a 1680 cm^{-1} debida a la vibración de valencia del grupo carbonilo conjugado con el doble

enlace. Este compuesto es una mezcla de dos isómeros: geranial y neral. Este último puede diferenciarse por un hombro a 842 cm^{-1} .

La banda a 1615 cm^{-1} está originada por las cumarinas y por el geranial, por lo que no es apta para la determinación cuantitativa.

La vibración de valencia del grupo C=O de los acetatos presentes (principalmente acetato de geranilo y nerilo) es responsable de la banda a 1745 cm^{-1} . Otra absorción característica de esos compuestos se presenta en la región de 1232 cm^{-1} .

Las cumarinas pueden identificarse por sus bandas a 1745 cm^{-1} (superpuesta a la de los acetatos), 1615 , 1580 , 825 y 747 cm^{-1} que corresponden fundamentalmente al 5-geranoxipso-raleno.

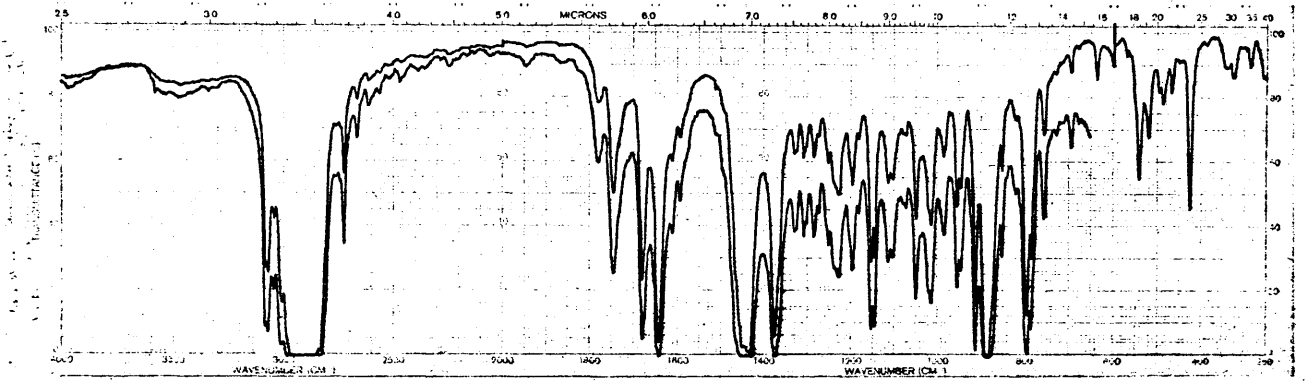


Fig. 41. Limón máquina Italia (1971); l = 0.1 mm y 0.05 mm.

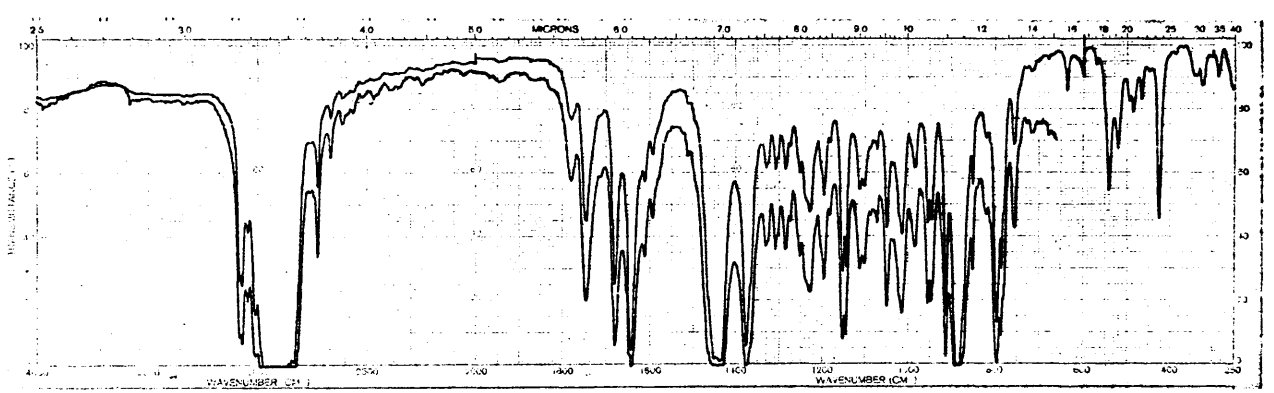


Fig. 42. Idem, máquina Murcia (1971).

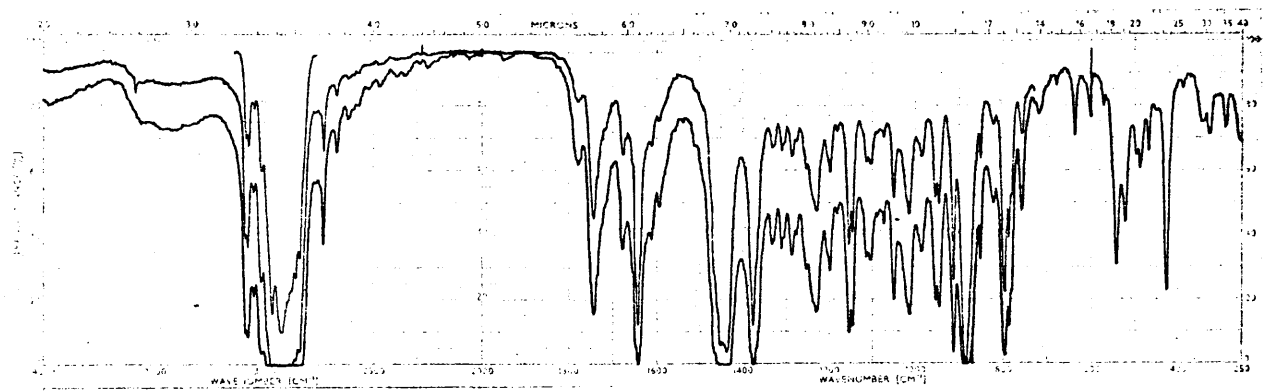


Fig. 43. Limón máquina Sevilla (1971); l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

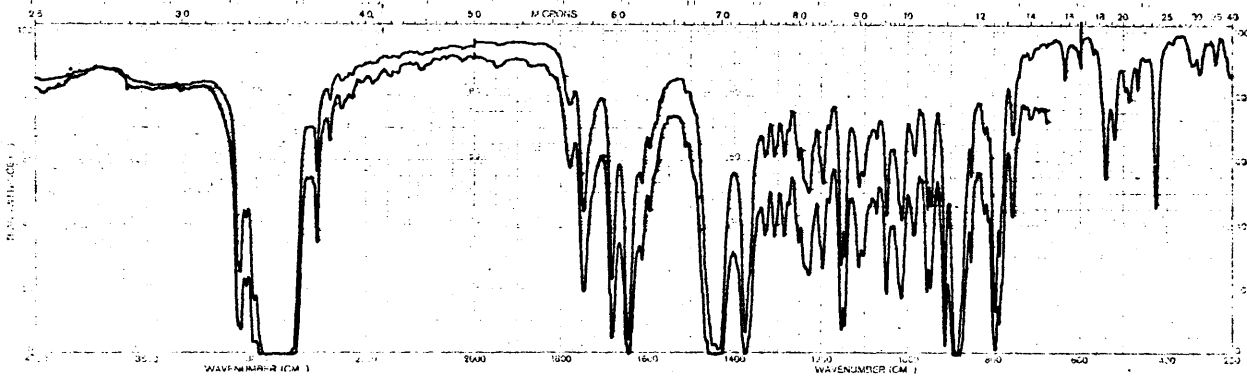


Fig. 44. Limón esponja Murcia (1971); $l = 0.1$ mm y 0.05 mm.

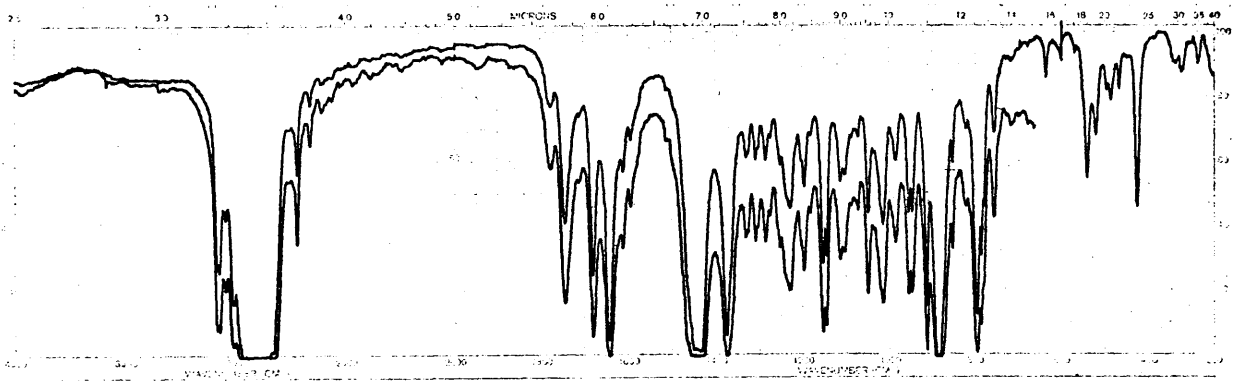


Fig. 45. Idem, avena Murcia (1971).

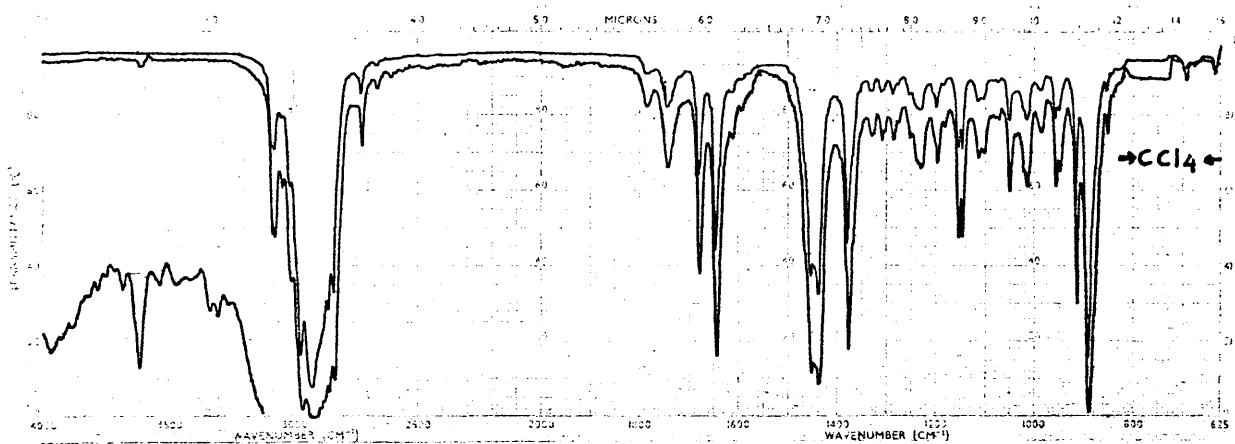


Fig. 46. Limón máquina Italia (1971) en CCl_4 0.1 g/cc;
l = 10 mm, 0.2 mm y 0.1 mm.

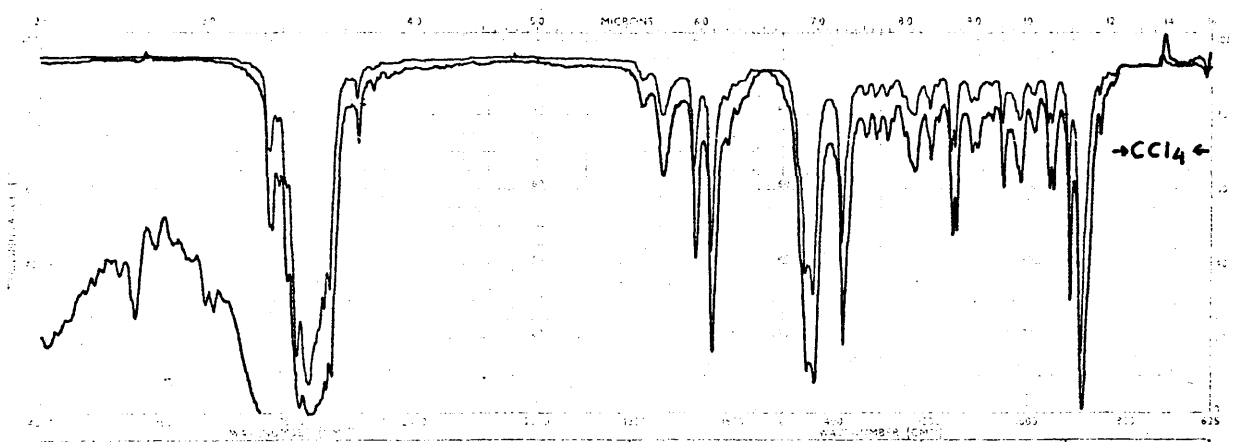


Fig. 47. Idem, máquina Murcia (1971).

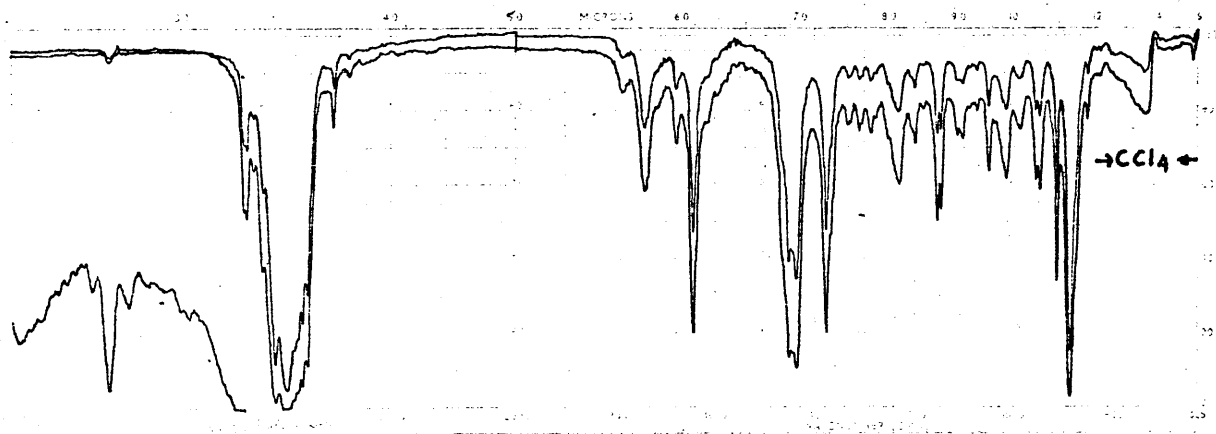


Fig. 48. Idem, máquina Sevilla (1971).

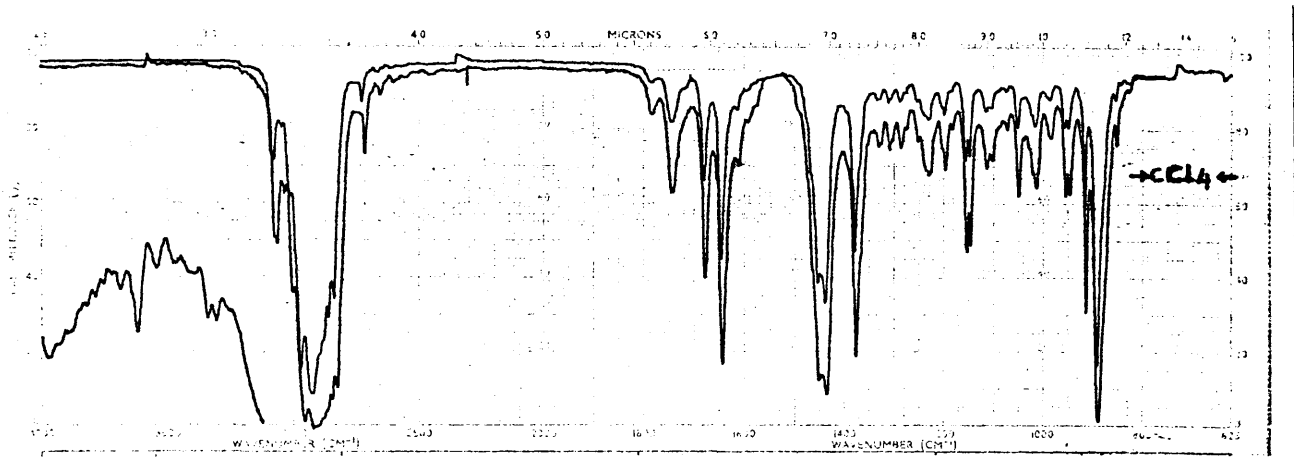


Fig. 49. Idem, esponja Murcia (1971).

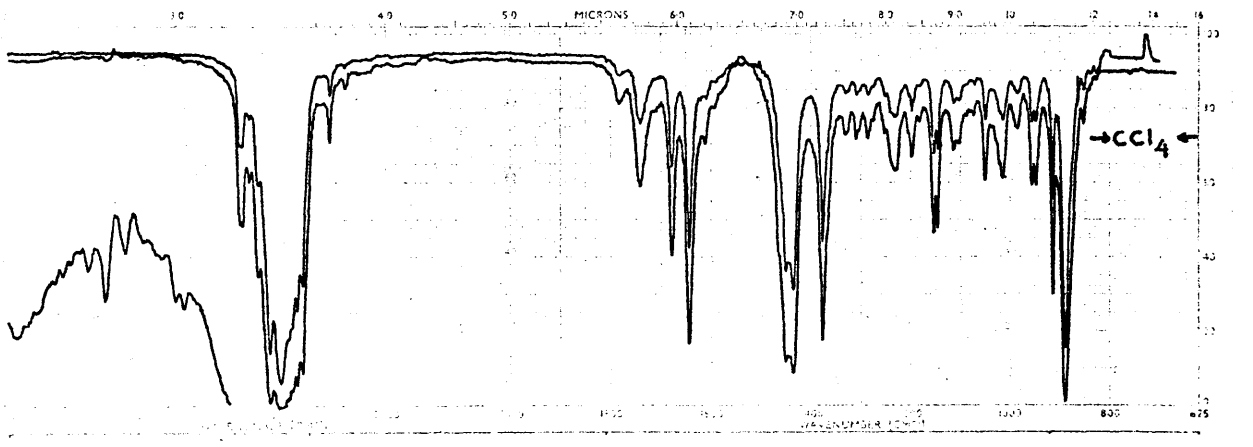


Fig. 50. Idem, avena Murcia (1971).

TABLA 12

Aceite esencial de limón

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3640 (+)	n-nonanol + n-decanol + n-octanol
3620 (+)	alcoholes (terpineol + geraniol + nerol)
3610 (+)	linalol
3540 (+)	linalol
3085	limoneno
3075	limoneno + β -pineno
3042	limoneno
3010	limoneno
2965	limoneno
2920	limoneno
2850	limoneno
2830	limoneno
2725	limoneno
1742	acetatos (nerilo, geranilo, etc.) + cumarinas
1730 L	aldehidos (n-octanal + n-decanal)
1712 L	cumarinas (citropteno)
1680	citral
1645	limoneno
1615	geranial + cumarinas
1595	limoneno + mirceno
1580 L	5-geranoxipsoraleno
1513	p-cimeno
1495 L	citropteno
1455	limoneno
1438	limoneno
1378	limoneno
1331	limoneno + α -pineno
1310	limoneno
1285	limoneno + γ -terpineno

TABLA 12 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1255	limoneno + β -pineno
1232	acetato de nerilo + acetato de geranilo
1217 L	α -pineno
1205 L	α -pineno
1198	limoneno + citral
1180	limoneno
1155	limoneno
1145	limoneno
1125 L	α -pineno
1115 L	limoneno + acetato de geranilo
1105	β -pineno + limoneno
1090 L	γ -terpineno
1075	γ -terpineno
1050	limoneno
1018	limoneno + γ -terpineno
985	limoneno + mirceno
955	limoneno + acetato de geranilo
949	γ -terpineno
925 L	β -pineno
913	limoneno
890	limoneno
875 L	β -pineno
865 L	sabineno
855	β -pineno
842 L	neral
825	cumarinas + γ -terpineno
815	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno + α -pineno
780	γ -terpineno
765 L	β -pineno + α -pineno

TABLA 12 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
755	limoneno
747 L	5-geranoxipsoraleno
730	α -felandreno
720	terpinoleno + p-cimeno
670	canfeno
638	limoneno
602	β -pineno
570	limoneno
565	sesquiterpeno
540	limoneno + p-cimeno
524	limoneno + β -pineno
498	limoneno
488	limoneno
468	limoneno
450	citral
425	limoneno
388	limoneno + β -pineno
342	limoneno
325	limoneno
288	limoneno

L: hombro

(+): medidos en disolución diluída en Cl₄C.

Determinación semicuantitativa de cumarinas.

Se han medido, en las mismas condiciones para todas las muestras, las densidades ópticas de las bandas características de las cumarinas que existen en el aceite esencial de limón, sin fraccionar, utilizando células de 0.1 mm.

Aunque la banda carbonilo a 1742 cm^{-1} coincide con la del acetato de geranilo (11) y la situada a 825 cm^{-1} con una del γ -terpineno, la variación del contenido en cumarinas al pasar de una muestra a otra es significativa y se acusa en la relación de densidades ópticas entre dichas bandas. También se refleja en la absorción a 745 cm^{-1} .

En la tabla 13 se dan los resultados para varias de las muestras estudiadas. Como se observa en ella, la diferencia más notable se advierte entre los aceites de procedencia española e italiana, siendo estos últimos más pobres en derivados cumarínicos.

La ligera disminución que se produce al pasar de las esencias de limón esponja a las de tipo máquina se puede explicar por la hidrólisis del anillo lactónico (por agitación con el agua) en el proceso mecánico de extracción.

Como veremos más adelante, el contenido en cumarinas está ligado a la estabilidad que estos aceites esenciales de limón poseen frente a las causas que originan el envejecimiento.

TABLA 13

DENSIDADES OPTICAS (+) DE LAS BANDAS IR DE CUMARINAS EN ACEITES ESENCIALES DE LIMON

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	1742 cm^{-1}	825 cm^{-1}	745 cm^{-1}
1. Esponja, B	Murcia	1970	0.854	0.121	0.080
2. Esponja, MG	Murcia	"	0.906	0.125	0.085
3. Esponja, R	Murcia	"	0.861	0.138	0.093
4. Máquina, MG	Murcia	"	0.838	0.103	0.050
5. Avena, GF	Murcia	"	0.814	0.107	0.052
6. Aguja, GF	Murcia	"	0.915	0.107	0.051
7. Italiano, G	Italia	"	0.688	0.083	0.039
8. Esponja, R	Murcia	1971	0.962	0.128	0.079
9. Esponja, G	Murcia	"	0.783	0.108	0.070
10. Esponja, B	Murcia	"	0.799	0.112	0.065
11. Esponja, B	Murcia	"	0.844	0.116	0.075
12. Máquina, B	Murcia	"	0.753	0.094	0.049
13. Máquina, B	Sevilla	"	0.899	0.096	0.052
14. Avena, B	Murcia	"	0.751	0.095	0.047
15. Avena, R	Murcia	"	0.830	0.099	0.057
16. Máquina, B	Italia	"	0.638	0.069	0.032
17. Italiano, G	Italia	"	0.668	0.070	0.033
18. Máquina, B	Murcia	1972	0.899	0.111	0.088
19. Máquina, B	Sevilla	"	0.875	0.101	0.078
20. Máquina, B	Italia	"	0.698	0.078	0.054
21. Sintético, D			0.653	0.075	0.053

(+): Las líneas de base utilizadas han sido los máximos de transmisión a 1900, 835 y 735 cm^{-1} , respectivamente; l = 0.1 mm.

Determinación cuantitativa de citral.

Como es sabido, el contenido en citral constituye un índice de calidad en el aceite esencial de limón (1).

Los métodos más conocidos para la determinación de citral son generalmente métodos volumétricos, basados en alguna reacción característica del grupo carbonilo. Recordamos a este respecto el método de la fenilhidracina (60), adoptado por la farmacopea de los Estados Unidos, el de la hidroxilamina, adoptado por la farmacopea británica y el clásico de Stillman y Reed (61).

Calapaj y Sergi (62) han puesto a punto un método espectrofotométrico de valoración de citral, que consiste en hacerlo reaccionar con la hidracina del ácido isonicotínico, con lo que se produce una sustancia coloreada que sigue la ley de Lambert-Beer hasta una concentración de citral de 0.28 mg/ml. El color del producto de la reacción colorimétrica está influenciado por el tiempo, la temperatura y el pH. Lo han utilizado principalmente para valoraciones en aceites esenciales de limón. Aunque este método no es más específico que el oficial, sin embargo es más rápido y menos laborioso.

Nosotros hemos utilizado la espectroscopía infrarroja para la valoración de este producto, que presenta una absorción característica e intensa a 1680 cm^{-1} , la cual hemos elegido como banda clave (fig. 51).

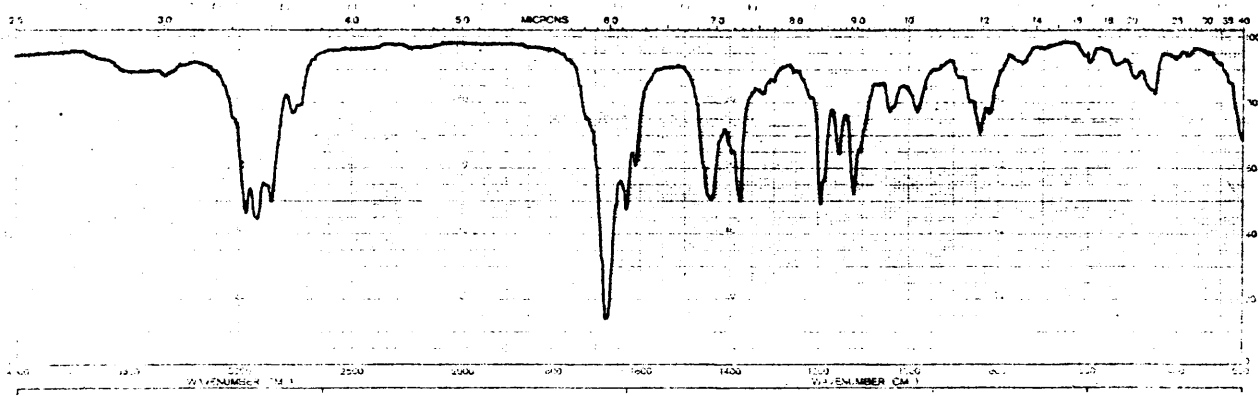


Fig. 51. Espectro infrarrojo del citral.

Hemos utilizado disoluciones patrón en tetracloruro de carbono de concentraciones 1.2 mg/cc - 25.2 mg/cc y células de 0.098 mm de espesor. La curva de calibrado resultante se da en la figura 52.

La ecuación de la recta, ajustada por mínimos cuadrados, es:

$$\frac{D}{l} = 72.12 \cdot M + 0.006 \quad (1)$$

en donde D es la densidad óptica de la banda clave, l el espesor de la célula en milímetros y M la concentración molar.

El limoneno, componente que se encuentra en esta esencia en concentraciones del orden del 65 %, absorbe también en la misma región, por lo que es necesario corregir la ecuación anterior.

Las densidades ópticas de las bandas del limoneno a 1645 y 1680 cm^{-1} vienen ligadas por la siguiente expresión:

$$D_{1680} = D_{1645} \cdot 0.12 - 0.005 \quad (2)$$

Sustituyendo la ecuación anterior en la (1) obtenemos:

$$\frac{D_{1680} - (0.12 \cdot D_{1645} - 0.005)}{l} = 72.12 \cdot M + 0.006$$

en donde D_{1680} y D_{1645} son las densidades ópticas medidas a las respectivas frecuencias.

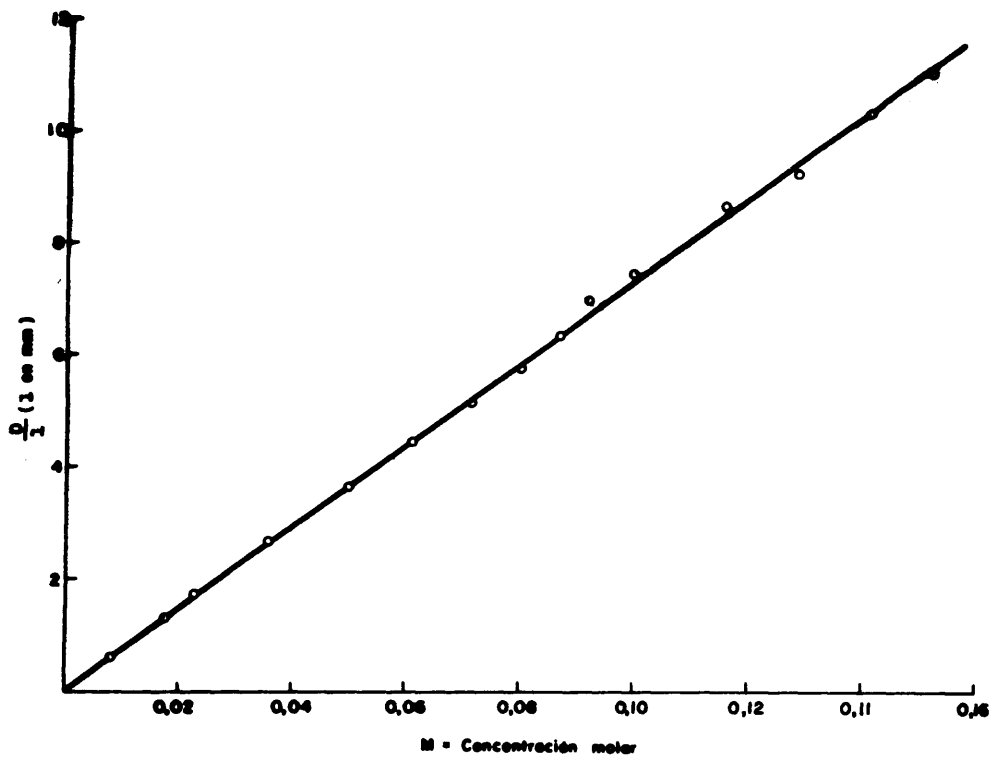


Fig. 52. Curva de calibrado del citral. Banda a 1680 cm^{-1} .

Para determinar la exactitud del método se formaron mezclas binarias de citral y limoneno, de concentraciones comprendidas en el rango en que se encuentran en el aceite de limón, y se disolvieron en tetracloruro de carbono. Los errores relativos resultaron ser menores del 1 %.

Las cantidades de citral en las diversas muestras se determinaron preparando disoluciones de aceite en Cl_4C , en concentraciones de 0.1 g/cc.

Los resultados obtenidos para las muestras estudiadas se dan en la tabla 14, en la que se advierte mayor riqueza en citral en los aceites de origen italiano con respecto a los españoles. Las diferencias encontradas son concordantes con las citadas en la bibliografía (1).

Análogamente, los aceites obtenidos por el procedimiento de esponja son ligeramente más ricos en citral que los de tipo máquina, de acuerdo con los resultados obtenidos por A. Di Giacomo por cromatografía en fase de vapor (63).

Dentro de las esencias de limón de origen español, no se han encontrado diferencias sistemáticas en el contenido en citral, variando de una cosecha a otra. Resalta el bajo contenido en la muestra 15 de la tabla 14 (limón máquina Sevilla, 1971).

El aceite sintético estudiado presenta la mayor concentración de citral observada.

TABLA 14

CONTENIDO EN CITRAL (% EN PESO) EN ACEITES DE LIMON.

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	% en peso
1. Esponja, B	Murcia	1970	2.5
2. Esponja, MG	Murcia	"	2.4
3. Esponja, R	Murcia	"	2.3
4. Máquina, MG	Murcia	"	2.2
5. Avena, GF	Murcia	"	1.8
6. Aguja, GF	Murcia	"	1.7
7. Italiano, G	Italia	"	2.9
8. Esponja, R	Murcia	1971	2.9
9. Esponja, G	Murcia	"	2.9
10. Esponja, B	Murcia	"	2.8
11. Esponja, B	Murcia	"	2.7
12. Máquina, B	Murcia	"	2.7
13. Avena, B	Murcia	"	2.6
14. Avena, R	Murcia	"	2.7
15. Máquina, B	Sevilla	"	0.8
16. Máquina, B	Italia	"	3.1
17. Italiano, G	Italia	"	3.2
18. Máquina, B	Murcia	1972	1.8
19. Máquina, B	Sevilla	"	2.7
20. Máquina, B	Italia	"	3.2
21. Sintético, D			3.4

Valoración de β -pineno y limoneno.

Para determinar cuantitativamente β -pineno hemos obtenido la curva patrón utilizando mezclas binarias de limoneno y β -pineno, con tantos por ciento en peso de este último comprendidos entre 4.53 y 14.72, y células de 0.1 mm de espesor (cristales de ioduro de cesio).

La ecuación de la recta, ajustada por mínimos cuadrados resultó ser:

$$\frac{D}{l} = 0.045 \cdot C + 0.020$$

siendo D la densidad óptica de la banda clave a 602 cm^{-1} , l el espesor de la célula en milímetros y C la concentración en tanto por ciento en peso.

La banda clave elegida es la más idónea que presenta el β -pineno para su valoración; sin embargo, su coeficiente de extinción es pequeño y la ecuación anterior no es, por tanto, muy precisa, pero puede ser apta para dar buenos resultados comparativos.

Los resultados obtenidos para los aceites en fase líquida se dan en la tabla 15. En la misma tabla se incluyen los contenidos en limoneno, obtenidos a partir de disoluciones en Cl_4C , utilizando como banda clave la 1645 cm^{-1} según se describe en el estudio del aceite esencial de naranja.

El contenido en limoneno oscila entre unos porcentajes comprendidos entre el 61 y 72 %, que está de acuerdo con la bibliografía (1), y no es característico de la procedencia y el método de obtención. Sin embargo, en el caso del β -pineno hay que señalar que los aceites esenciales obtenidos por el procedimiento de esponja son, en general, más ricos en este producto que los extraídos por el método de avena y máquina, lo que puede explicarse por ser algo soluble en agua. Esta, cuando se utiliza en el método avena y máquina puede arrastrar selectivamente pequeñas cantidades de β -pineno y dar lugar a ligeras diferencias entre los métodos de extracción de esponja, avena y máquina.

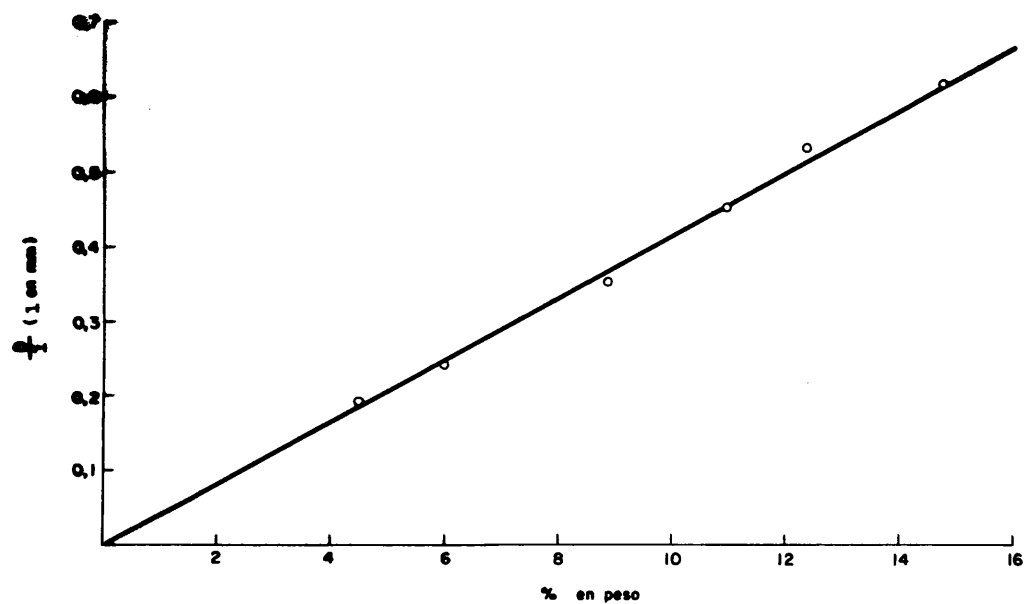


Fig. 53. Curva de calibrado del β -pineno. Banda a 602 cm^{-1} .

TABLA 15

CONTENIDO EN LIMONENO Y β -PINENO (% EN PESO) EN ACEITES ESENCIALES DE LIMON

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	% limoneno	% β -pineno
1. Esponja, B	Murcia	1970	67.7	12.8
2. Esponja, MG	Murcia	"	64.3	12.5
3. Esponja, R	Murcia	"	64.7	12.5
4. Máquina, MG	Murcia	"	65.8	12.2
5. Avena, GF	Murcia	"	65.9	10.1
6. Aguja, GF	Murcia	"	65.0	11.2
7. Italiano, G	Italia	"	67.3	11.1
8. Esponja, R	Murcia	1971	66.2	12.7
9. Esponja, G	Murcia	"	70.0	12.2
10. Esponja, B	Murcia	"	65.5	13.0
11. Esponja, B	Murcia	"	69.4	12.7
12. Avena, B	Murcia	"	68.4	9.9
13. Avena, R	Murcia	"	67.9	11.3
14. Máquina, B	Murcia	"	69.7	11.7
15. Máquina, B	Sevilla	"	71.2	13.0
16. Máquina, B	Italia	"	70.9	10.9
17. Italiano, G	Italia	"	72.1	11.5
18. Máquina, B	Murcia	1972	66.3	11.6
19. Máquina, B	Sevilla	"	67.2	12.5
20. Máquina, B	Italia	"	65.1	12.9
21. Sintético, D			66.2	12.5

Determinación semicuantitativa de alcoholes.

La mayor parte de los alcoholes que contienen los aceites esenciales de limón (linalol, terpineol, geraniol, nerol, citronelol, etc.) absorben en las proximidades de 3620 cm^{-1} en disoluciones de tetracloruro de carbono (vibración $\nu \text{ O-H}$). Los alcoholes alifáticos de cadena lineal presentan la banda a frecuencia más elevada, 3640 cm^{-1} .

Como dijimos en el aceite esencial de naranja, el linalol se distingue por dar una segunda banda a 3540 cm^{-1} que no desaparece al diluir.

Si se miden en un aparato de buena resolución y con escala ampliada, las pequeñas diferencias de frecuencia dan idea de la composición de alcoholes primarios (n-octanol, n-decanol) y terciarios (linalol, terpineol).

Por otra parte, la relación de densidades ópticas dada por el cociente D_{3620}/D_{3545} sirve como índice de la riqueza en linalol frente a otros alcoholes.

En la tabla 16 se da una relación de los resultados obtenidos para catorce muestras pertenecientes a dos cosechas.

Como puede observarse, el contenido en alcoholes es variable anualmente. Se destaca el elevado porcentaje de la muestra de Sevilla (1971) que, como hemos visto, se comporta también anormalmente en otros aspectos. El limón sintético también da valores altos. Por otra parte, al considerar estas medidas de valoración hay que tener en cuenta que tam

bién va incluida la aportación de productos de oxidación, como, por ejemplo, el carveol, si bien esta influencia es pequeña cuando se consideran aceites frescos, como en este trabajo.

TABLA 16

ACEITE ESENCIAL DE LIMON

CONTENIDO EN ALCOHOLES. DENSIDADES OPTICAS A 3620 cm^{-1} (+)

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Densidades ópticas
1. Esponja, B	Murcia	1971	0.23
2. Esponja, G	Murcia	"	0.21
3. Esponja, R	Murcia	"	0.40
4. Esponja, B	Murcia	"	0.21
5. Avena, B	Murcia	"	0.21
6. Avena, R	Murcia	"	0.20
7. Máquina, B	Murcia	"	0.21
8. Máquina, B	Sevilla	"	0.87
9. Máquina, B	Italia	"	0.37
10. Italiano, G	Italia	"	0.35
11. Máquina, B	Murcia	1972	0.14
12. Máquina, B	Sevilla	"	0.23
13. Máquina, B	Italia	"	0.17
14. Sintético, D			0.76

(+): $c = 0.1\text{ g/cc}$; $l = 1\text{ cm}$.

2) Fraccionamiento cromatográfico.

El estudio de los aceites sin fraccionar presenta las ventajas de su rapidez y comodidad. Sin embargo, existen muchos componentes que se escapan al análisis, por lo que es muy conveniente una separación previa. Por ello hemos procedido a un fraccionamiento en el caso de seis muestras de las citadas anteriormente (nº 8, 14, 18, 19, 20 y 21 de la tabla 14).

En la tabla 17 se dan los tantos por ciento en peso de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna. Los valores suman aproximadamente cien, alrededor del 0.5 % por defecto, por los residuos procedentes de la epidermis del fruto que suelen llevar los aceites y que permanecen retenidos en el soporte de la columna cromatográfica.

De estos resultados se deducen los porcentajes relativamente bajos de la fracción acetato de etilo en los aceites italianos y sintético. Esto es debido a la menor concentración de cumarinas, en concordancia con los análisis infrarrojos de los aceites sin fraccionar.

TABLA 17

ACEITE ESENCIAL DE LIMON. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO. (% EN PESO)

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Fracción			
			n-hexano	n-hexano- -acet. etilo	acet. etilo	metanol
1. Esponja, R	Murcia	1971	89.99	5.48	3.70	0.31
2. Avena, R	Murcia	"	91.50	5.20	2.42	0.25
3. Máquina, B	Murcia	1972	91.50	4.90	3.22	0.23
4. Máquina, B	Sevilla	"	91.63	5.25	2.41	0.25
5. Máquina, B	Italia	"	92.38	6.20	1.09	0.31
6. Sintético, D			92.00	5.42	2.40	0.18

3) Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.

a) Fracción terpénica.

En las figuras 54-56 se muestran los espectros de tres fracciones terpénicas obtenidas por cromatografía en columna. Las otras tres fracciones estudiadas son similares.

Por ser el limoneno el componente mayoritario, sus bandas son las que predominan en el espectro (tabla 18). También son observables el sabineno (865 cm^{-1}) p-cimeno ($1513, 815, 720\text{ cm}^{-1}$), α -pineno ($1217, 1205, 789\text{ cm}^{-1}$), γ -terpineno ($949, 825, 780\text{ cm}^{-1}$) y β -pineno ($1105, 875, 855, 602, 450\text{ y }388\text{ cm}^{-1}$).

La banda a 825 cm^{-1} , atribuída en la bibliografía a las cumarinas (11), viene, sin duda, influenciada por el γ -terpineno, sustancia fundamentalmente precursora del p-cimeno en el envejecimiento del aceite esencial de limón. Sin embargo, y como muestran los resultados, el p-cimeno también es un componente propio de la esencia fresca, donde se encuentra en proporciones del 0.8 % aproximadamente.

La región $700\text{-}250\text{ cm}^{-1}$ contribuye a la identificación más segura de algunos componentes, como el β -pineno, que da bandas características a $602, 450\text{ y }388\text{ cm}^{-1}$.

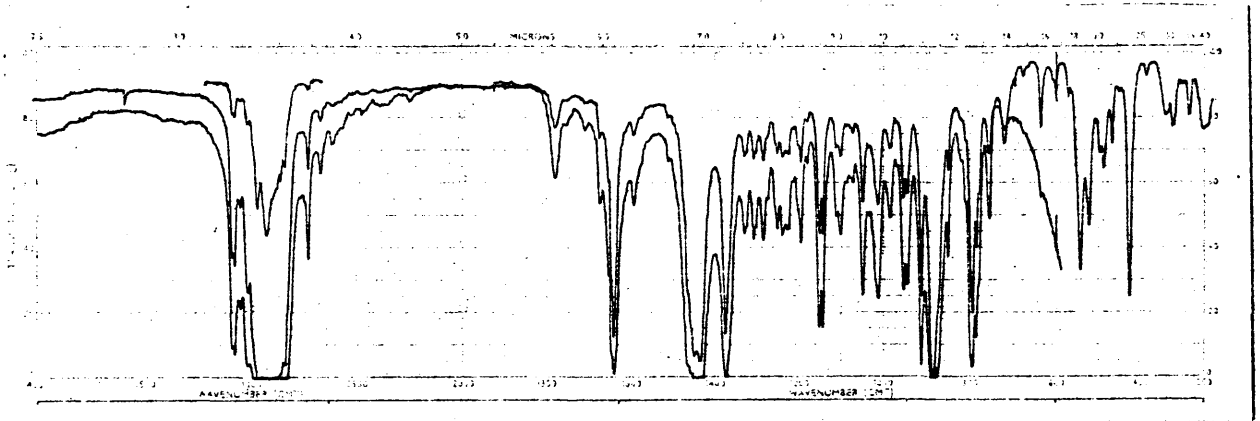


Fig. 54. Fracción terpénica. Limón máquina Italia (1972)
l = 0.1 mm y 0.03 mm.

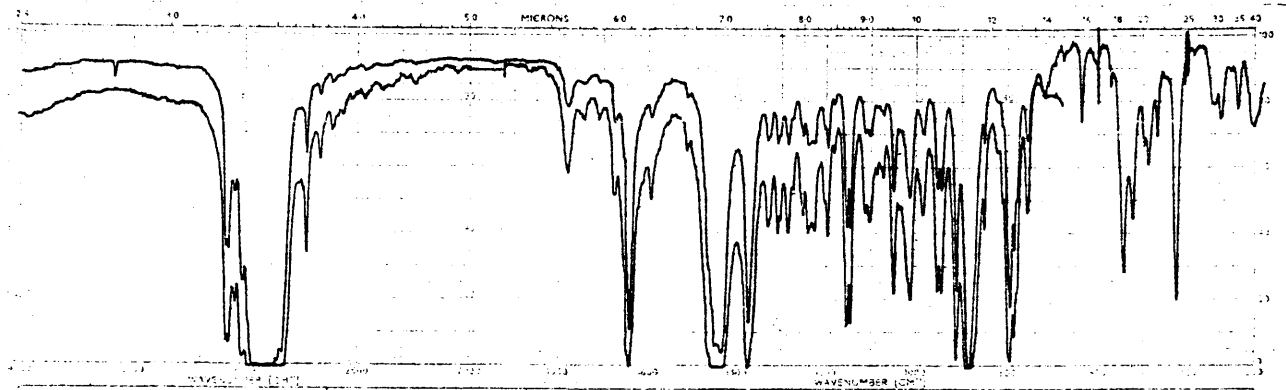


Fig. 55. Idem, máquina Murcia (1972).

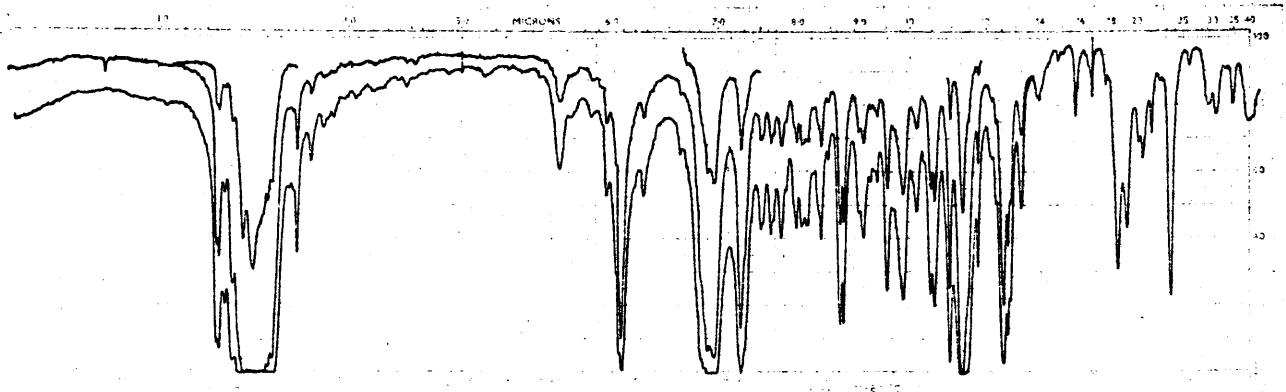


Fig. 56. Idem, máquina Sevilla (1972).

TABLA 18

Fracción terpénica. Aceite esencial de limón.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3085	limoneno
3075	limoneno + β -pineno
3045	limoneno
3010	limoneno
2960	limoneno
2920	limoneno
2870	limoneno
2830	limoneno
2730	limoneno
1780	limoneno
1680	limoneno
1665 L	sabineno
1645	limoneno
1595	mirceno + limoneno
1513	p-cimeno
1450	limoneno
1438	limoneno
1378	limoneno
1331	α -pineno + β -pineno + limoneno
1310	limoneno
1285	limoneno + γ -terpineno
1255	limoneno + β -pineno
1241	limoneno
1230	limoneno + β -pineno
1217 L	β -pineno + α -pineno
1205 L	α -pineno
1198	limoneno
1182	limoneno

TABLA 18 (Continuación)

cm^{-1}	Componente
1155	limoneno
1145	limoneno
1125 L	α -pineno
1105	limoneno + β -pineno
1090	γ -terpineno
1075	γ -terpineno
1050	limoneno
1030 L	γ -terpineno
1018	limoneno + γ -terpineno
985	limoneno
955	limoneno
949	γ -terpineno
925 L	β -pineno
913	limoneno
890	limoneno
875 L	β -pineno
855	β -pineno
825	γ -terpineno + β -pineno
815	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno + α -pineno
780	γ -terpineno
765 L	β -pineno + α -pineno
759	limoneno
720	terpinoleno + p-cimeno
675	limoneno
639	limoneno
602	β -pineno

TABLA 18 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
570	limoneno
540	limoneno + p-cimeno
520	limoneno + β -pineno
498	limoneno
489	limoneno
468	limoneno
450	β -pineno
425	limoneno
388	β -pineno + p-cimeno

b) Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Está constituida por esterres (acetatos), aldehidos y al coholes (tabla 19).

Las figuras 57-59 muestran los espectros de esta fracción para tres muestras de limón máquina de distinto origen.

Las bandas que predominan en el espectro pertenecen fun damentalmente al citral (geranial y neral, 1680, 1630 y 1611 cm^{-1}). También se hacen visibles otros componentes oxigenados minoritarios, tales como acetato de linalilo (1250, 1090 cm^{-1}) y citronelal (1118, 525 cm^{-1}).

En estas fracciones es característico el contenido en al dehidos, que se muestra superior en las muestras de origen español. Lo inverso ocurre con el contenido en citral. Más adelante se confirmarán estos resultados mediante el análisis de las fracciones por cromatografía en fase de vapor.

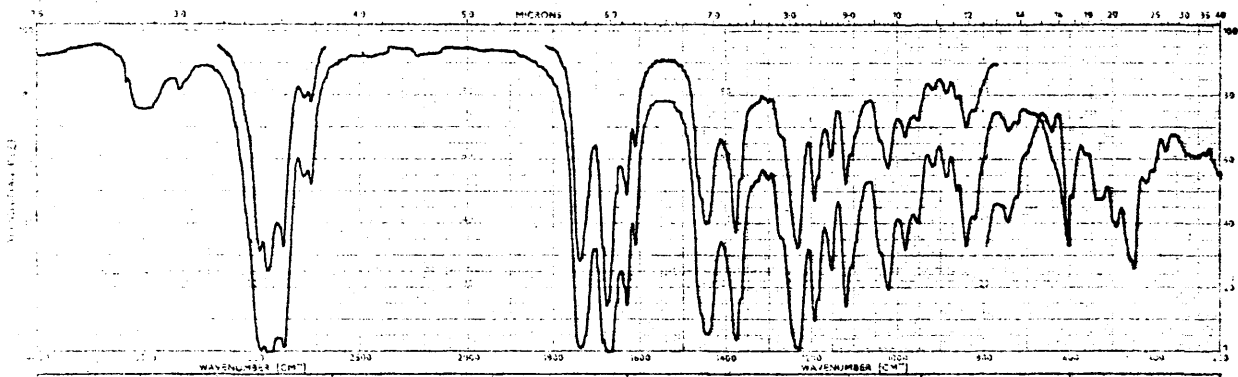


Fig. 57. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Limón máquina Italia (1972); 1 = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

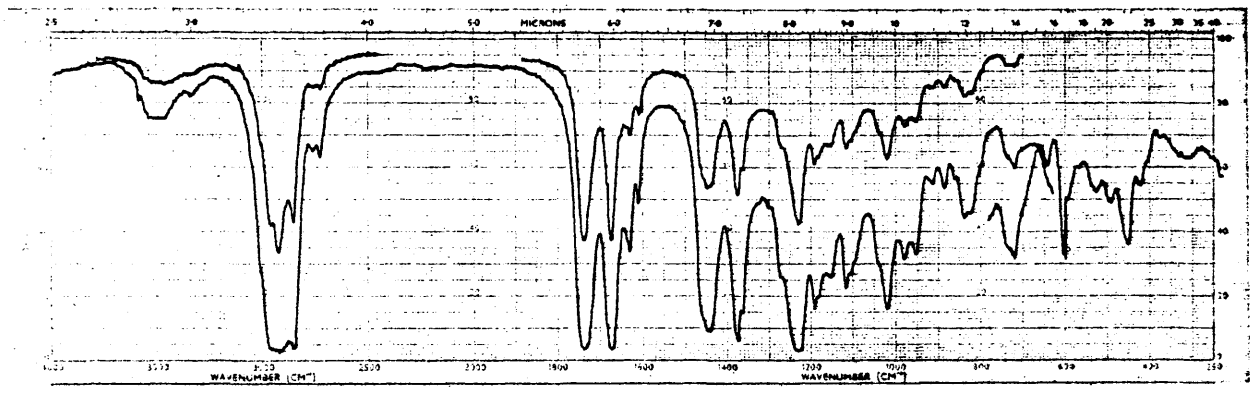


Fig. 58. Idem, máquina Murcia (1972).

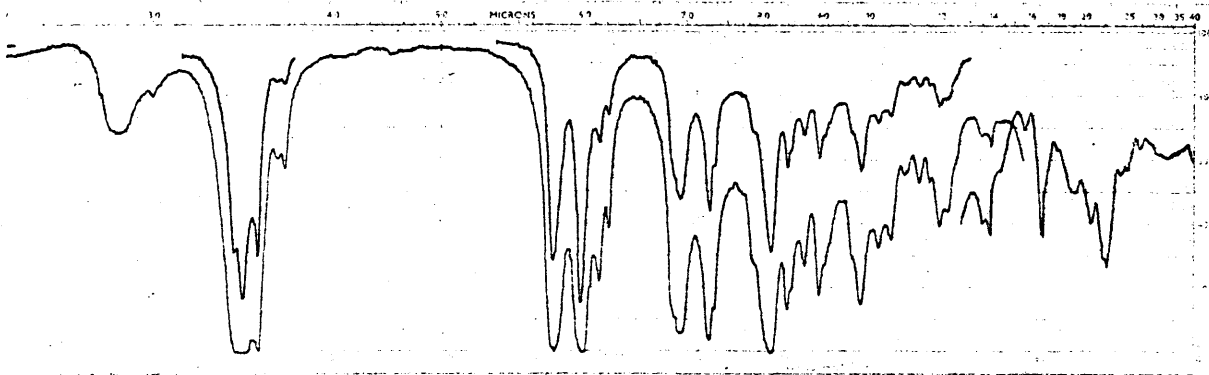


Fig. 59. Idem, máquina Sevilla (1972).

TABLA 19

Aceite esencial de limon.

Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3500	alcoholes (principalmente linalol)
3340	citral
2969	citral + acetatos de geranilo y nerilo
2920	citral + acetatos de geranilo y nerilo + aldehidos
2860	citral
2760	citral
2728	aldehidos + citral + acetatos de gerani- lo y nerilo
1740	acetatos (geranilo, nerilo y linalilo)
1728 L	aldehidos
1680	citral
1630	neral
1611	geranial
1460 L	aldehidos
1445	citral
1415 L	linalol
1375	citral + acetatos
1365	acetatos de geranilo y nerilo
1320	citral
1300	citral
1270 L	acetatos de geranilo y nerilo
1250 L	acetato de linalilo
1230	acetatos de geranilo y nerilo
1192	citral
1180 L	citral
1170	acetato de linalilo

TABLA 19 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1152	citral
1118	citral + acetato de linalilo + citrone- lal
1105 L	citral
1080	acetato de linalilo
1040 L	citral
1020	acetatos de geranilo y nerilo
998 L	linalol
980	citral
952	acetatos de geranilo y nerilo
920	acetato de geranilo + linalol
888	carveol
862	citral
842	neral
830	acetatos de geranilo y nerilo + linalol
820	geranial
740	citral + acetatos de geranilo y nerilo
720	alcoholes y aldehidos alifáticos
695	linalol + acetato de linalilo
640	acetatos de geranilo y nerilo
602	acetatos (geranilo, nerilo y linalilo)
595 L	citral
535	citral
525	citral + citronelal
490	citral
458	citral
450	citral
420	acetatos de geranilo y nerilo
405	citral
375	citral

c) Fracción acetato de etilo.

En las figuras 60-62 se dan los espectros correspondientes a las tres muestras estudiadas.

La fracción está constituida, fundamentalmente, por cumarinas y α -terpineol (tabla 20). Las cumarinas tienen una estructura molecular muy parecida, y por ello solo son observables claramente las mayoritarias: 5-geranoxi-7-metoxicumarina (1200, 1150, 1110 cm^{-1}), bergamotina ó 5-geranoxipsoraleno (1579, 748 cm^{-1}), citropteno (1495, 1015 cm^{-1}), 8-geranoxipsoraleno (1290, 995 cm^{-1}), 8-metoxipsoraleno (1590, 1330, 1095, 870 cm^{-1}). También se detectan las principales bandas del bergapteno.

La fracción del aceite procedente de Sevilla se caracteriza por poseer más α -terpineol (3500, 1050-1030, 910, 835, 800, 778, 770 cm^{-1}) y menos citropteno (1494, 1150 cm^{-1} , etc.) que las demás fracciones consideradas.

De acuerdo a lo encontrado por Stanley (59) para el aceite esencial de limón por separación cromatográfica y detección por espectroscopía ultravioleta, en nuestro caso las bandas que predominan son las de la 5-geranoxi-7-metoxicumarina, citropteno y bergamotina.

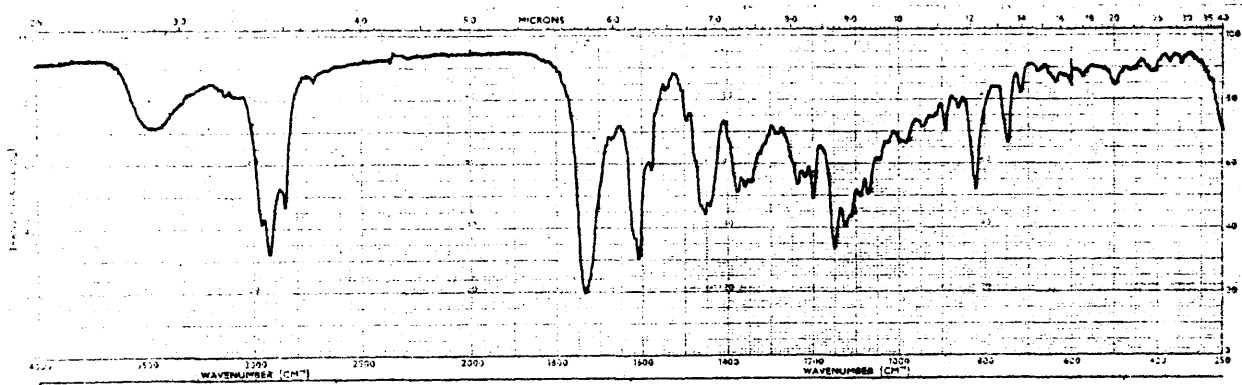


Fig. 60. Fracción acetato de etilo. Limón máquina Italia (1972); en film.

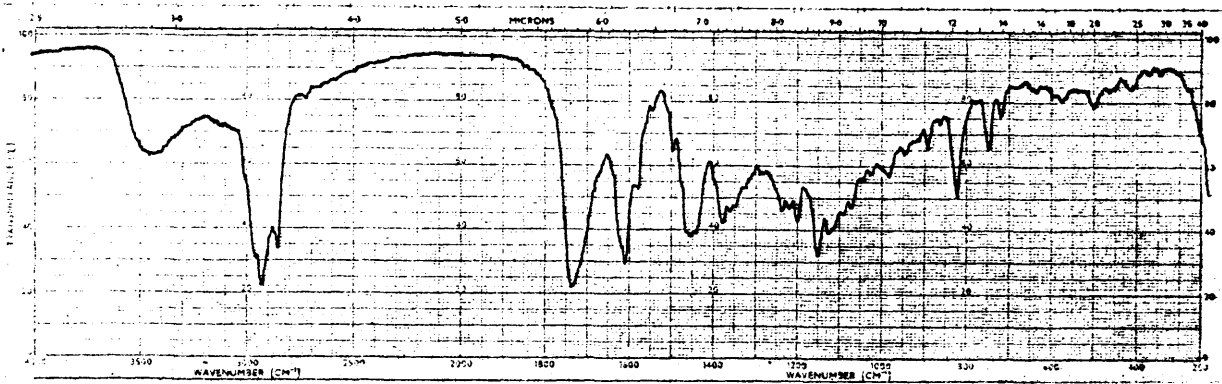


Fig. 61. Idem, Murcia (1972).

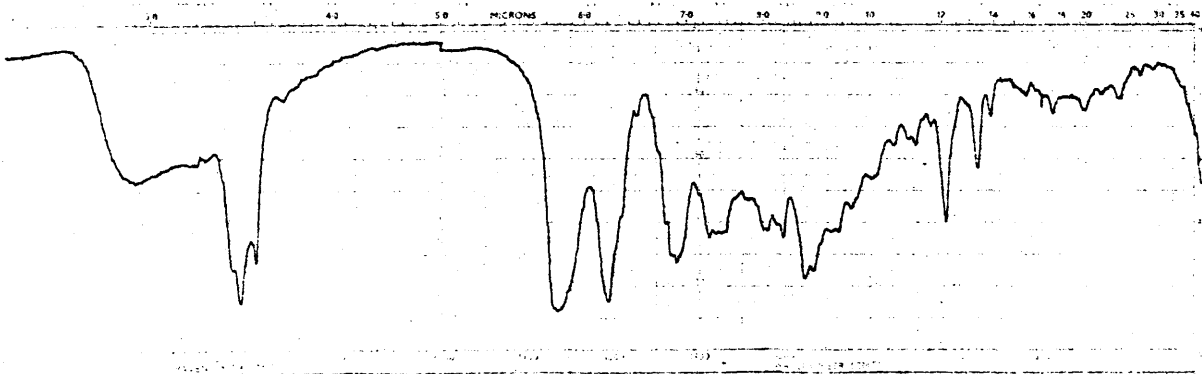


Fig. 62. Idem, Sevilla (1972).

TABLA 20

Aceite esencial de limón.

Fracción acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3500	alcoholes (α -terpineol)
3125	5-geranoxi-7-metoxicumarina
3080	5-geranoxi-7-metoxicumarina
2960	α -terpineol + 5-geranoxi-7-metoxicumari- na + bergamotina
2930	ceras + 5-geranoxi-7-metoxicumarina + ber- gamotina
2855	bergamotina + 5-geranoxi-7-metoxicumarina
1735	5-geranoxi-7-metoxicumarina + bergapteno + bergamotina + ceras
1710 L	citropteno + 8-metoxipsoraleno
1670	
1620 L	bergamotina + bergapteno
1610	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno + bergamotina
1590 L	8-metoxipsoraleno
1579	bergamotina + bergapteno
1545	bergamotina + bergapteno
1495	citropteno
1470	bergapteno
1455	citropteno
1441	5-geranoxi-7-metoxicumarina + bergamotina
1400 L	citropteno + 8-metoxipsoraleno
1378	α -terpineol
1360	5-geranoxi-7-metoxicumarina + bergapteno
1345	citropteno
1330 L	8-metoxipsoraleno
1320 L	bergamotina
1310 L	citropteno

TABLA 20 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1290	8-geranoxipsoraleno
1280	bergamotina
1255	bergapteno
1236	citropteno
1220	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno + bergamotina
1200	5-geranoxi-7-metoxicumarina + bergamoti- na + citropteno
1150	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno + bergamotina
1130 L	α -terpineol
1125	bergamotina + bergapteno
1110	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno
1095	8-metoxipsoraleno
1090	5-geranoxi-7-metoxicumarina + bergamotina
1070	bergamotina
1045	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno
1025	8-geranoxipsoraleno
1020	8-metoxipsoraleno
995	8-geranoxipsoraleno + 8-metoxipsoraleno
980	bergamotina
945	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno + bergamotina
920	bergamotina
910	α -terpineol
892	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno + bergamotina + bergapteno
870	8-metoxipsoraleno
861	bergamotina
835 L	α -terpineol + bergapteno

TABLA 20 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
822	bergamotina + citropteno + 5-geranoxi- -7-metoxicumarina
800 L	α-terpineol
778	α-terpineol
770	α-terpineol
748	bergamotina
718	bergamotina + ceras

Citropteno: 5,7-dimetoxicumarina

Bergamotina: 5-geranoxipsoraleno

Bergapteno: 5-metoxipsoraleno

d) Fracción metanol.

Los espectros de esta fracción se dan en las figuras 63-
-65.

La composición química es análoga a la obtenida del aceii
te esencial de naranja.

Existen diferencias características entre dichas fraccioo
nes, sobre todo en el contenido en grupos CH_2 y CH_3 de las
cadenas alifáticas.

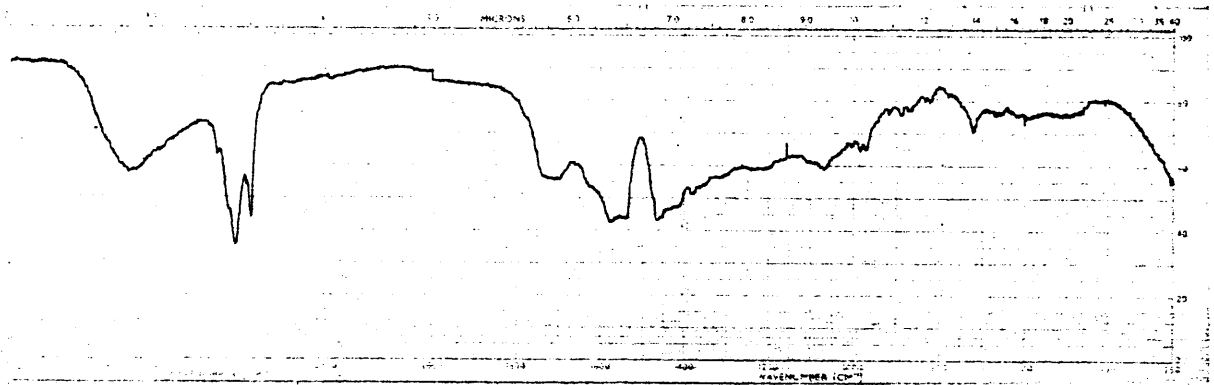


Fig. 63. Fracción metanol, en KBr.
Limón máquina Italia (1972).

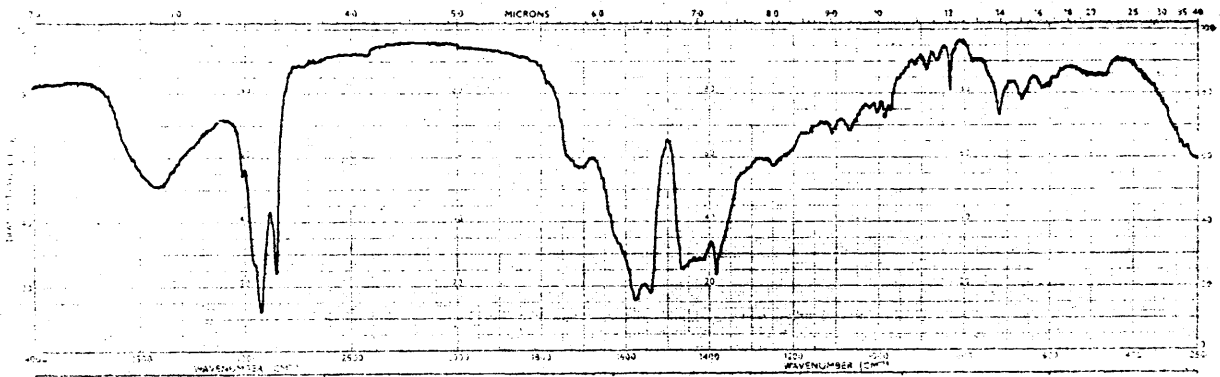


Fig. 64. Idem, Murcia (1972).

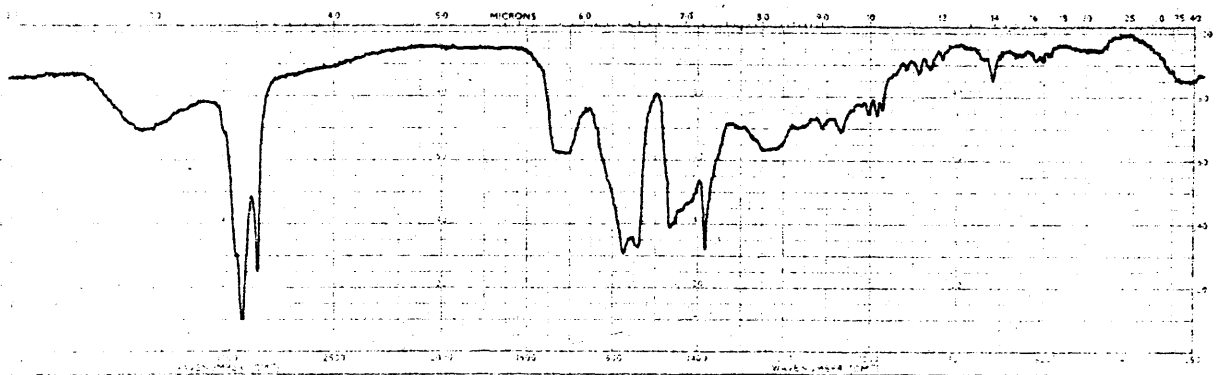


Fig. 65. Idem, Sevilla (1972).

3) Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.

Para comprobar la identificación de los productos oxigenados minoritarios realizada por espectroscopía infrarroja y determinar el contenido relativo de los mismos, hemos recurrido al análisis por cromatografía de gases de las fracciones oxigenadas más volátiles (eluidas con n-hexano-acetato de etilo 88-12 v:v).

En las figuras 66-68 se dan los cromatogramas correspondientes a las fracciones de tres muestras de diferente origen (18, 19 y 20 de la tabla 14).

Los componentes identificados fueron:

n-octanal (1), n-nonanal (2), citronelal (3), linalol (4), n-decanal (5), terpinen-4-ol (6) ?, neral (7), geranial (8), acetato de nerilo (9) y acetato de geranilo (10).

Como se deduce de los resultados obtenidos, la distribución porcentual de los componentes es distinta en cada fracción.

En la tabla 21 se da una relación del tanto por ciento de área de pico para cada uno de los componentes identificados.

La muestra italiana revela mayor proporción de geranial y neral que las de procedencia española, de acuerdo con los datos infrarrojos (tabla 14). De la comparación de las muestras de Sevilla y Murcia se deduce un porcentaje mayor de aldehidos alifáticos y de linalol en la primera, como ya señalamos en otros lugares.

TABLA 21

ACEITE ESENCIAL DE LIMON

FRACCION n-HEXANO-ACETATO DE ETILO. (% DE AREAS DE PICO).

Componente	Muestras		
	Limón máquina (Italia)	Limón máquina (Murcia)	Limón máquina (Sevilla)
n-octanal	0.4	0.3	8.3
n-nonanal	0.6	5.5	11.3
citronelal	1.3	0.1	0.8
linalol	1.7	1.0	1.7
n-decanal	0.8	0.9	2.1
neral	12.6	9.1	10.5
geranial	28.5	16.5	17.3
acetato de nerilo	24.7	31.3	22.2
acetato de geranilo	20.4	30.1	27.2

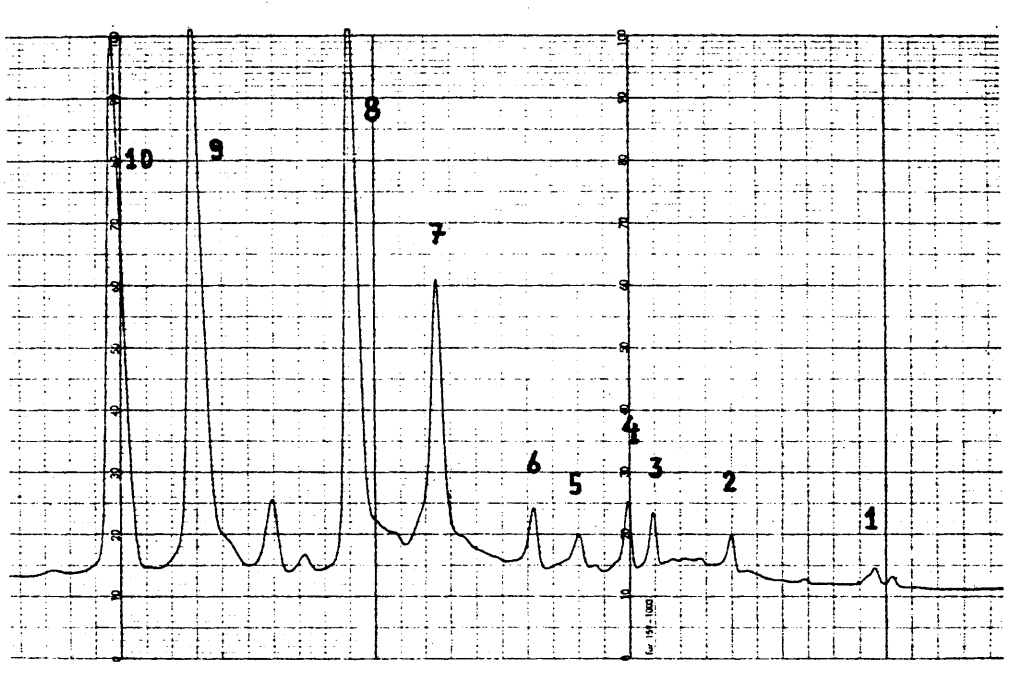


Fig. 66. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Limón máquina Italia (1972).

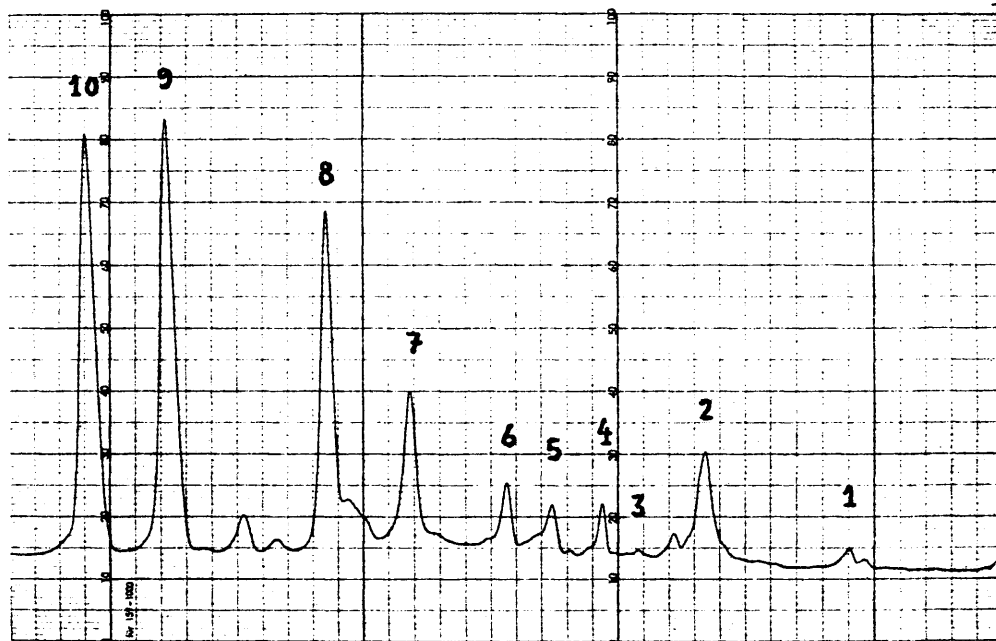


Fig. 67. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Limón máquina Murcia (1972).

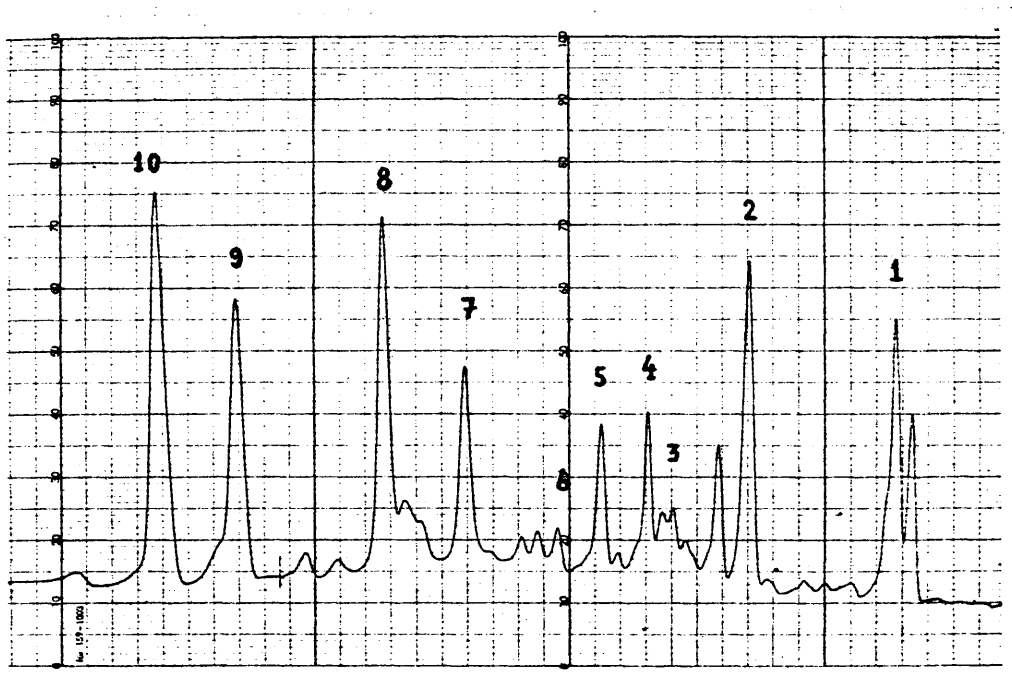


Fig. 68. Idem, Sevilla (1972).

4) Determinación de cumarinas por espectrofluorimetría.

Como en los aceites esenciales de limón los productos cumarínicos están en concentraciones muy pequeñas que rozan los límites de detección de la espectroscopía infrarroja, hemos recurrido a la espectrofluorimetría para realizar medidas más precisas del contenido en cumarinas en las muestras estudiadas.

La concentración de estos productos, como se discute más adelante, es de considerable importancia por estar ligada a la estabilidad de los aceites esenciales de limón frente a los factores que originan el envejecimiento.

Se ha estudiado la fluorescencia del aceite esencial de limón en tres muestras (nº 18, 19 y 20 de tabla 14).

La fracción terpénica y compuestos oxigenados volátiles poseen una fluorescencia muy débil y la intensidad de fluorescencia del aceite total viene determinada fundamentalmente por las cumarinas.

Estos productos, como ocurre en todos los casos de determinación cuantitativa por espectrofluorimetría, no siguen linealidad en la intensidad de fluorescencia respecto a su concentración cuando ésta es elevada. Hemos comprobado, por ejemplo, que la 5,7-dimetoxicumarina y 5-geranoxi-7-metoxicumarina siguen una relación lineal a concentraciones inferiores a 0.005 g/l. Por otra parte, sus espectros de excitación dan un máximo a 331 nm, coincidiendo con el máximo de

la banda de excitación fluorescente del aceite total, debido a que, junto con la bergamotina, son las cumarinas mayoritarias y las de mayor intensidad fluorescente.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se ha determinado la cantidad de cumarinas, tomando como patrón el citropteno, en tres muestras de aceite esencial de limón. Para ello preparamos una disolución de citropteno en alcohol etílico con una concentración de 0.001 g/l. Las intensidades de fluorescencia para el patrón y muestras de aceite en alcohol etílico (0.1 g/l) se indican en la tabla 22.

TABLA 22

DETERMINACION DE CUMARINAS (+) POR ESPECTROFLUORIMETRIA

<u>Muestra</u>	<u>Origen</u>	<u>Cosecha</u>	<u>I. F.</u>	<u>Concentración</u>
Patrón			100.0	10^{-3} g/l
Limón máquina, B	Italia	1972	10.0	0.10 %
Limón máquina, B	Sevilla	"	13.5	0.13 %
Limón máquina, B	Murcia	"	39.5	0.39 %

(+): expresado en citropteno.

ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES SINTETICOS. METODO DE IDENTIFICACION.

Desde hace treinta años aproximadamente, la producción de esencias sintéticas y naturales ha experimentado un notable desarrollo.

Los progresos realizados recientemente en el conocimiento de los constituyentes de los aceites esenciales y de la influencia que cada uno de ellos puede tener sobre los valores de las constantes analíticas han aportado un serio ataque a la calidad e igualmente al prestigio de las esencias naturales debido a la adulteración con sustancias sintéticas.

Por otra parte, el impulso dado al conocimiento de los componentes volátiles minoritarios y sus respectivas concentraciones ha hecho que incluso por técnicas tan sensibles como la cromatografía de gases se haga realmente difícil la identificación de los sucedáneos sintéticos de los aceites naturales (5).

En cuanto a los componentes sólidos con absorción en el espectro ultravioleta, se han añadido productos ajenos a las esencias naturales para producir una absorción dentro de los límites establecidos para los aceites genuinos (5). Sin embargo, como las fracciones sólidas de los aceites de cítricos son características de cada especie (41), su análisis puede constituir un método para detectar adulteraciones que

se llevan a cabo con mezclas de diferentes especies y/o por adición de aceites sintéticos.

Como el espectro infrarrojo de una muestra sintética no difiere esencialmente del correspondiente a una muestra natural, hemos recurrido a un fraccionamiento cromatográfico previo y a la comparación de los espectros de las fracciones respectivas en una muestra sintética y otra natural.

Separación cromatográfica. Análisis infrarrojo de las fracciones.

Las fracciones que más se diferencian en un aceite sintético y natural, por espectroscopía infrarroja, son las eluidas con acetato de etilo y metanol. En las figuras 69-73 se dan los espectros correspondientes. En la fracción del aceite sintético eluida con acetato de etilo se advierte una proporción considerable de α -terpineol (3400, 920, 798, 780, 770, 690 cm^{-1}) y por el contrario menor proporción de cumarinas que en una esencia natural.

También es característica la fracción eluida con alcohol metílico, que en la muestra sintética carece de algunas bandas con respecto a las de origen natural (3010, 1720, 1380, 1240, etc.) (figs. 72 y 73).

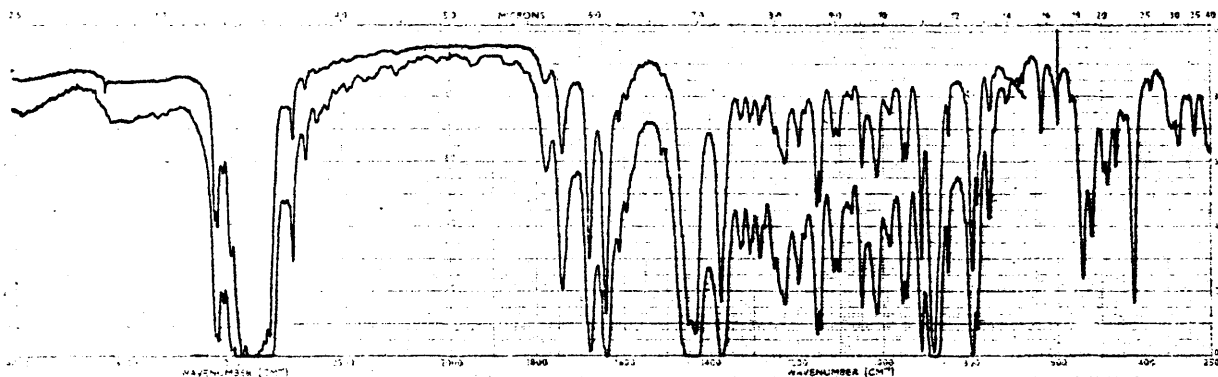


Fig. 69. Aceite de limón sintético; l = 0.1 mm y 0.03 mm.

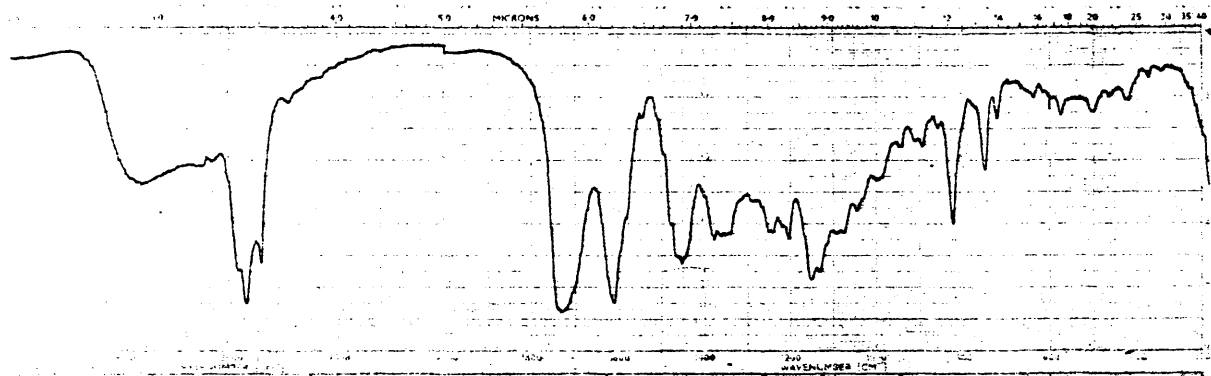


Fig. 70. Fracción acetato de etilo, en film.
Limón máquina Sevilla (1972)

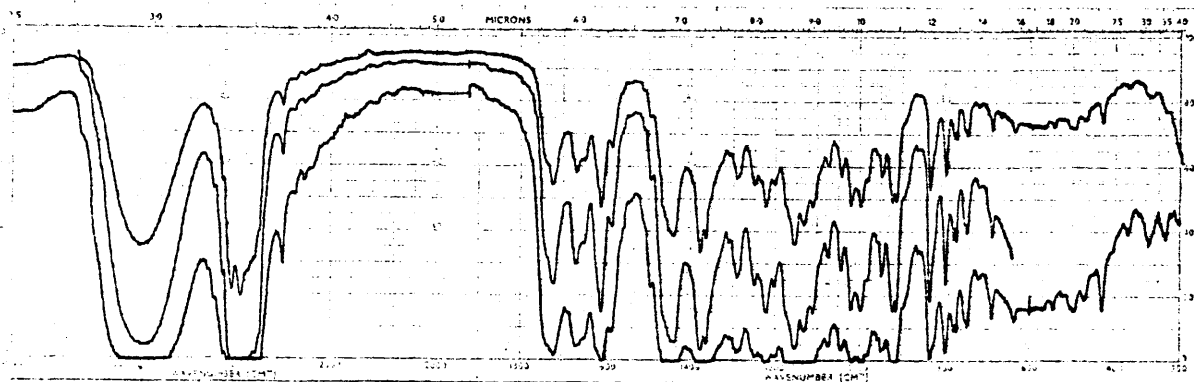


Fig. 71. Fracción acetato de etilo. Limón sintético.
l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

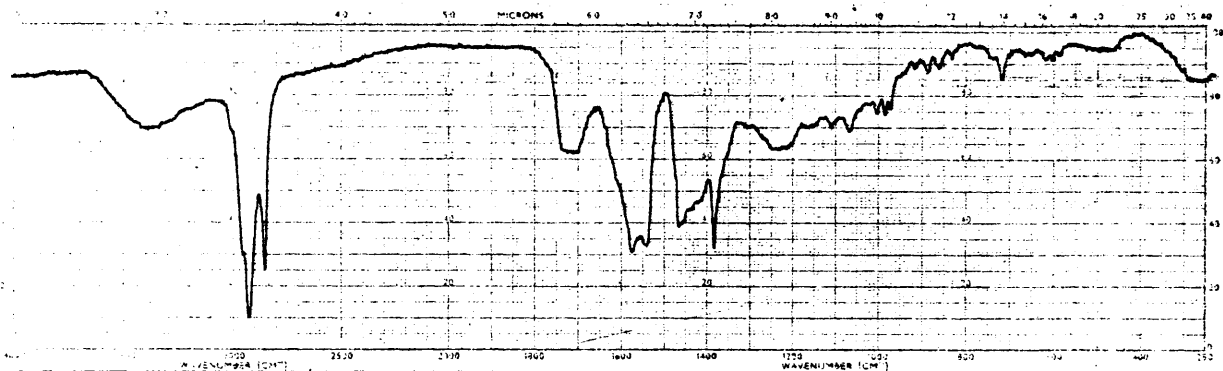


Fig. 72. Fracción metanol, en KBr.
Limón máquina Sevilla (1972).

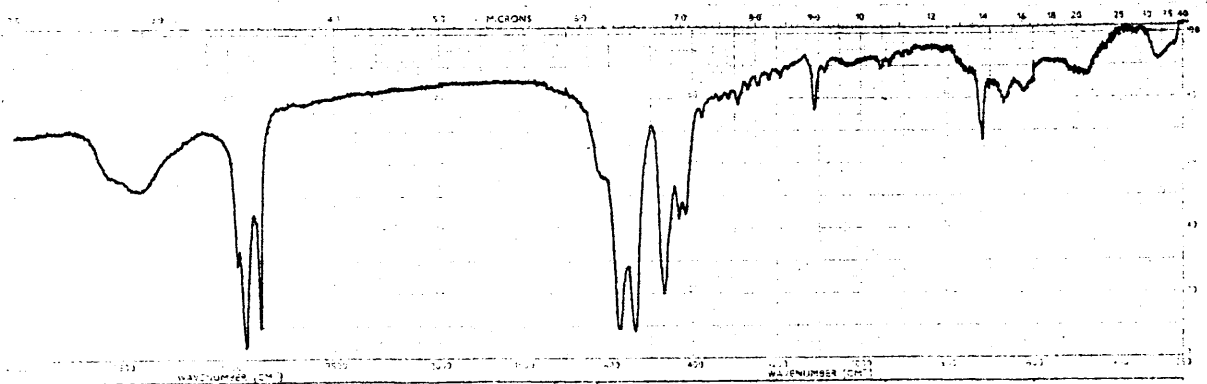


Fig. 73. Fracción metanol, en KBr. Limón sintético.

Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.

Según muestran los cromatogramas de las figuras 74 y 75, los componentes fundamentales de esta fracción son los mismos en los aceites naturales y sintéticos. Sin embargo, se observan diferencias significativas en las proporciones relativas de los componentes, por ejemplo, entre geranial y/o neral y acetato de geranilo. También hay diferencias notables en la proporción de linalol y en la existencia de algunos componentes minoritarios no comunes en las dos fracciones.

La conjugación de la espectroscopía infrarroja, cromatografía en columna y cromatografía de gases permite, por tanto, identificar los sucedáneos sintéticos de los aceites naturales mediante el análisis de las fracciones sólidas y de los productos minoritarios volátiles.

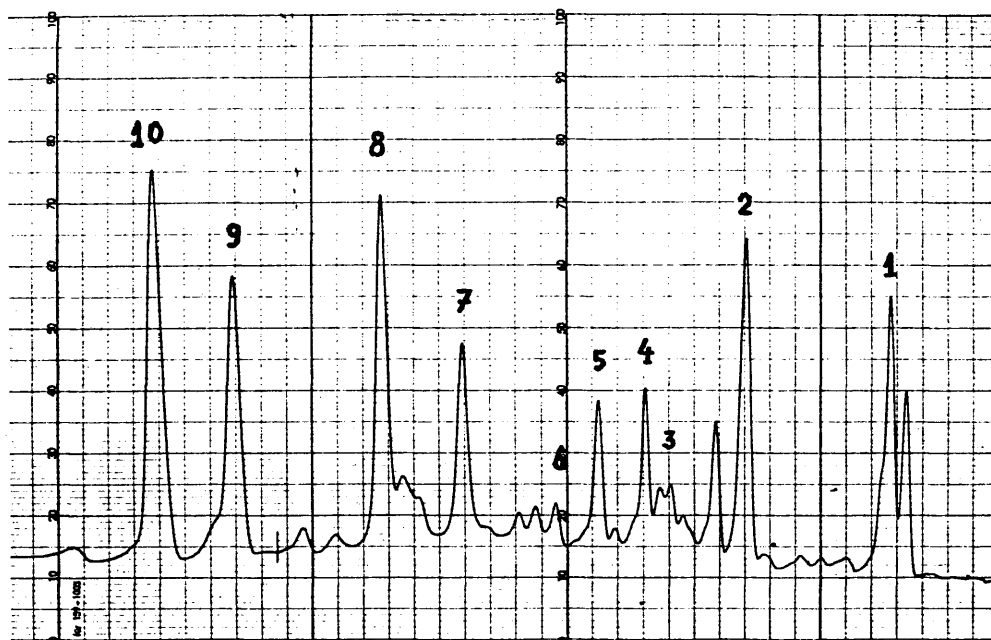


Fig. 74. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Limón máquina Sevilla (1972).

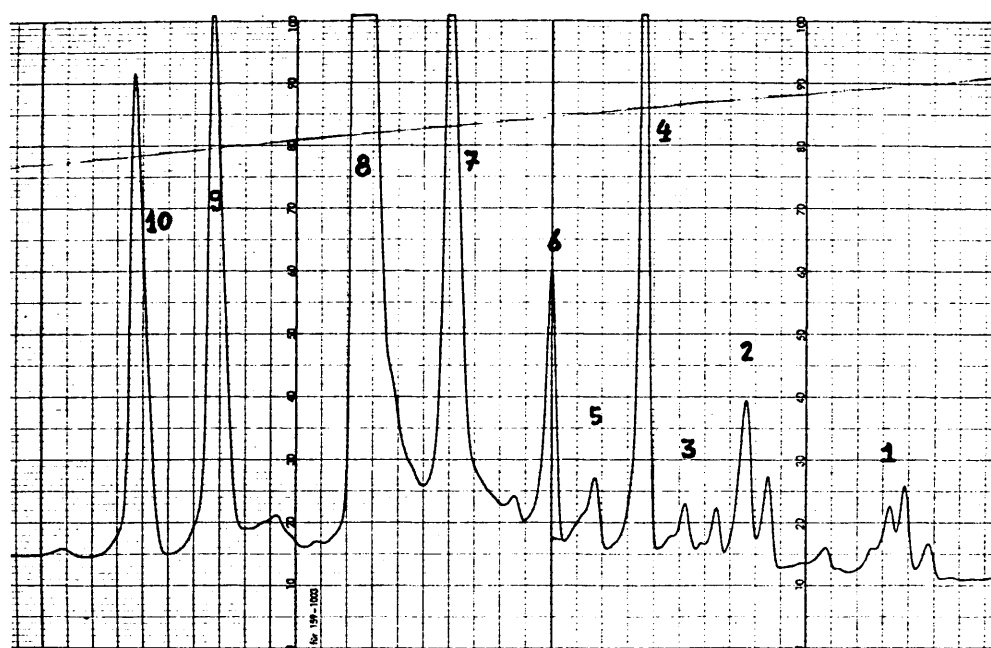


Fig. 75. Idem, limón sintético.

ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMON.

1) Antecedentes.

En relación con el envejecimiento del aceite esencial de limón se indicó en la bibliografía (64) que este aceite es especialmente susceptible a deteriorarse a causa del alto porcentaje en terpenos y bajo contenido en compuestos oxigenados. La primera etapa de este envejecimiento es la oxidación de los aldehidos alifáticos n-octanal, n-nonanal, n-decanal, y n-dodecanal a los correspondientes ácidos. La ciclación ácida del citral produce p-cimeno. Se da una explicación a la ausencia de p-cimeno en los aceites esenciales de naranja y bergamota por el menor contenido en citral y por la elevada proporción de compuestos oxigenados en los aceites de bergamota.

Ikeda y colaboradores (65) demuestran que la formación de p-cimeno podría no ser debida al citral, porque la concentración de este último en el aceite no es suficiente para explicar la cantidad de p-cimeno formado en el aceite envejecido. Además, el p-cimeno no aparece cuando el citral es añadido al aceite esencial de naranja. Se establece, por tanto, que el precursor del p-cimeno es el γ -terpineno, por un mecanismo de oxidación.

Rogers (6), tras un estudio del envejecimiento de este aceite por espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases establece que los principales componentes que originan el en-

vejecimiento son los terpenos, principalmente el γ -terpineno y el limoneno. El primero, en este proceso, da lugar a la formación de p-cimeno y el segundo produce cis y trans-carveol, óxidos de limoneno-1,2 y carvona. Por medidas de concentración comprueba que el p-cimeno procede fundamentalmente del γ -terpineno, de acuerdo con los autores anteriormente citados (65).

2) Productos de oxidación. Residuos sedimentables.

a) Envejecimiento natural.

Se han registrado los espectros infrarrojos de algunas muestras de aceites esenciales que se han almacenado durante un periodo largo de tiempo. El envejecimiento observado depende, entre otros factores, de la temperatura ambiente, de la transparencia a la luz visible del recipiente y también del origen de la muestra. Como ejemplo, las figuras 76-78 dan los espectros de 3 muestras de aceite esencial de limón de tipo máquina, almacenadas dos años en las mismas condiciones (frasco transparente y temperatura ambiente). La alteración observada en este caso, especialmente activada por la acción de la luz, es grande y, como discutiremos después, mucho mayor en el aceite de origen italiano.

Las variaciones espectrales son análogas a las producidas por calor y las comentaremos en el apartado correspondiente.

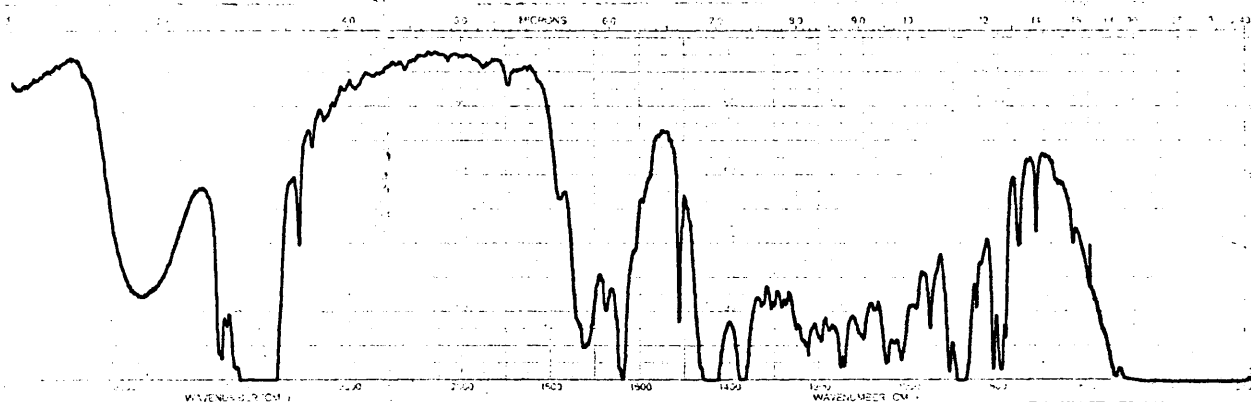


Fig. 76. Limón máquina Italia (1972) almacenado 2 años;
l = 0.1 mm.

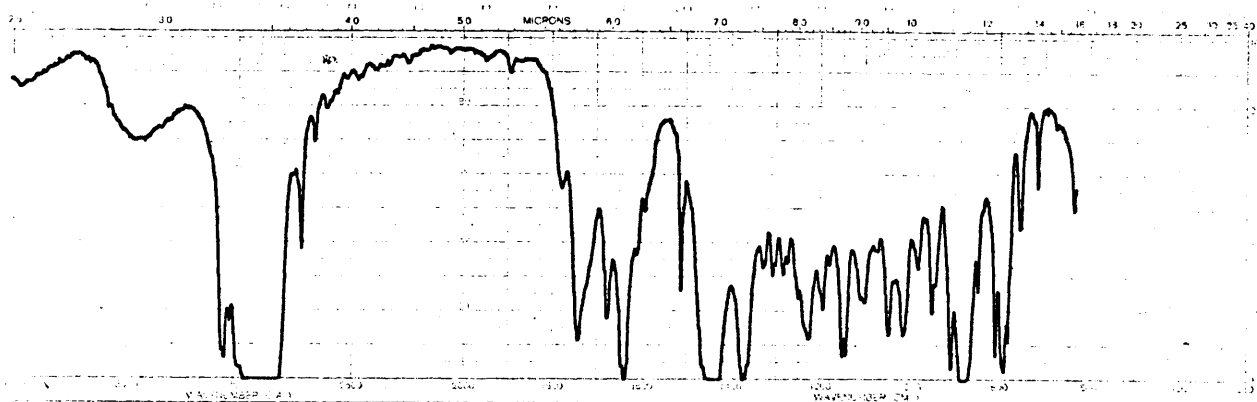


Fig. 77. Idem, limón máquina Sevilla (1972).

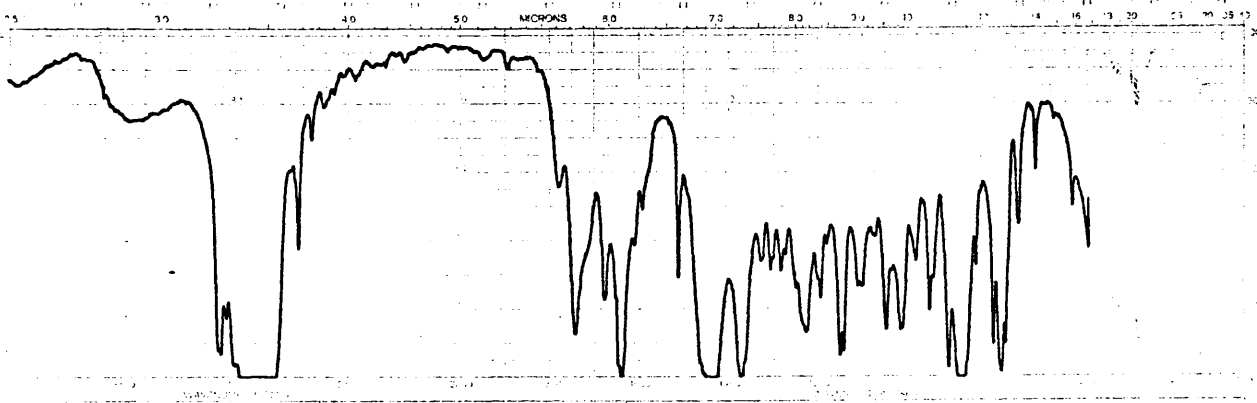


Fig. 78. Idem, limón máquina Murcia (1972).

b) Envejecimiento por luz ultravioleta.

Se han sometido siete muestras de aceite esencial de limón de diferente origen (Italia y Murcia) a la acción de la luz ultravioleta durante 8, 24 y 102 horas.

En el espectro infrarrojo se observan las siguientes variaciones, que aumentan con el tiempo:

Aumento de la absorción a 1725 cm^{-1} atribuida al grupo carbonilo de ácidos y a 1678 cm^{-1} correspondiente a la misma vibración en la carvona. Aumenta también la absorción en la región de 3500 cm^{-1} (grupo O-H de alcoholes) y la de las bandas a 1513 y 815 cm^{-1} del p-cimeno. Estos cambios en los espectros son análogos a los observados por envejecimiento natural y por acción del calor.

Caracteriza el envejecimiento por radiación ultravioleta, que al cabo de un tiempo relativamente corto (24 horas) se observa una disminución de las bandas a 1742 , 1611 y 825 cm^{-1} y la presencia de una banda nueva a 1770 cm^{-1} , lo que indica la transformación de cumarinas, probablemente en otros compuestos del mismo tipo. Nielsen (15) sugiere la posible dimerización de las cumarinas por la acción de la radiación ultravioleta. La banda a 1770 cm^{-1} puede también atribuirse simplemente a una lactona que se forma a partir de productos de oxidación intermedios.

En los ensayos realizados, a igualdad de condiciones, se ha observado un mayor deterioro en los aceites de origen

italiano, atribuible a su contenido menor en cumarinas como veremos más adelante.

c) Envejecimiento por acción del calor.

Con el fin de acelerar el proceso de envejecimiento se han sometido dieciocho muestras (las indicadas en la tabla 24) a la acción del calor (60° C) durante 20, 85 y 230 horas.

Los cambios experimentados son mayores que los producidos por acción de la luz ultravioleta y similares, por otra parte, a los que se producen por un prolongado almacenamiento, al menos en lo que se refiere a las bandas visibles.

En los espectros de las muestras envejecidas durante 20 horas se advierten pocas alteraciones, apareciendo solamente un pequeño aumento de la absorción a 1720 cm^{-1} (ácidos) y 3500 cm^{-1} (alcoholes).

En los espectros de las muestras envejecidas durante 85 y 230 horas (figs. 78a y 78b) aparecen cambios más profundos que se manifiestan por la aparición de óxidos de limoneno (840 cm^{-1}) y de los isómeros cis y trans del carveol y del 2,8-p-mentadien-1-ol, como veremos más adelante.

El fraccionamiento cromatográfico de las muestras envejecidas permite una identificación más precisa de los productos de oxidación. En las figuras 79-80 se dan los espectros correspondientes a las fracciones terpénicas de dos aceites envejecidos, uno por almacenamiento y otro por la

temperatura, y en la 81 el espectro infrarrojo del p-cimeno.

Como transformación más importante se advierte la del γ -terpineno (949, 780 cm^{-1}) a p-cimeno (1893, 1513, 1300, 1275, 1182, 1018, 815 cm^{-1}) y disminución de la concentración relativa mirceno/limoneno.

Los demás terpenos constitutivos de este aceite no sufren aparentemente isomerizaciones que, como se sabe, son posibles por catálisis ácida.

Los espectros correspondientes a la fracción n-hexano-acetato de etilo (figs. 82, 83 y 83a) presentan notables cambios, especialmente la muestra sometida a la acción de la temperatura. En primer lugar, se observa una disminución, mayor o menor según los casos, de las bandas del citral. Por otra parte, aparecen bandas nuevas en los espectros debidas a productos de oxidación:

La banda a 3500 cm^{-1} corresponde a varios alcoholes que pueden identificarse por otras absorciones: cis-carveol (1080, 1040, 1000, 913 y 805 cm^{-1}), trans-carveol (1170, 1155 y 805 cm^{-1}), cis-2,8-p-mentadien-1-ol (1108, 946 y 735 cm^{-1}) y trans-2,8-p-mentadien-1-ol (1120, 983, 745 y 722 cm^{-1}). Las bandas a 3080, ν (=C-H), 1643, ν (C=C) y 888 cm^{-1} , ω (=CH₂), comunes a estos compuestos, son también características de la fracción oxigenada en un aceite envejecido. Por no disponer de patrones, para la identificación de los alcoholes terpénicos mencionados hemos recurrido a espectros de

la bibliografía (23), (tabla 23).

La absorción a 1678 cm^{-1} , que aumenta con el envejecimiento, corresponde a la carvona y está originada por la vibración de valencia del grupo carbonilo (conjugado con un doble enlace). Este compuesto presenta también, entre otras, bandas a 1330, 1110, 898, 570, 513, 490 y 303 cm^{-1} .

Los óxidos de limoneno se caracterizan, principalmente, por la banda a 840 cm^{-1} , ya mencionada. Además, el aumento de la absorción a 1095 y 915 cm^{-1} puede servir para diferenciar el isómero cis del trans, que presenta bandas a 1030 y 945 cm^{-1} .

Aunque en algunos casos, la asignación de bandas infrarrojas puede parecer ambigua, debido a la superposición o solapamiento de las mismas, la presencia de la mayor parte de estos compuestos oxigenados, producidos en el envejecimiento de la esencia y derivados del limoneno, ha sido confirmada en el caso del aceite esencial de naranja por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Otro de los compuestos identificados a partir de los datos de la bibliografía (23) ha sido el limonen-10-ol (1.8-(10)-p-mentadien-9-ol). Las bandas de absorción a 1330, 1310, 1233, 1200, 1155, 1143, 1110, 1080, 1043, 1027, 990, 980, 955, 912, 897, 797 y 757 cm^{-1} , aunque algunas se superponen a las de otros compuestos, justifican la presencia de

este alcohol terpénico en el aceite envejecido.

En los espectros de las fracciones arrastradas por acetato de etilo (figs. 84, 85 y 85a) se observa también un marcado aumento de la absorción ν_{O-H} así como de la intensidad de las bandas a 3080, 1643 y 888 cm^{-1} , que corresponden a una insaturación terminal. Los alcoholes terpénicos detectados son los mismos que en la fracción n-hexano-acetato de etilo. Por otra parte, los resultados infrarrojos para los aceites envejecidos por la temperatura revelan un gran deterioro de las cumarinas y formación de polímeros.

La comparación de la fracción metanol para un aceite fresco y envejecido (figs. 87-88), muestra, en este último caso, la formación de un polímero con grupos hidroxilo y carbonilo y, por otra parte, la presencia de dobles enlaces terminales.

La figura 86 representa el espectro infrarrojo de los residuos sedimentables del aceite esencial de limón, que corresponden fundamentalmente a cumarinas (1725, 1620, 1125, 1070, 825, 745 cm^{-1}), advirtiéndose además la presencia de ceras (2930, 1450, 720 cm^{-1}).

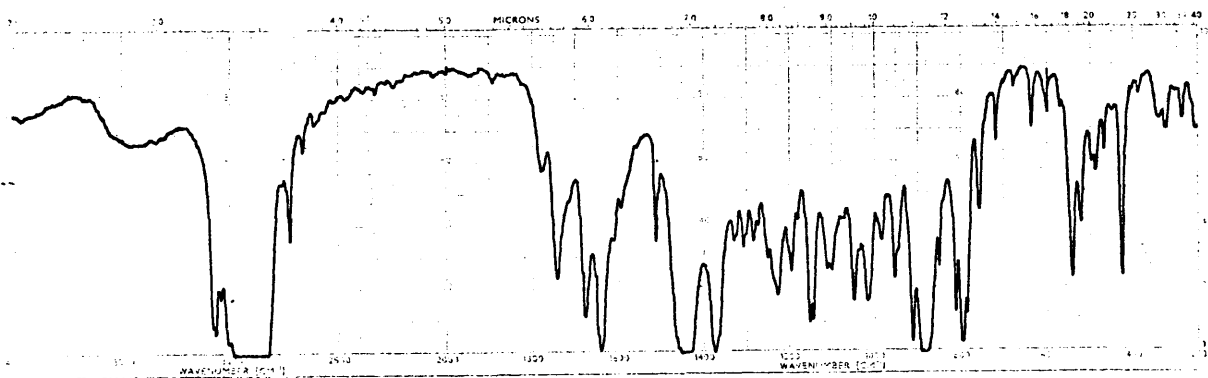


Fig. 78a. Limón máquina Italia (1972), envejecido 85 h.
a 60° C; l = 0.1 mm.

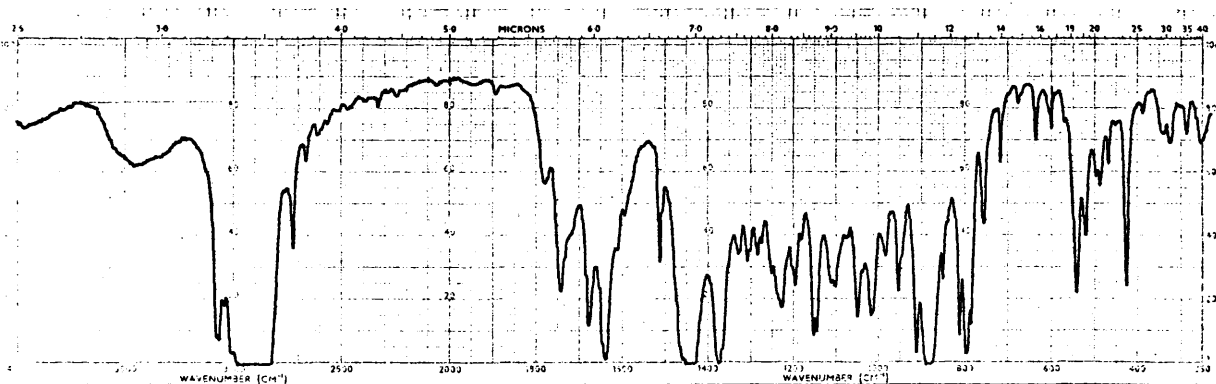


Fig. 78b. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

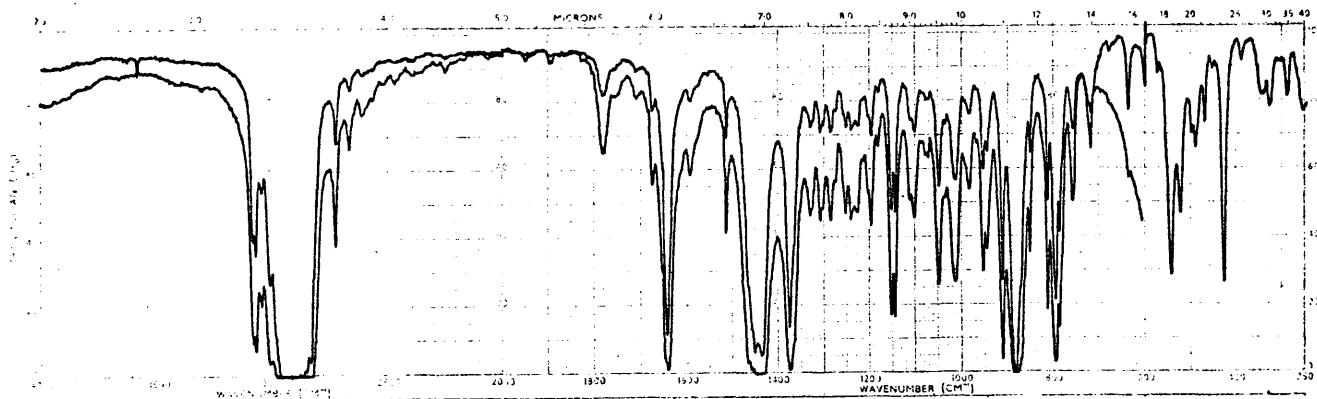


Fig. 79. Fracción terpénica. Limón esponja Murcia (1966), envejecido naturalmente 6 años; l = 0.1 mm y 0.03 mm.

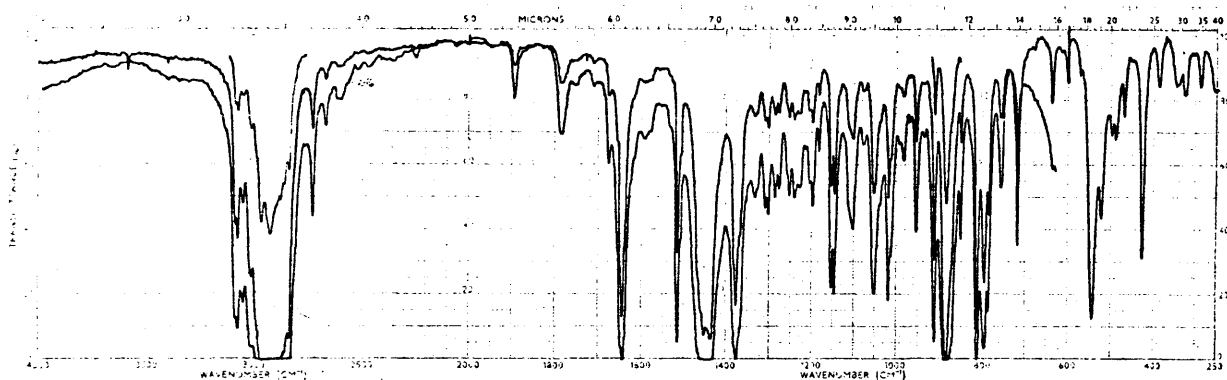


Fig. 80. Fracción terpénica. Limón esponja Murcia (1971), envejecido 230 h. a 60° C.

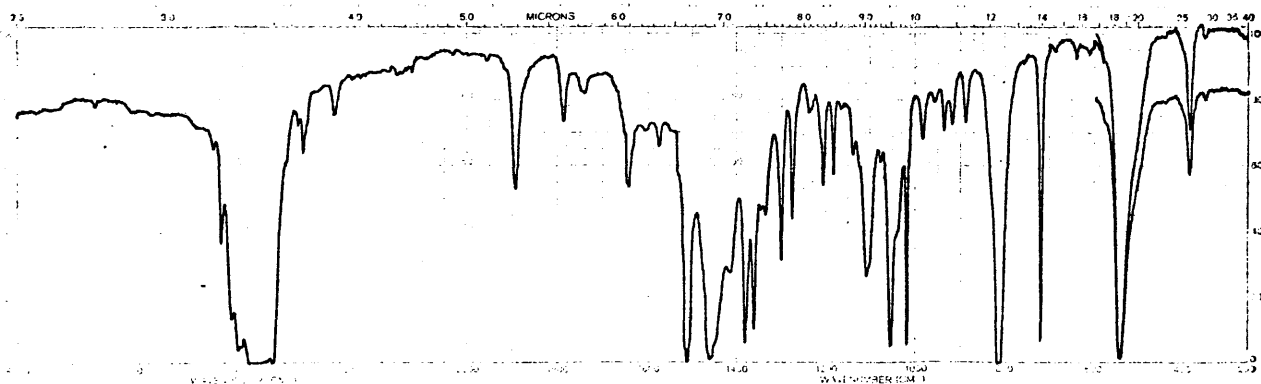


Fig. 81. p-cimeno.

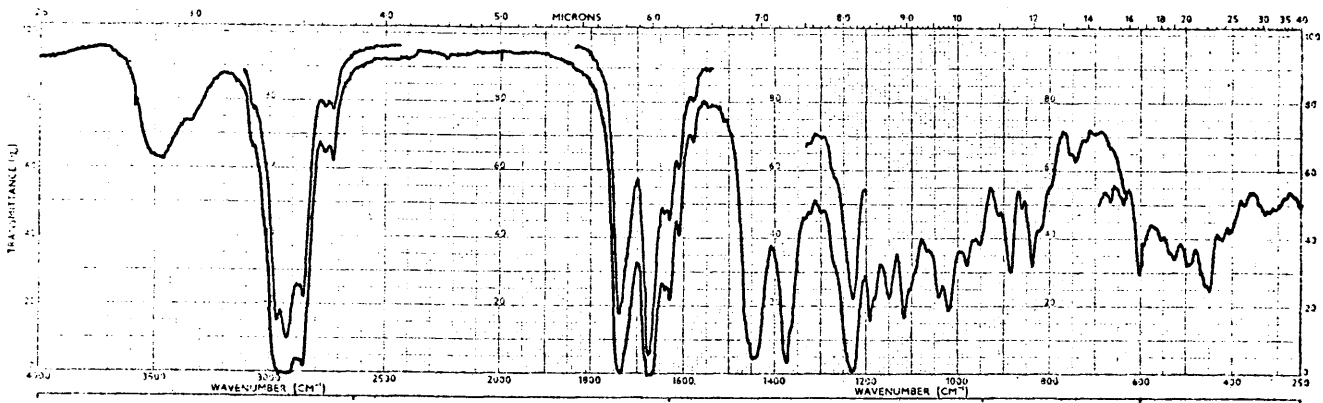


Fig. 82. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Limon esponja Murcia (1966), envejecido naturalmente 6 años; l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

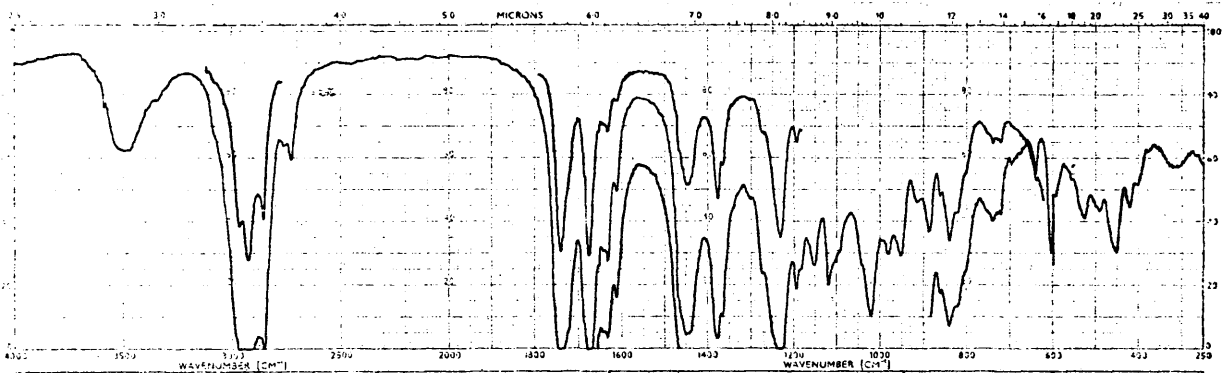


Fig. 83. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Limon esponja Murcia (1971); l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

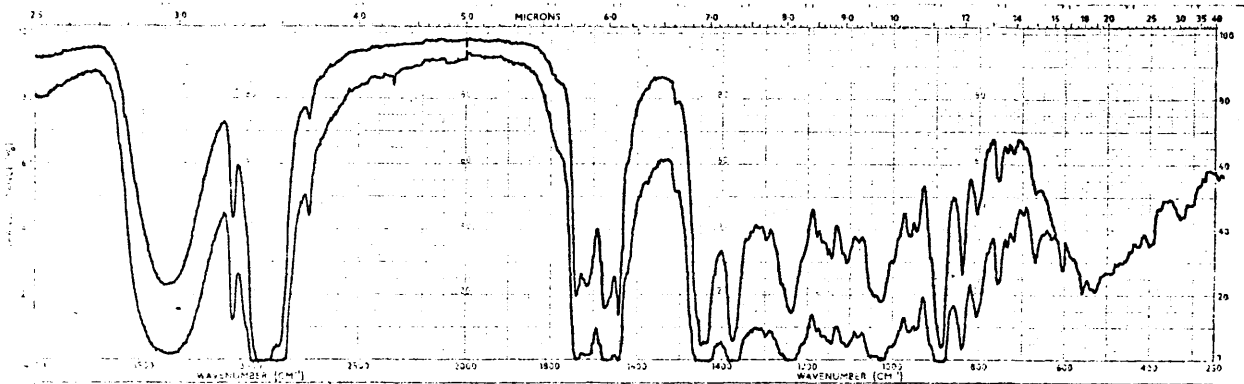


Fig. 83a. Idem, envejecido 230 h. a 60°C.

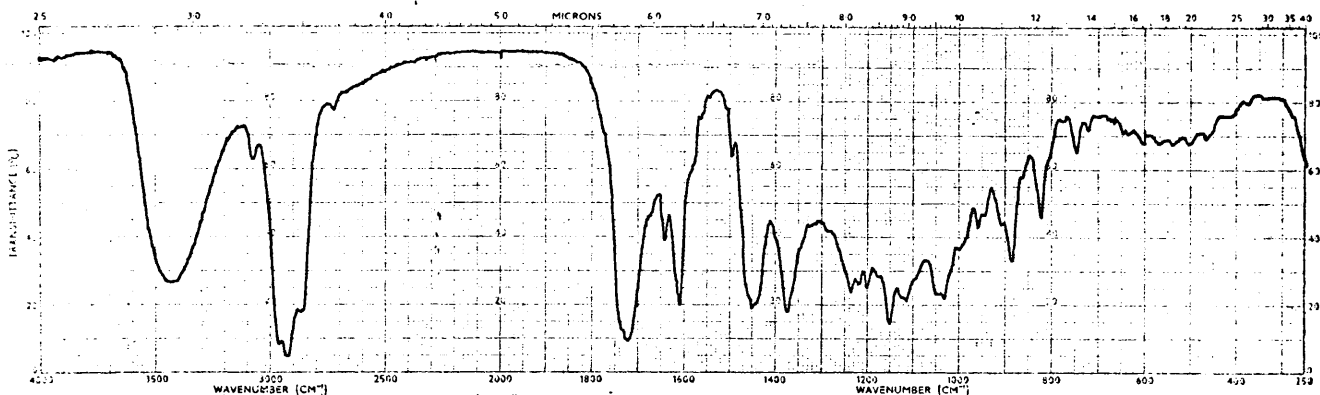


Fig. 84. Fracción acetato de etilo. Limón esponja Murcia (1966), envejecido naturalmente 6 años; en film.

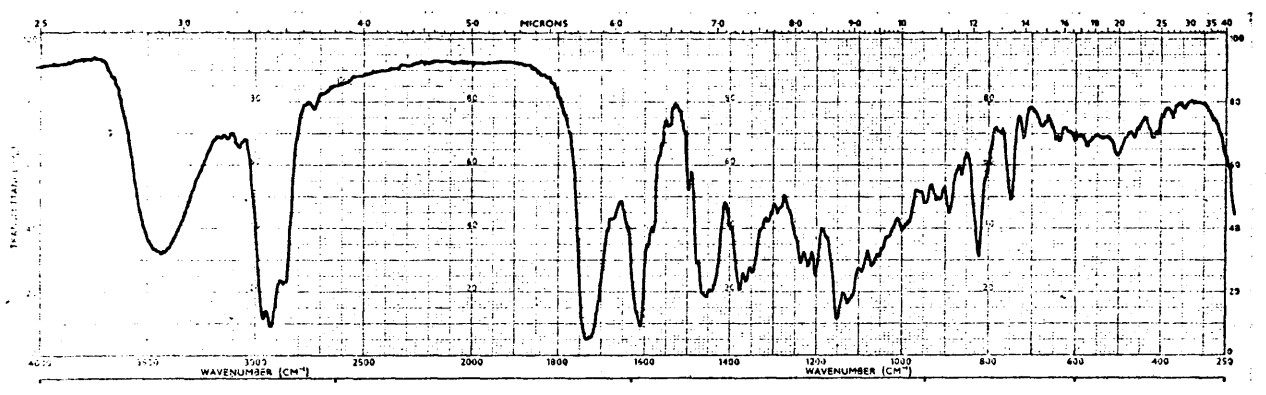


Fig. 85. Fracción acetato de etilo. Limón esponja Murcia (1971); en film.

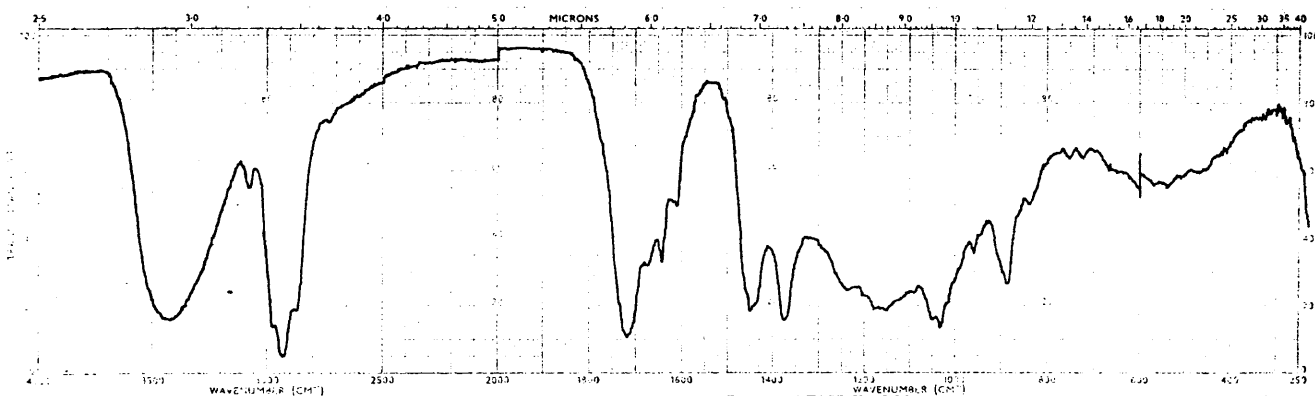


Fig. 85a. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

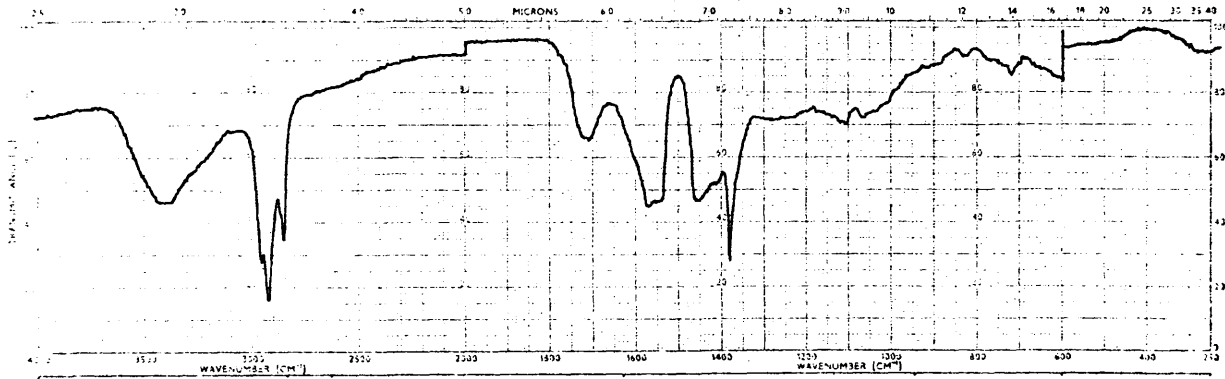


Fig. 87. Fracción metanol, en KBr. Limón esponja Murcia (1971).

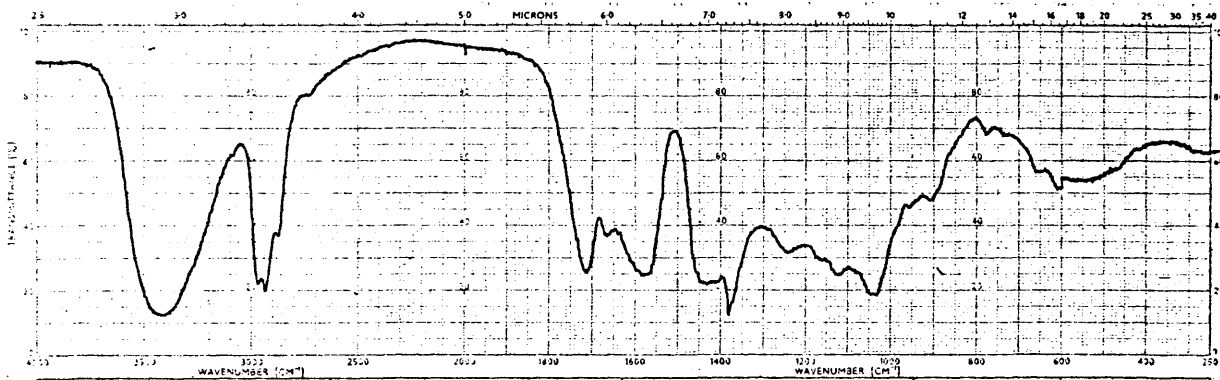


Fig. 88. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

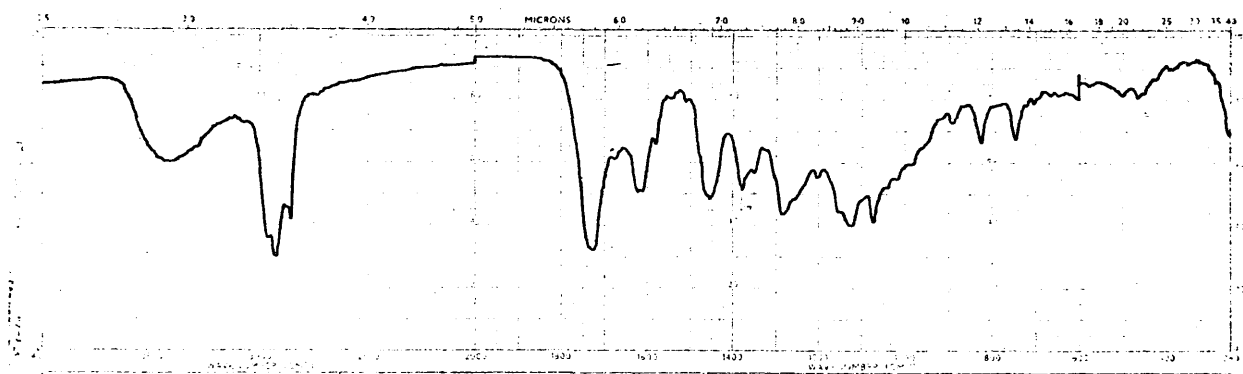


Fig. 86. Residuo sólido depositable por almacenamiento,
en KBr. Limón esponja Murcia (1966).

TABLA 23

Aceite esencial de limón envejecido 230 h. a 60° C

Fracción n-hexano-acetato de etilo.

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
3400	alcoholes (carveol, 2,8-p-mentadien-1-ol)
3080	carvona + carveol + 2,8-p-mentadien-1-ol + óxidos de limoneno
2970	carvona + carveol + 2,8-p-mentadien-1-ol
2930	carvona + carveol + óxidos de limoneno
2870	carveol + carvona
1740	acetatos de nerilo y geranilo
1715	ácidos
1678	carvona
1642	carvona + carveol + óxidos de limoneno
1450	carvona + carveol + óxidos de limoneno
1375	carvona + carveol + 2,8-p-mentadien-1-ol + óxidos de limoneno
1330	carvona + limonen-10-ol
1315	limonen-10-ol
1300	carveol
1235	acetatos de nerilo y geranilo
1215	óxidos de limoneno
1200	limonen-10-ol + 2,8-p-mentadien-1-ol
1180	<u>cis</u> -carveol
1170	<u>cis</u> -carveol + <u>trans</u> -carveol
1155	<u>cis</u> -carveol + <u>trans</u> -carveol + limonen-10-ol
1142	carvona + limonen-10-ol
1120	óxidos de limoneno
1110	acetato de geranilo + carvona
1095 L	<u>cis</u> -2,8-p-mentadien-1-ol + <u>cis</u> -óxido de limoneno-1,2
1080	cis-carveol + limonen-10-ol
1060 L	carvona

TABLA 23 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1055 L	<u>trans</u> -carveol
1040	<u>cis</u> -carveol + limonen-10-ol
1030	acetato de geranilo + <u>trans</u> -óxido de limoneno-1,2
1010 L	2,8-p-mentadien-1-ol
1000	<u>cis</u> -carveol
983	<u>trans</u> -2,8-p-mentadien-1-ol + limonen-10-ol
962	<u>cis</u> -óxido de limoneno-1,2 + <u>trans</u> -carveol
945	<u>trans</u> -óxido de limoneno-1,2 + <u>trans</u> -carveol
915	<u>cis</u> -carveol + <u>cis</u> -óxido de limoneno-1,2
900 L	<u>cis</u> -2,8-p-mentadien-1-ol
890	<u>cis</u> y <u>trans</u> -carveol + carvona + 2,8-p-mentadien-1-ol
840	óxidos de limoneno
805	<u>cis</u> y <u>trans</u> -carveol + carvona
798	<u>cis</u> y <u>trans</u> -óxido de limoneno-1,2 + limonen-10-ol
755	<u>cis</u> y <u>trans</u> -óxido de limoneno-1,2 + limonen-10-ol
735	<u>cis</u> -2,8-p-mentadien-1-ol
722	<u>trans</u> -2,8-p-mentadien-1-ol
605	acetatos de geranilo y nerilo
570 L	carvona
560	
535	carvona
513	carvona
490	carvona
475	carvona
440	carvona
400	carvona

d) Cromatografía de gases de la fracción n-hexano-acetato de etilo.

Para el estudio más detallado de los compuestos oxigenados que se forman en el proceso de envejecimiento del aceite esencial de limón hemos analizado por cromatografía de gases la fracción n-hexano-acetato de etilo de aceites envejecidos. En las figuras 89 y 90 se dan los cromatogramas correspondientes a dos muestras, fresca y envejecida.

Fueron identificados los siguientes productos: n-octanal (1), n-nonanal (2), citronelal (5), linalol (6), n-decanal (7), terpinen-4-ol (8) ?, neral (9), carvona (10), geranial (11), acetato de nerilo (12) y acetato de geranilo (13). Los picos (3) y (4) suponemos que corresponden a los óxidos de limoneno-1,2 cis y trans, que presentan los mismos tiempos de retención en los cromatogramas del aceite envejecido de naranja y que hemos identificado por espectrometría de masas. Por la misma razón, los picos a, b y c, que aumentan también en la fracción envejecida, son atribuibles a alcoholes derivados del limoneno.

Por comparación de las alturas relativas de los picos se puede observar que los componentes más lábiles son el geranial y neral, y los más estables son los esterés (acetato de nerilo y geranilo) y alcoholes (linalol). Incluso los aldehídos alifáticos lineales (n-octanal, n-nonanal) son más estables que el citral, resultado que está en con-

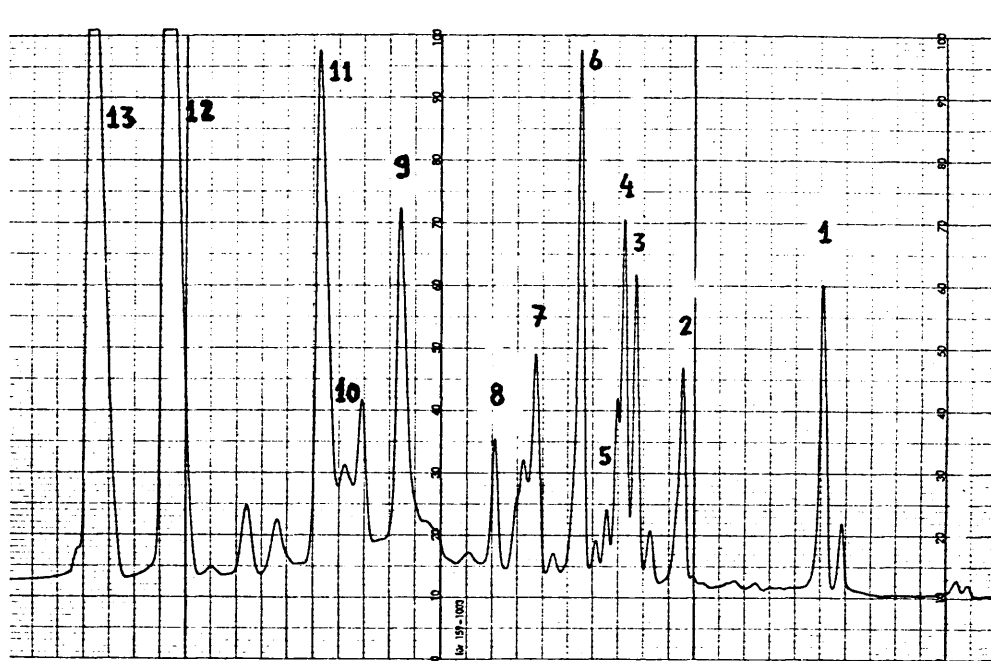


Fig. 89. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Limón esponja Murcia (1971).

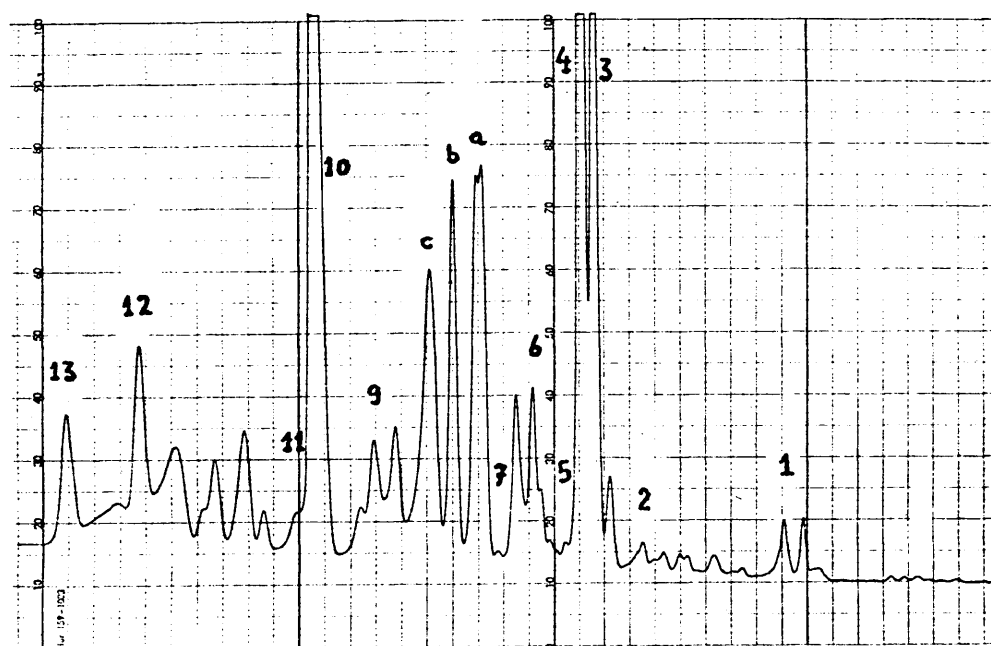


Fig. 90. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

tra de la hipótesis de Strausz (64) de que los compuestos aldehídicos de cadena lineal se oxidan muy fácilmente a ácidos que posteriormente ciclan el citral a p-cimeno.

3) Mecanismo del proceso de envejecimiento.

Los productos de oxidación del limoneno identificados por espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas en el aceite esencial de naranja se presentan también en los cromatogramas de los aceites esenciales de limón envejecidos, por lo cual se puede admitir que el limoneno sigue un mecanismo de oxidación semejante en el envejecimiento de ambos aceites: oxidación con intervención de radicales y reaccionabilidad de las moléculas terpénicas en los carbonos 1 y 2 fundamentalmente.

Como se indica en anteriores páginas, uno de los componentes oxigenados menos estables es el citral. En efecto, el espectro infrarrojo de la fracción n-hexano-acetato de etilo, tras un periodo de almacenamiento de 19 meses muestra la desaparición de la banda a 1680 cm^{-1} del citral ($\nu\text{C}=\text{O}$ conjugado con el doble enlace) y aumento de la absorción a 3500 y 1720 cm^{-1} (fig. 92). La ausencia de la banda a 2720 cm^{-1} indica que el producto formado en el envejecimiento del citral, al menos preponderantemente, no es un aldehído, como señalaba Strausz (64), sino un compuesto cetónico, responsable de la absorción a 1720 cm^{-1} .

Según G. A. Russell (52), la autooxidación produce la

ruptura de enlaces C-H fundamentalmente en posiciones alfa respecto a los dobles enlaces carbono-carbono. Por ello, la considerable reaccionabilidad de la molécula del citral puede explicarse mediante la pequeña energía necesaria para romper los enlaces C-H anteriormente citados, sobre todo si se da además la circunstancia, como en este caso del citral, de que existan en la molécula dobles enlaces conjugados. En la autooxidación de este compuesto resultan así radicales que se estabilizan por deslocalización de carga, tal como se indica en la figura 91.

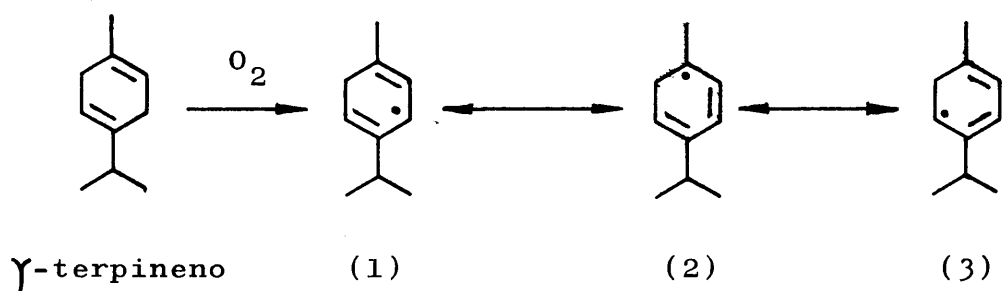
La desaparición de la banda a 1680 cm^{-1} exige una transposición del doble enlace conjugado al grupo carbonilo desde la posición 2-3 a 3-4, análoga a la observada por otros autores (66), o una saturación del mismo doble enlace (fig. 91).

Los productos del tipo (1) y (2) pueden transformarse en compuestos cetónicos mediante los radicales que intervienen en la oxidación y por ruptura de los enlaces C-H aldehídicos (66).

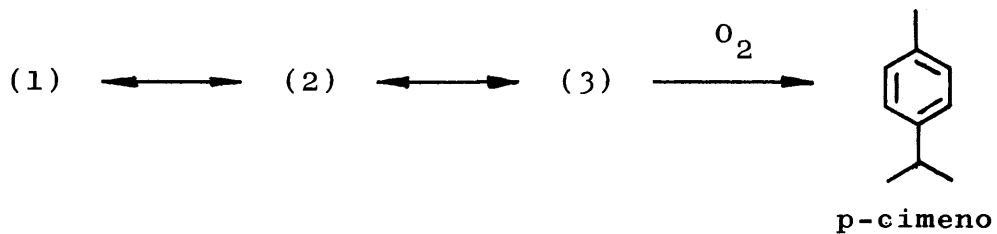
De acuerdo con los resultados infrarrojos, el producto final podría ser una molécula cíclica con grupos hidroxilo, cetónico e isopropilo (doble banda en la región $1380-1360\text{ cm}^{-1}$).

Análogamente, el γ -terpineno se transforma fácilmente en p-cimeno por la formación intermedia de radicales que se

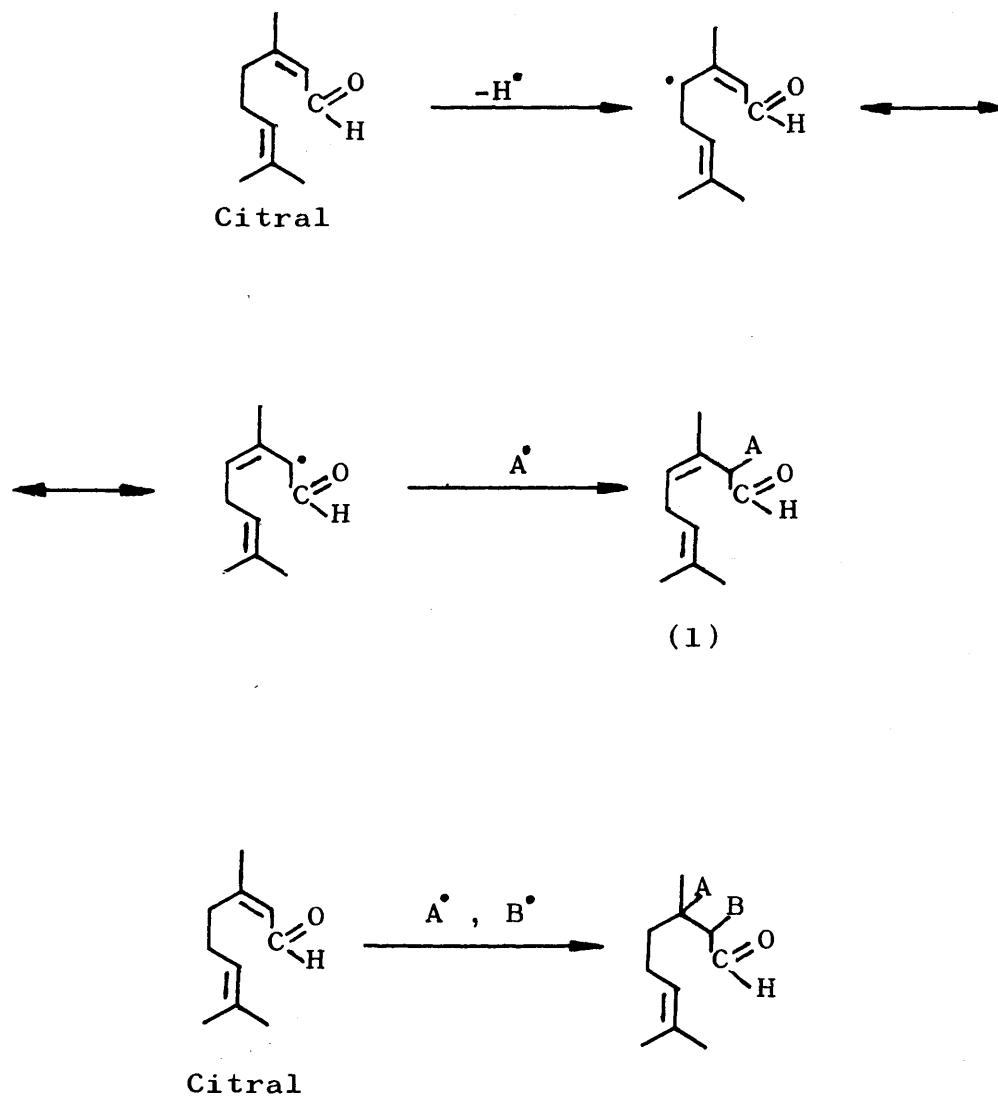
estabilizan por deslocalización de carga:



Estos radicales se estabilizan aún por pérdida de un átomo de hidrógeno y formando un anillo aromático:



También existe la posibilidad de que los radicales se unan entre sí dando lugar a los fenómenos de polimerización tan conocidos en los aceites esenciales (52).

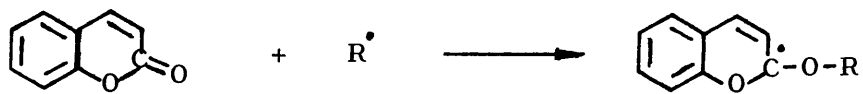


(A• = RO•, ROO•, OH•; B• = •RO, ROO•, OH•)

Fig. 91

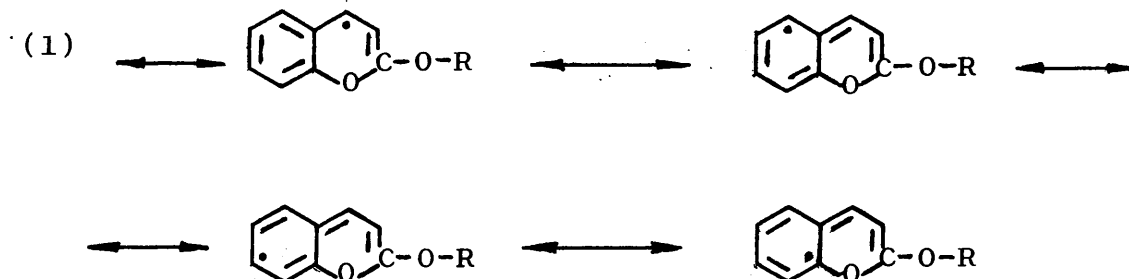
Estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento.

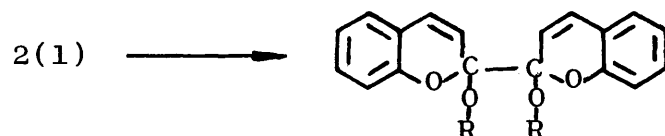
De acuerdo con lo indicado anteriormente y admitiendo el mecanismo de oxidación por medio de radicales, las cumarinas deberán comportarse como productos antioxidantes de manera análoga a las flavonas:



El que la unión del radical a la cumarina se produzca en el grupo carbonilo está de acuerdo con la disminución de la densidad óptica de la banda a 330 nm conforme avanza el envejecimiento del aceite (54).

El radical resultante de la reacción anterior puede estabilizarse por deslocalización de carga o unirse a otro, formando una molécula neutra:





Una prueba experimental de que las cumarinas actúan co antioxidantes la constituye el espectro de la figura 92, correspondiente a la fracción n-hexano-acetato de etilo, sin cumarinas, tras un periodo de almacenamiento de 19 meses.

Comparativamente, la fracción oxigenada conteniendo cu marinas, conserva buenas propiedades aromáticas y los componentes apenas han acusado transformación (fig. 92a).

Cuando los aceites difieren en la proporción de cumarii nas, como ocurre entre los aceites italianos y españoles, la estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento es distinta y de hecho bastante acusada (figs. 76-78).

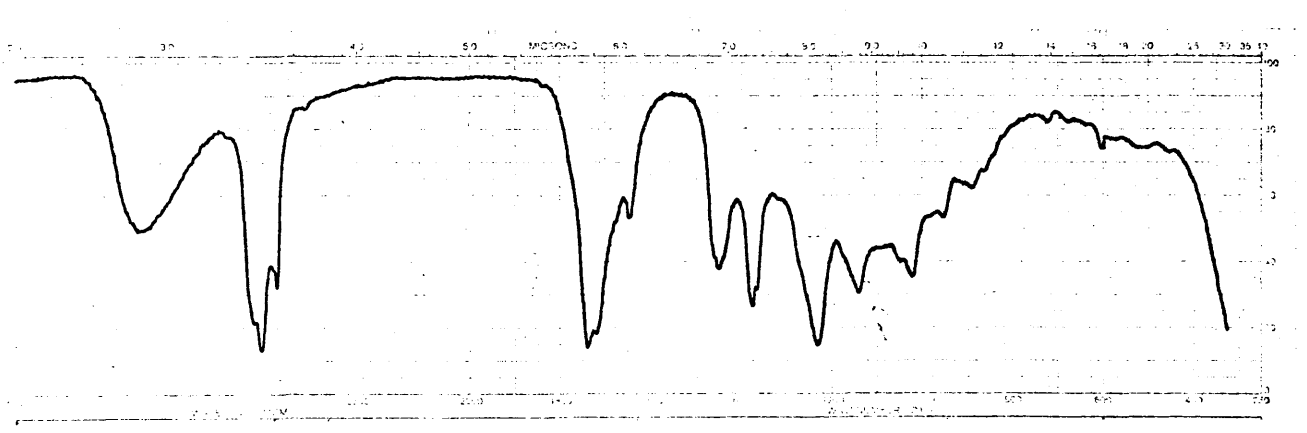


Fig. 92. Fracción n-hexano-acetato de etilo, almacenada 19 meses. Limón esponja Murcia (1971); 1 = 0.03 mm.

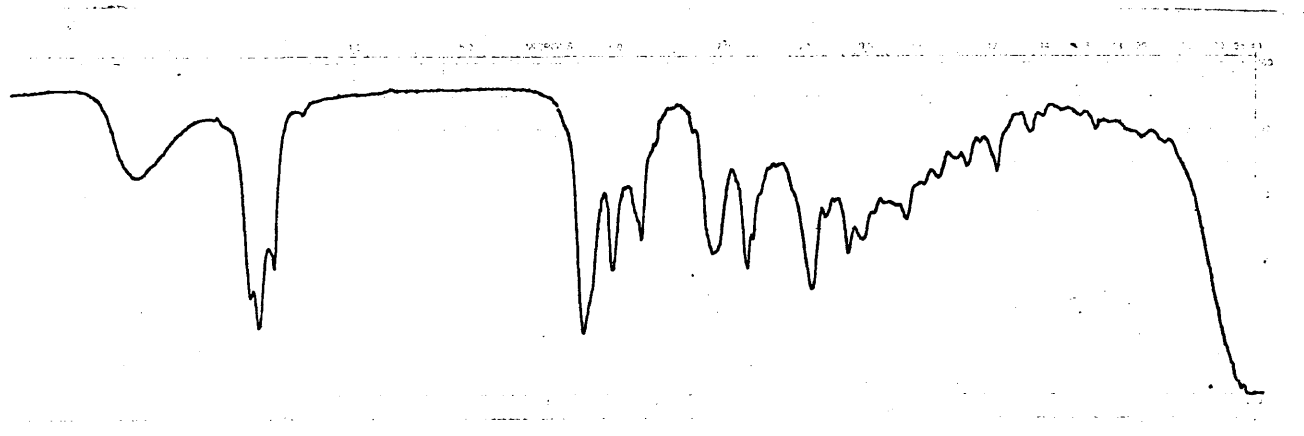


Fig. 92a. Fracción oxigenada total almacenada 19 meses. Limón esponja Murcia (1971); 1 = 0.03 mm.

Control del envejecimiento por espectroscopia infrarroja.

Determinación cuantitativa de p-cimeno.

En las tablas 24 y 25 se indican los grados de envejecimiento medidos por el tanto por ciento en peso de p-cimeno y las densidades ópticas a 3500 cm^{-1} , respectivamente.

Hemos llevado a cabo la valoración de esta sustancia a partir de mezclas patrón de limoneno y p-cimeno, con concentraciones de éste último comprendidas entre 0.7 y 7.8 % en peso. Hemos elegido como banda clave la situada a 1513 cm^{-1} y utilizado células de 0.098 mm de espesor.

La ecuación de la curva (fig. 93), ajustada por mínimos cuadrados, resultó ser:

$$\frac{D}{l} = 0.692 \cdot C - 0.015$$

en donde D es la densidad óptica de la banda clave, l el espesor de la célula en mm y C la concentración de p-cimeno en tanto por ciento en peso.

Los resultados obtenidos para las muestras estudiadas se dan en la tabla 24. Como señalamos anteriormente, se advierten sobre todo diferencias acusadas entre los aceites de origen italiano y español. Por otra parte, el grado de envejecimiento del aceite sintético estudiado es considerablemente elevado, lo que puede constituir un parámetro más para la identificación de los sucedáneos sintéticos de los aceites naturales.

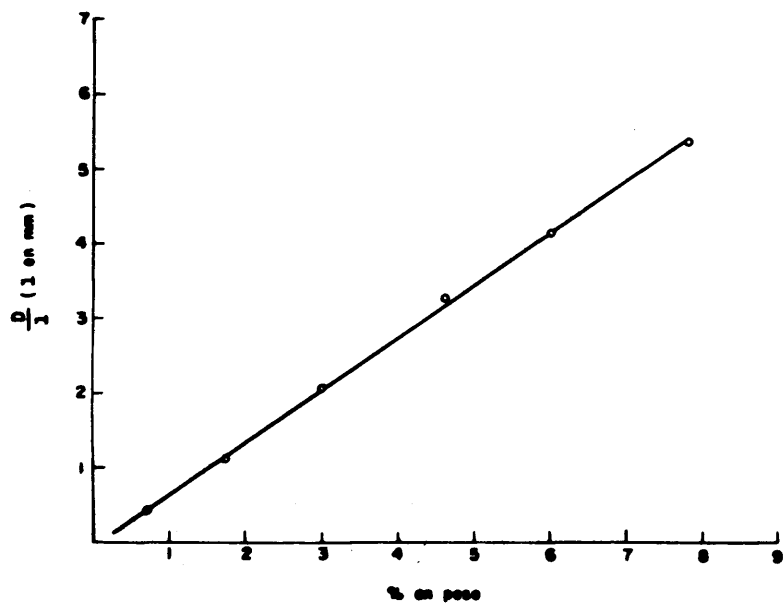


Fig. 93. Curva de calibrado del p-cimeno. Banda a 1513 cm^{-1} .

TABLA 24

MEDIDA DEL GRADO DE ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMON. (% DE p-CIMENO).

Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Envej. natural	Envej. a 60° C
			(10 meses)	85 h. 230 h.
1. Esponja, B	Murcia	1970	4.56	2.11 4.64
2. Esponja, MG	Murcia	"	4.32	---- 2.44
3. Esponja, R	Murcia	"	4.51	2.73 4.72
4. Máquina, MG	Murcia	"	4.62	3.36 4.78
5. Avena, GF	Murcia	"	3.18	1.98 3.88
6. Aguja, GF	Murcia	"	4.30	2.09 4.17
7. Italiano, G	Italia	"	6.01	4.13 5.10
			(8 meses)	
8. Esponja, B	Murcia	1971	1.98	0.91 3.17
9. Esponja, G	Murcia	"	1.82	0.76 2.79
10. Máquina, B	Murcia	"	2.43	1.34 3.53
11. Avena, B	Murcia	"	1.45	0.68 2.35
12. Avena, R	Murcia	"	1.27	0.61 1.71
13. Máquina, B	Italia	"	3.64	1.70 4.58
14. Italiano, G	Italia	"	3.25	1.63 4.17
15. Máquina, B	Murcia	1972	2.77	1.42 1.95
16. Máquina, B	Sevilla	"	3.62	2.18 4.11
17. Máquina, B	Italia	"	5.72	3.46 4.78
18. Sintético, D			5.45	3.21 5.13

TABLA 25

MEDIDA DEL GRADO DE ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMON (D ₃₅₀₀ cm ⁻¹) (+)						
Muestra (Método de obtención)	Origen	Cosecha	Envej. Natural	Envej. a 60° C	85 h.	230 h.
1. Esponja, B	Murcia	1970	(10 meses)	0.080	0.096	0.198
2. Esponja, MG	Murcia	"	0.061	0.035	0.084	
3. Esponja, R	Murcia	"	0.131	0.135	0.289	
4. Máquina, MG	Murcia	"	0.164	0.204	0.402	
5. Avena, GF	Murcia	"	0.040	0.076	0.155	
6. Aguja, GF	Murcia	"	0.046	0.079	0.172	
7. Italiano, G	Italia	"	0.484	0.160	0.488	
8. Esponja, B	Murcia	1971	(8 meses)	0.035	0.047	0.077
9. Esponja, G	Murcia	"	0.031	0.036	0.065	
10. Máquina, B	Murcia	"	0.044	0.050	0.164	
11. Avena, B	Murcia	"	0.028	0.031	0.055	
12. Avena, R	Murcia	"	0.021	0.023	0.048	
13. Máquina, B	Italia	"	0.072	0.099	0.182	
14. Italiano, G	Italia	"	0.066	0.062	0.171	
15. Máquina, B	Murcia	1972	0.126	0.037	0.052	
16. Máquina, B	Sevilla	"	0.146	0.041	0.098	
17. Máquina, B	Italia	"	0.267	0.098	0.136	
18. Sintético, D			0.266	0.083	0.143	

(+): 1 = 0.1 mm

ACEITE ESENCIAL DE BERGAMOTA

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS: COMPOSICION QUIMICA.

El estudio de la composición química del aceite esencial de bergamota ha sido realizado fundamentalmente por M. Calvarano (67) en las esencias oriundas de Reggio-Calabria. De acuerdo con los componentes identificados, podemos hacer la siguiente clasificación por funciones químicas:

Hidrocarburos terpénicos y sesquiterpénicos.

En los aceites de origen italiano se han identificado sabineno, α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, Δ_3 -careno, limoneno, p-cimeno, γ -terpineno, terpinoleno y α -tujeno.

Sólo tres sesquiterpenos se han encontrado formando parte de este aceite, a saber, bisaboleno, cariofileno y α -hergamoteno.

Aldehidos, cetonas, esterés.

Entre los aldehidos alifáticos lineales se conocen como componentes a los comprendidos entre el C₇ y C₁₂, ambos inclusive, excepto el n-undecanal.

Entre los compuestos cetónicos solo se han identificado la cis y trans-jasmona y la dihidrojasmona.

El acetato de linalilo es el componente mayoritario (alrededor del 40 %) y el que determina el valor comercial de este aceite, que también contiene otros esterés del ácido acético (acetato de octilo, terpenilo, nerilo y geranilo).

Alcoholes.

Se han identificado solamente el linalol, terpinen-4-ol, citronelol y α -terpineol (41).

Acidos.

Los ácidos presentes en el aceite esencial de bergamota son numerosos. De la serie alifática lineal han sido detectados el n-octanoico, n-nonanoico, n-decanoico, n-undecanoico, palmítico, tricosanoico, tetracosanoico, pentacosanoico y hexacosanoico.

También contiene este aceite los ácidos oleico, linoléico, cis-geránico, trans-geránico y dihidrogeránico.

Cumarinas.

Han sido identificadas las siguientes cumarinas: 5,7-dimetoxicumarina (citropteno), 5-geranoxi-7-metoxicumarina, 5-hidroxipsoraleno (bergaptol), 5-metoxipsoraleno (bergapteno) y 5-geranoxipsoraleno (bergamotina).

Carotenoides.

Se conocen alrededor de treinta carotenoides constituyentes del aceite esencial de bergamota. Prescindimos de su estudio por estar en concentraciones muy pequeñas.

ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES DE BERGAMOTA. VARIACION DE LA COMPOSICION QUIMICA CON EL AREA GEOGRAFICA DE CULTIVO.

1) Analisis infrarrojo de aceites sin fraccionar.

J. Bellanato y A. Hidalgo (11) han analizado este aceite por espectroscopía infrarroja en la región espectral comprendida entre 4000 y 650 cm^{-1} . Identificaron las bandas del limoneno, p-cimeno, citral, β -pineno, acetato de linalilo y linalol.

En el presente trabajo, completamos los resultados anteriores considerando además la región de 650 a 250 cm^{-1} . En la tabla 26 se dan los números de onda y asignaciones de las bandas infrarrojas correspondientes a las diversas muestras estudiadas. Las figuras 94-96 representan los espectros de tres aceites esenciales de diferente origen. En las figuras 97 y 98 se dan los espectros del acetato de linalilo y linalol, que son los componentes fundamentales de esta esencia.

Las bandas que predominan en el espectro pertenecen al acetato de linalilo (1740, 1253 cm^{-1} , etc.) y linalol (3470, 1110 cm^{-1} , etc.), que son los componentes más abundantes.

Entre los hidrocarburos terpénicos se hacen visibles el limoneno (1645, 890, 798 cm^{-1} , etc.), β -pineno (855 cm^{-1}), p-cimeno (1513, 813 cm^{-1}), γ -terpineno (780 cm^{-1}) y α -pineno (789 cm^{-1}).

Respecto al contenido en limoneno y acetato de linalilo, la muestra de bergamota italiana presenta una concentración

intermedia entre la de Sevilla y Mallorca. En estas dos últimas se han observado, durante las cosechas consideradas, notables diferencias sistemáticas respecto al contenido en limoneno, citral, acetato de linalilo y linalol.

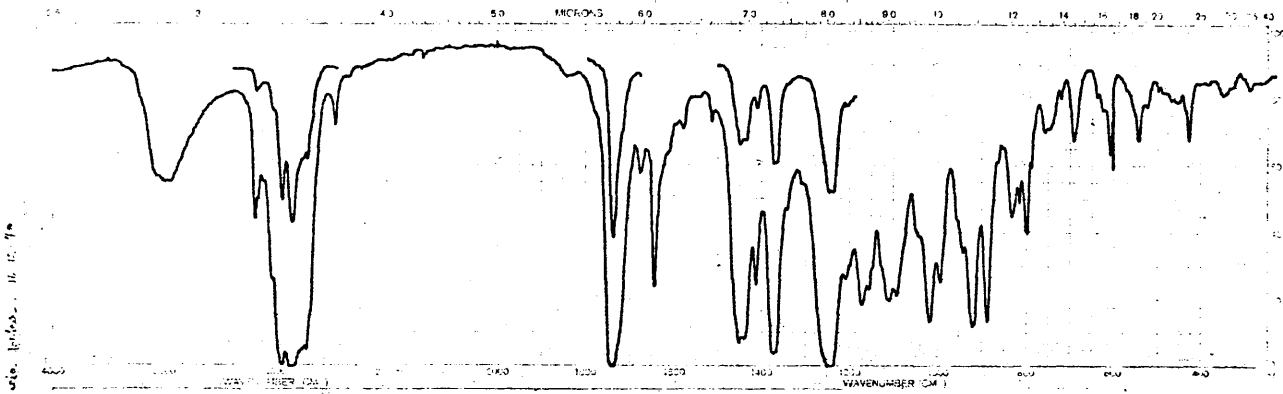


Fig. 94. Aceite esencial de bergamota Sevilla (1971);
l = 0.05 mm y film.

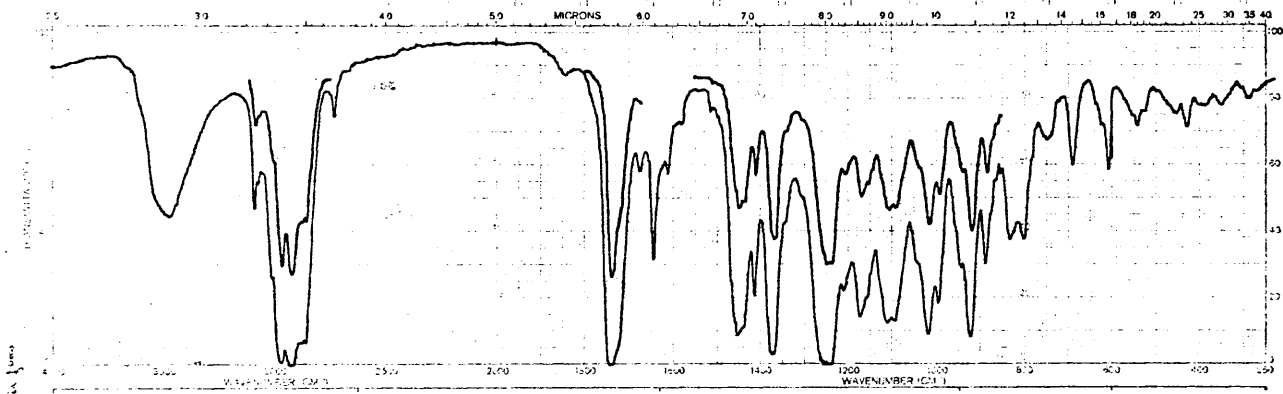


Fig. 95. Idem, Mallorca (1971).

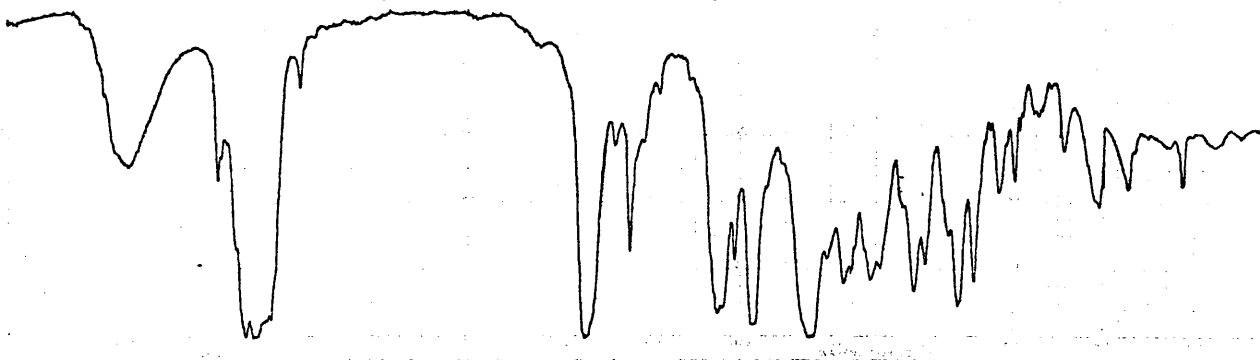


Fig. 96. Idem, Italia (1966).

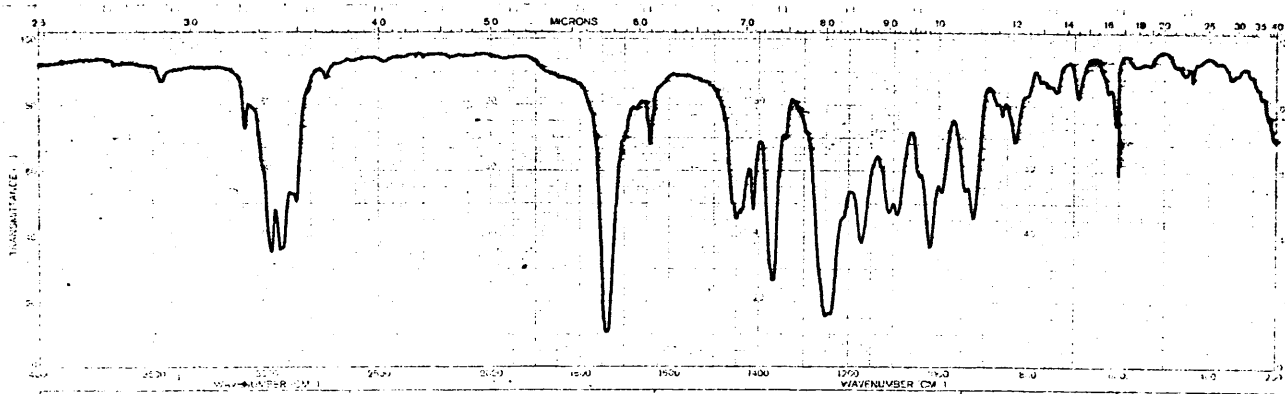


Fig. 97. Acetato de linalilo; film.

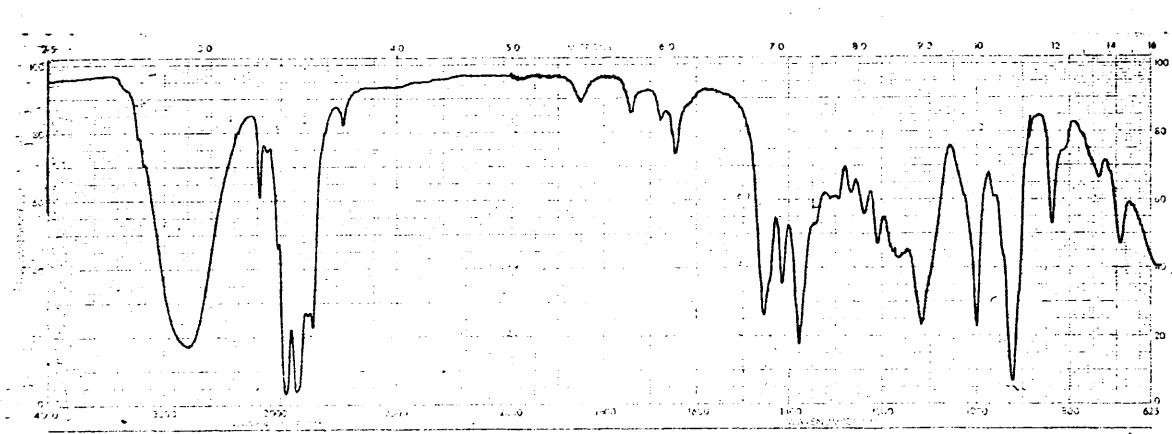


Fig. 98. Linalol; l = 0.025 mm.

TABLA 26

Aceite esencial de bergamota

Números de onda (cm⁻¹) de las bandas registradas.

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
3640 (+)	alcoholes primarios (n-octanol, n-deca <u>no</u> l)
3620 (+)	linalol
3540	linalol
3088	acetato de linalilo + linalol + limone <u>no</u>
3075	limoneno
3042	limoneno
3010 L	acetato de linalilo + limoneno
2970	acetato de linalilo + linalol + limone <u>no</u>
2930	acetato de linalilo + linalol + limone <u>no</u>
2860	acetato de linalilo + linalol + limone <u>no</u>
2830 L	limoneno
2730	acetato de linalilo + linalol + limone <u>no</u>
1740	acetato de linalilo
1730 L	cumarinas (principalmente bergap <u>teno</u>)
1680	citral
1645	acetato de linalilo + limoneno + lina <u>lol</u>
1610	bergap <u>teno</u>
1595	limoneno + mirceno
1580	bergap <u>teno</u>
1513	p-cimeno
1450	acetato de linalilo + linalol
1435	acetato de linalilo
1411	acetato de linalilo + linalol

TABLA 26 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1370	acetato de linalilo + linalol + limoneno
1342 L	acetato de linalilo
1253	acetato de linalilo
1245	acetato de linalilo
1208	acetato de linalilo
1171	acetato de linalilo
1155 L	limoneno
1145 L	limoneno
1125 L	bergapteno
1110	acetato de linalilo + linalol
1090	acetato de linalilo
1042 L	acetato de linalilo
1018	acetato de linalilo
992	acetato de linalilo + linalol
955 L	limoneno
942	acetato de linalilo
919	acetato de linalilo + linalol + limoneno
889	limoneno
875 L	β-pineno
855	β-pineno
864 L	acetato de linalilo
832	acetato de linalilo + linalol
813	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno
780 L	γ-terpineno
755	limoneno
745	bergapteno
740 L	acetato de linalilo + linalol

TABLA 26 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
720	p-cimeno + bergapteno
689	acetato de linalilo + linalol
638 L	limoneno
622	acetato de linalilo
608	acetato de linalilo
541	limoneno
520	limoneno + β -pineno
488	limoneno
468	limoneno
450	acetato de linalilo + linalol
425	limoneno
400	linalol
381	linalol
350	acetato de linalilo
325	limoneno
288	acetato de linalilo + limoneno

(+): medido en disolución en Cl₄C

Determinación cuantitativa de acetato de linalilo, linalol y limoneno.

Como el valor de esta esencia está relacionado directamente con el contenido en acetato de linalilo y linalol y viene disminuído por la concentración de limoneno, hemos procedido a determinar estos componentes en cada una de las muestras estudiadas.

Para el acetato de linalilo se eligió como banda clave la banda carbonilo a 1740 cm^{-1} preparando disoluciones en Cl_4C 0.015-0.104 M en una célula de 0.098 mm. Para el limoneno la banda clave más conveniente es la 890 cm^{-1} . Las concentraciones empleadas fueron 0.124-0.453 M y el mismo espesor de célula. En el caso del linalol se prepararon disoluciones diluídas en Cl_4C , de molaridad 0.0025-0.013, en células de cuarzo de 1 cm eligiendo como banda clave la $\nu_{\text{O-H}}$ a 3620 cm^{-1} ; en ello va implicado que se supone que no se encuentran presentes otros alcoholes en cantidad apreciable en la esencia.

Las ecuaciones para el acetato de linalilo, linalol y limoneno ajustadas por mínimos cuadrados fueron, respectivamente:

$$\frac{D}{1} = 59.06 \cdot M + 0.074$$

$$D = 64.73 \cdot M + 0.073$$

$$\frac{D}{l} = 14.87 \cdot M + 0.009$$

siendo D la densidad óptica de la banda clave, l el espesor de la célula en milímetros y M la concentración molar. En las figuras 99 y 100 se representan las curvas correspondientes al acetato de linalilo y limoneno.

A partir de mezclas sintéticas de estos tres componentes se obtuvieron, por aplicación de las ecuaciones referidas, unas concentraciones que difieren de las reales en menos del 1 %. Como veremos más adelante, las determinaciones cuantitativas realizadas por espectroscopía infrarroja se aproximan considerablemente a las obtenidas por cromatografía en fase gaseosa.

En la tabla 27 damos una relación de los resultados obtenidos para las esencias de bergamota estudiadas. Aunque la muestra italiana pertenece a la cosecha del 1966, la hemos incluido por no acusar su espectro infrarrojo transformaciones características del envejecimiento. Respecto a los componentes fundamentales, se ve en esta tabla que las esencias de Mallorca se aproximan más a los aceites de bergamota italiana. Los aceites esenciales de bergamota cultivada en la región sevillana muestran un porcentaje grande en limoneno. Datos adicionales se dan en los análisis realizados por cromatografía en fase de vapor.

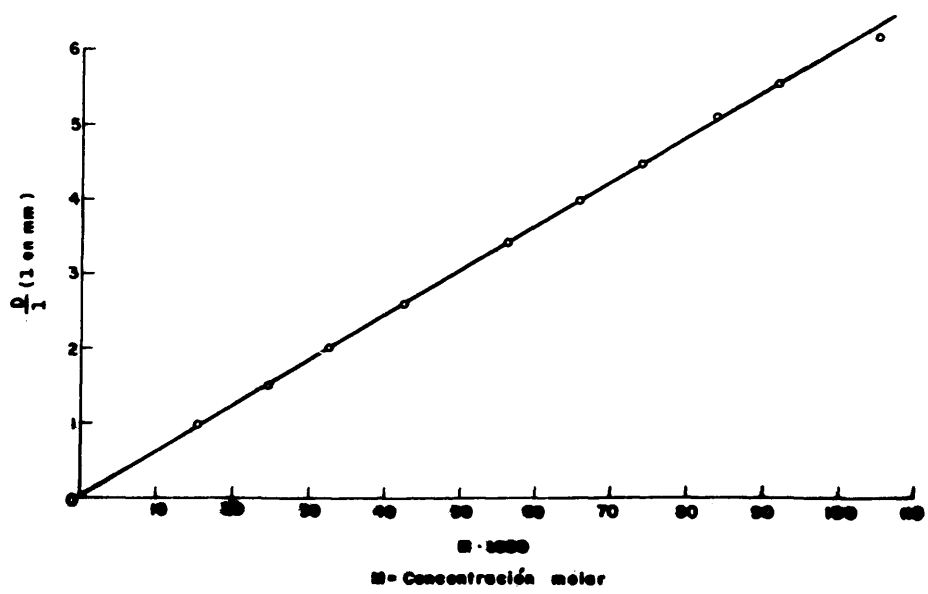


Fig. 99. Curva de calibrado del acetato de linalilo.
Banda a 1740 cm^{-1} .

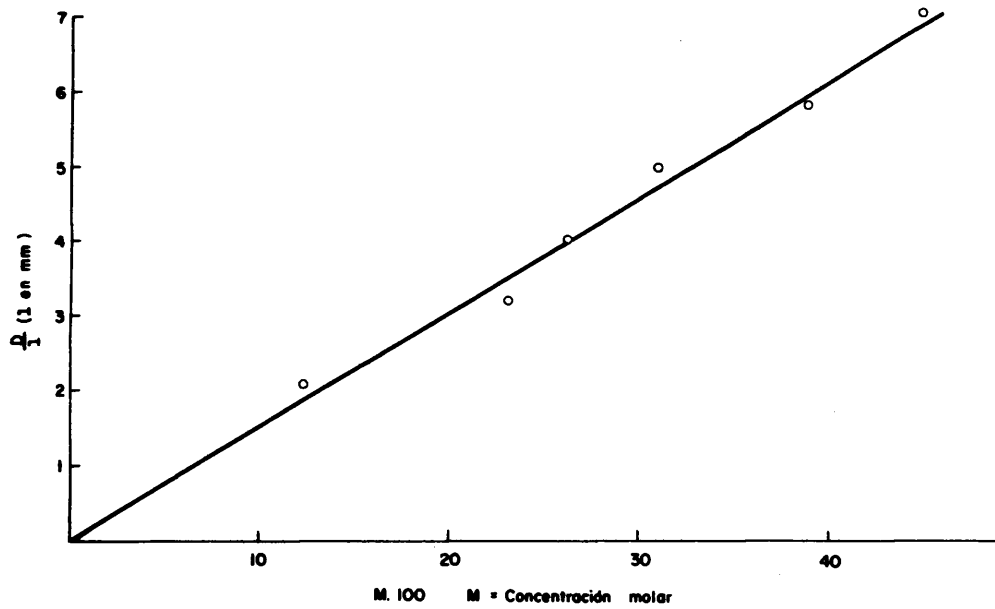


Fig. 100. Curva de calibrado del limoneno. Banda a 890 cm^{-1} .

TABLA 27

ACETATO DE LINALILO, LINALOL Y LIMONENO EN ACEITES DE BERGAMOTA (% EN PESO)						
Muestra	Origen	Cosecha	Acetato de linalilo	Alcoholes (linalol)	Limoneno	
1. Bergamota, HMS	Mallorca	1970	42.3	20.4	10.4	
2. Bergamota, HMS	Sevilla	"	39.8	14.8	38.3	
3. Bergamota, P	Mallorca	1971	44.9	20.9	12.2	
4. Bergamota, HMS	Sanlúcar	"	31.9	17.8	34.0	
5. Bergamota, HMS	Mairena	"	31.5	14.3	38.4	
6. Bergamota, HMS	Mairena	1972	30.8	14.7	36.7	
7. Bergamota, P	Italia	1966	40.4	18.3	21.0	
8. Bergamota, D (sintética)			40.5	16.2	34.2	

2) Fraccionamiento cromatográfico de las muestras.

En la tabla 28 se dan los tantos por ciento en peso de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, de seis aceites de diferente origen.

De acuerdo con la mencionada tabla y con los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja (tabla 27), los aceites de origen mallorquín son más ricos en fracción oxigenada que los de bergamota cultivada en Sevilla y muestran un porcentaje del mismo orden que el aceite italiano estudiado. Por el contrario, el contenido en limoneno es menor.

TABLA 28

ACEITE ESENCIAL DE BERGAMOTA. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO (% EN PESO)

Muestra	Origen	Cosecha	Fracción			
			n-hexano	n-hexano- acet. etilo	acet. etilo	metanol
1. Bergamota, HMS	Sanlúcar	1971	49.31		50.27 (1)	0.32
2. Bergamota, HMS	Mairena	"	53.66		46.14 (1)	0.21
3. Bergamota, P	Mallorca	"	33.70		65.96 (1)	0.34
4. Bergamota, HMS	Sevilla	"	45.31	50.38	3.89	0.30
5. Bergamota, P	Italia	1966	35.53	59.24	4.22	0.43
6. Bergamota, D (sintética)			46.01	49.44	4.20	0.34

(1): Fracción oxigenada total.

3) Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.

a) Fracción terpénica.

En las figuras 101-104 se muestran los espectros infrarrojos de las fracciones terpénicas obtenidas de tres esencias de bergamota española y una italiana. Se identifican fácilmente las bandas del limoneno (1645, 890 cm^{-1} , etc.), α -pineno (1125, 789 cm^{-1}), β -pineno (1225, 1105, 875, 855, 602, 450 cm^{-1}), γ -terpineno (948, 780 cm^{-1}), mirceno (1595 cm^{-1}) y p-cimeno (1513, 813, 388 cm^{-1}). También parece clara la presencia de α -bergamoteno, aunque las bandas infrarrojas se superponen más o menos a las de otros componentes. En la tabla 29 damos la interpretación propuesta para las bandas registradas.

Las diferencias más acusadas entre las tres fracciones de las figuras corresponden al contenido en γ -terpineno, p-cimeno y β -pineno, más abundantes en el aceite mallorquín, que sin embargo, presenta una proporción menor de limoneno, según indican los datos de la tabla 27.

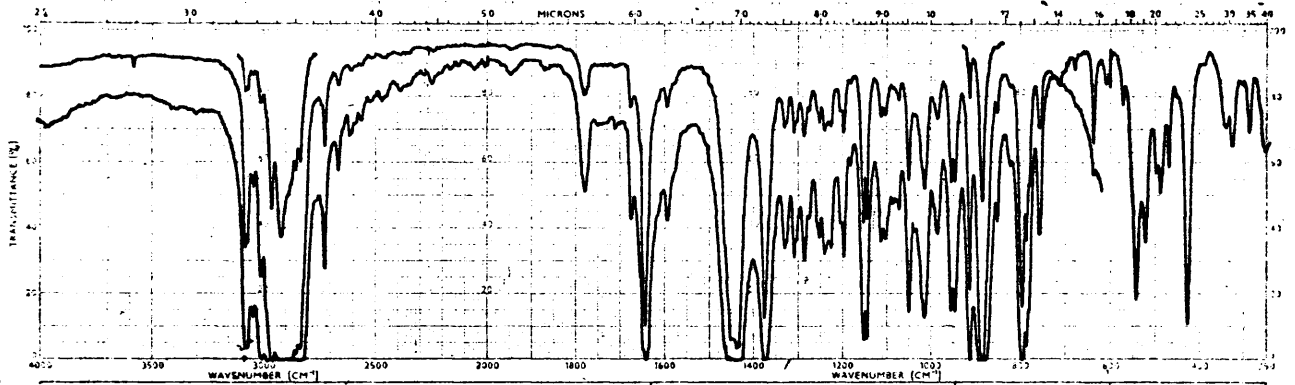


Fig. 101. Fracción terpénica. Bergamota Mairena (Sevilla), 1971;
l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

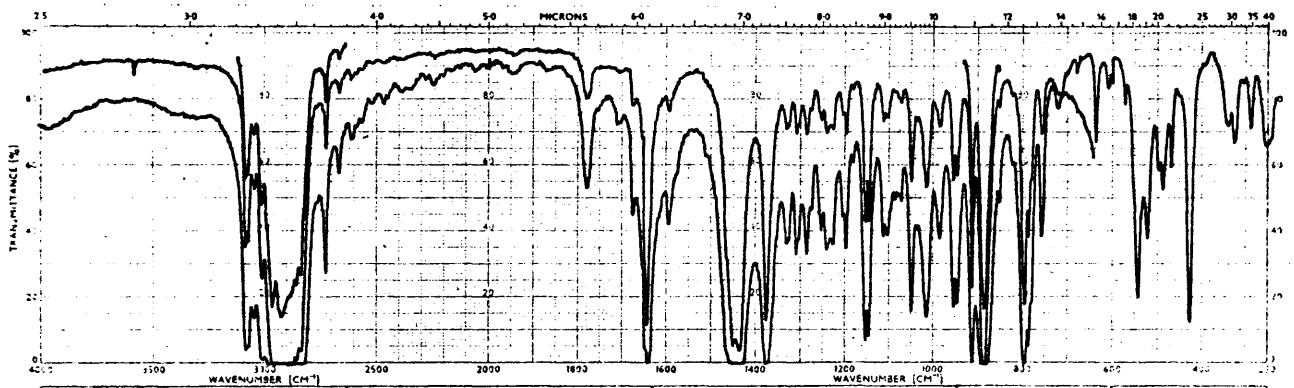


Fig. 102. Fracción terpénica. Bergamota Sanlúcar (Sevilla),
1971; l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

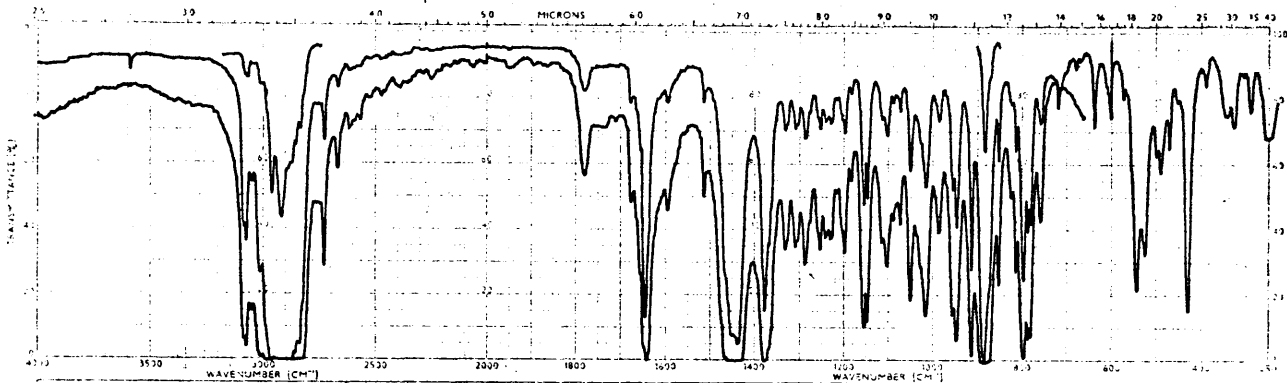


Fig. 103. Fracción terpénica. Bergamota Mallorca (1971);
l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

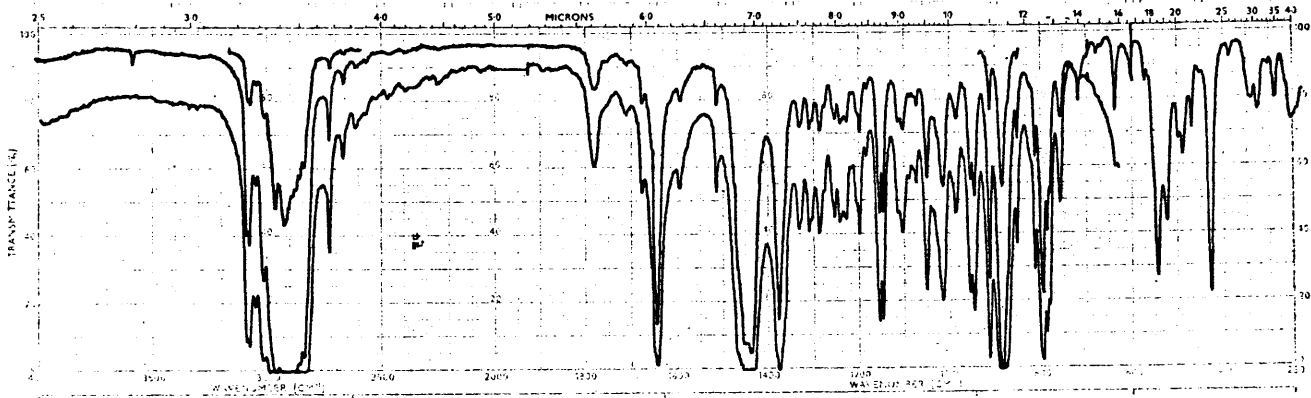


Fig. 104. Fracción terpénica. Bergamota italiana (1966);
l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

TABLA 29

Aceite esencial de bergamota

Fracción terpénica

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3085	limoneno
3075	limoneno + β -pineno
3045	limoneno
3010	limoneno
2960	limoneno
2920	limoneno
2870	limoneno
2830	limoneno
2730	limoneno
1780	limoneno
1680	limoneno
1665 L	sabineno
1645	limoneno
1595	limoneno + mirceno
1513	p-cimeno
1450	limoneno
1438	limoneno
1378	limoneno
1331	limoneno + β -pineno + α -pineno
1310	limoneno
1285	limoneno + γ -terpineno
1260 L	α -pineno
1255	limoneno + β -pineno
1241	limoneno
1230	limoneno + β -pineno
1217	α -pineno + β -pineno + α -bergamoteno

TABLA 29 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1205 L	α -pineno
1198	limoneno
1182	limoneno
1155	limoneno
1145	limoneno
1125 L	α -pineno
1105	β -pineno + α -bergamoteno
1090	γ -terpineno
1075	γ -terpineno
1050	limoneno
1030 L	γ -terpineno
1018	limoneno + γ -terpineno
1010 L	α -bergamoteno
985	limoneno + mirceno
955	limoneno
948	γ -terpineno
925 L	β -pineno
913	limoneno
890	limoneno + mirceno
875 L	β -pineno
855	β -pineno
825	γ -terpineno + α -bergamoteno
813	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno + α -pineno
780	γ -terpineno + α -bergamoteno
765 L	β -pineno + α -bergamoteno
759	limoneno

TABLA 29 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
730	α -bergamoteno
720	p-cimeno
675	limoneno
639	limoneno
625	limoneno
602	β -pineno
570	limoneno
540	limoneno
520	β -pineno + limoneno
498	limoneno
489	limoneno
468	limoneno
450	β -pineno
425	limoneno
388	p-cimeno
342	limoneno
325	limoneno

b) Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Las bandas que predominan en los espectros de esta fracción corresponden al acetato de linalilo y linalol (tabla 30). También se hacen visibles el citral y los aldehídos alifáticos, como n-octanal, n-decanal ($1730, 720 \text{ cm}^{-1}$), etc.

En las figuras 105-106 se dan los espectros de esta fracción para dos muestras, una española (Sevilla) no reseñada en tabla 27 y otra italiana. Se observan diferencias cuantitativas entre las dos muestras; por ejemplo, el menor contenido en citral y mayor proporción de linalol en la esencia italiana.

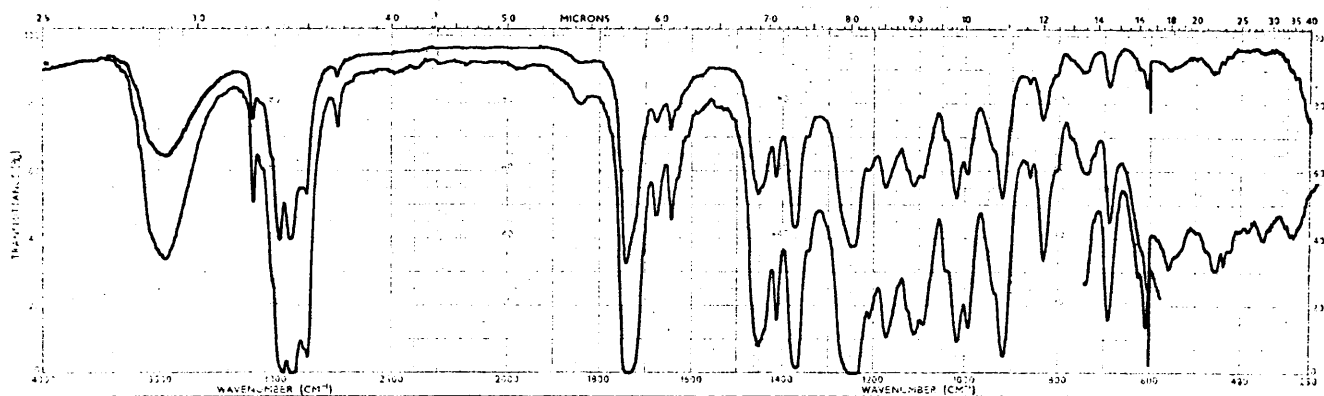


Fig. 105. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Bergamota Sanlúcar-Mairena 50-50 (v:v) (1971); l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

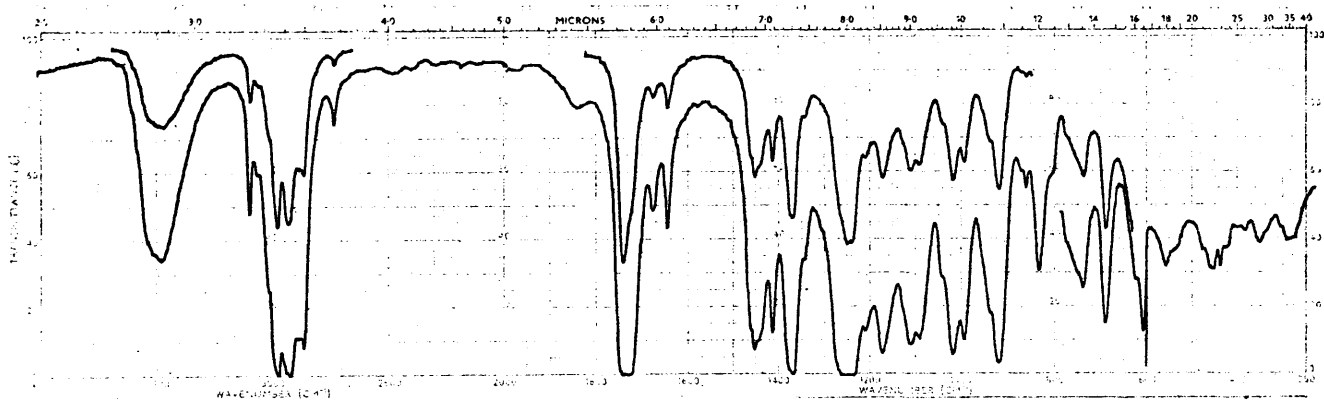


Fig. 106. Idem, Italia (1966).

TABLA 30

Aceite esencial de bergamota.

Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3470	alcoholes (principalmente linalol)
3088	acetato de linalilo + linalol
3010 L	acetato de linalilo
2970	acetato de linalilo + linalol
2930	acetato de linalilo + linalol
2860	acetato de linalilo + linalol
2730	acetato de linalilo + linalol
1740	acetato de linalilo
1730 L	aldehidos (n-octanal, n-decanal)
1680	citral (geranial + neral)
1645	acetato de linalilo + linalol
1611	geranial
1450	acetato de linalilo + linalol
1435	acetato de linalilo
1411	acetato de linalilo + linalol
1370	acetato de linalilo + linalol
1342 L	acetato de linalilo
1253	acetato de linalilo
1245	acetato de linalilo
1208	acetato de linalilo
1171	acetato de linalilo
1110	acetato de linalilo + linalol
1090	acetato de linalilo
1042 L	acetato de linalilo
1018	acetato de linalilo
992	acetato de linalilo + linalol

TABLA 30 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
942	acetato de linalilo
919	acetato de linalilo + linalol
861	acetato de linalilo
832	acetato de linalilo + linalol
802	acetato de linalilo
740	acetato de linalilo + linalol
720	aldehidos alifáticos
689	acetato de linalilo + linalol
625	acetato de linalilo
602	acetato de linalilo
558	linalol
530 L	acetato de linalilo
452	acetato de linalilo + linalol
438	acetato de linalilo
422	acetato de linalilo + linalol
350	acetato de linalilo
290	acetato de linalilo + linalol

c) Fracción acetato de etilo.

En las figuras 107-108 se dan los espectros de las fracciones de los aceites de Sevilla e Italia (correspondientes a las figuras 105-106). Los espectros 109-111 muestran las fracciones oxigenadas totales (II + III) de esencias cultivadas en Mairena (Sevilla), Sanlúcar (Sevilla) y Mallorca.

La fracción acetato de etilo está constituida fundamentalmente por bergapteno ó 5-metoxipsoraleno (1735, 1255 cm^{-1} , etc.), 5-geranoxi-7-metoxicumarina (1500 cm^{-1}) bergamotina ó 5-geranoxipsoraleno (1340, 1125, 1075 cm^{-1}) y terpineol (3500, 918 cm^{-1}) (tabla 31).

Considerando las figuras 107-108 se advierte menor concentración de bergapteno (1580, 1545, 1125 cm^{-1}) y mayor riqueza de 5-geranoxi-7-metoxicumarina (1155 cm^{-1}) en la fracción de origen sevillano (mezcla 50:50 de Sanlúcar y Mairena).

La comparación de las fracciones oxigenadas totales (figs. 109-111) muestra diferencias significativas respecto al contenido en terpineol (1125, 802 cm^{-1}), citral (1680 cm^{-1}) y cumarinas (1580, 747 cm^{-1}). Las fracciones de origen sevillano son más ricas en derivados carbonílicos.

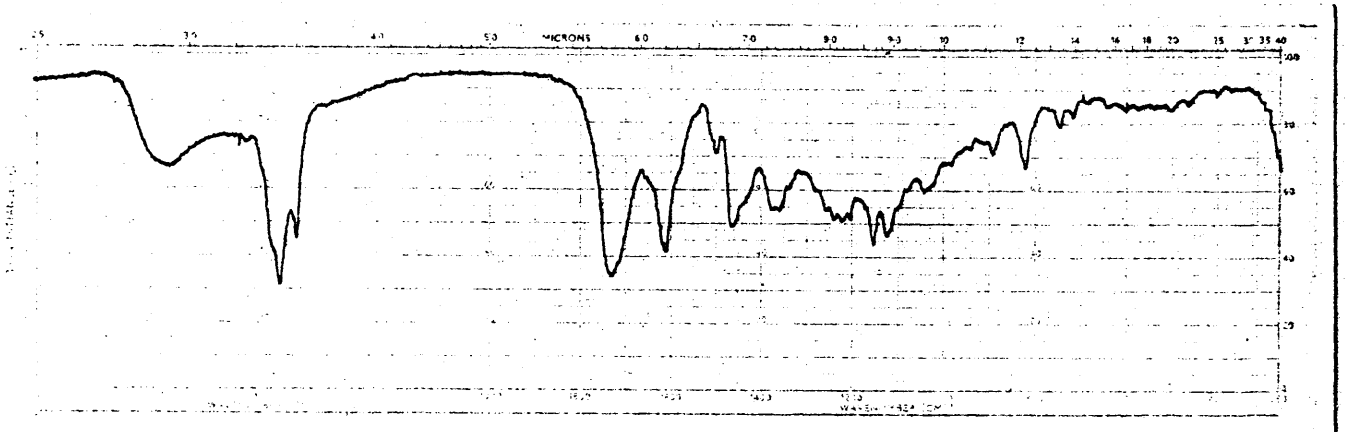


Fig. 107. Fracción acetato de etilo. Bergamota Sanlúcar-Mairena 50-50 (v:v) (1971); film.

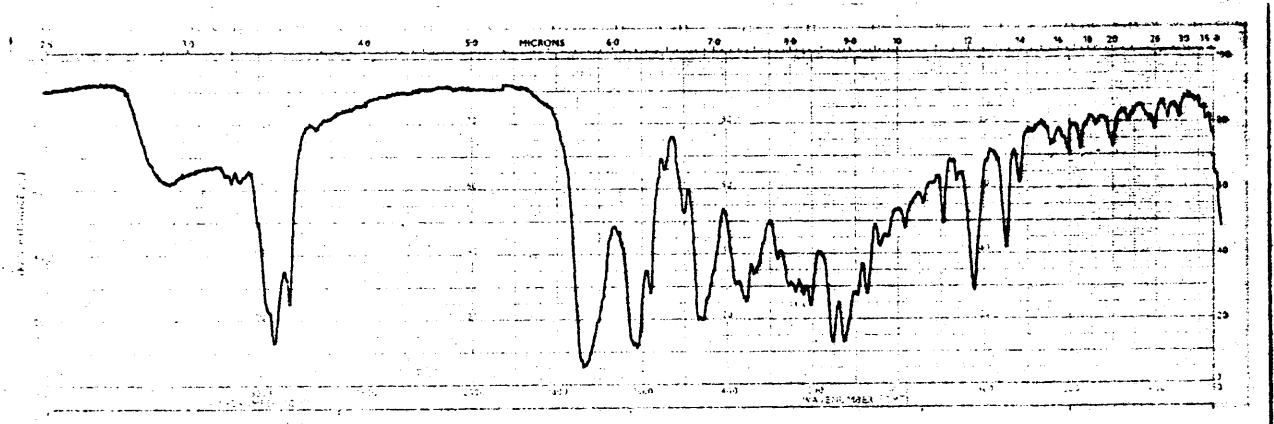


Fig. 108. Idem, bergamota Italia (1966).

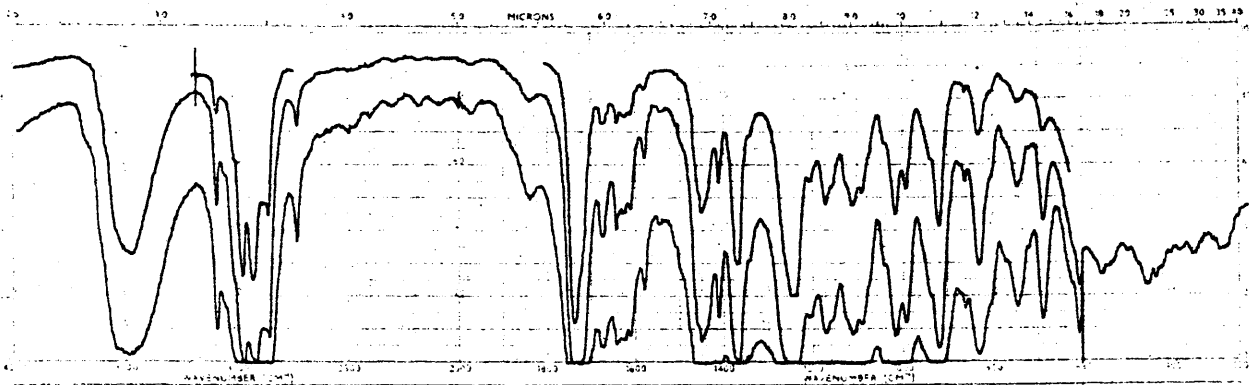


Fig. 109. Fracción oxigenada total. Bergamota Mairena (Sevilla) 1971; l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

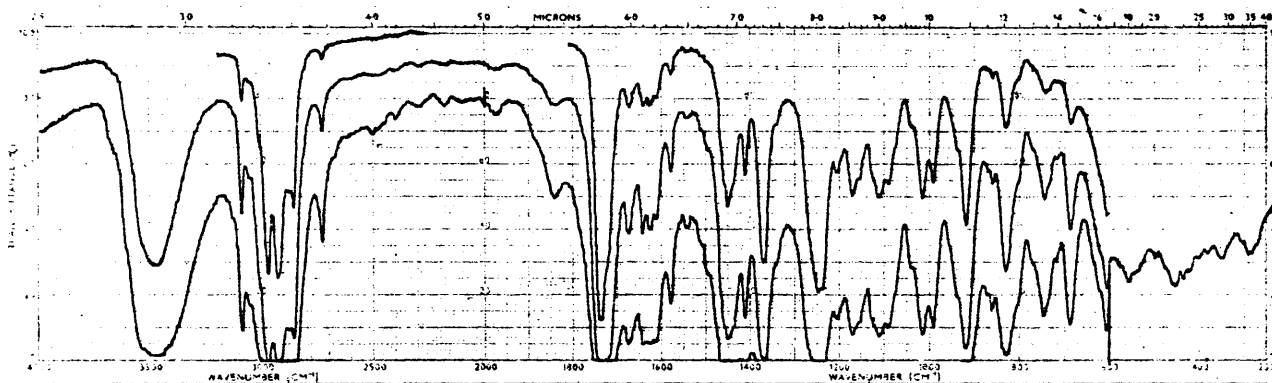


Fig. 110. Idem, Sanlúcar (Sevilla) 1971.

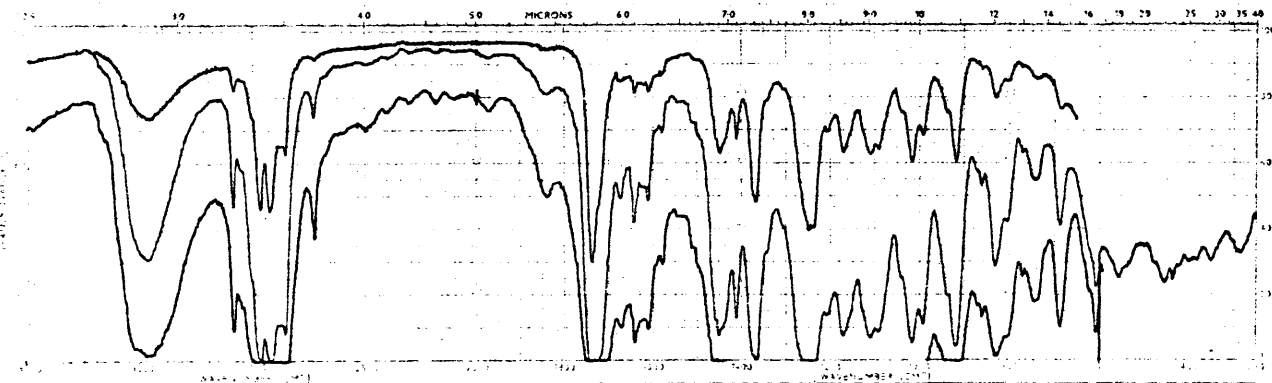


Fig. 111. Idem, Mallorca (1971).

TABLA 31

Aceite esencial de bergamota.

Fracción acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3450	terpineol + bergaptol
3160	5-metoxipsoraleno ó bergapteno
3130	bergapteno
3090	bergapteno
3010 L	bergapteno
2960	cumarinas + ceras + terpineol
2930	ceras + terpineol + cumarinas
2860	ceras + terpineol + cumarinas
1735	bergapteno
1715 L	ácidos
1625	bergapteno + bergamotina
1610	bergapteno + citropteno + 5-geranoxi-7-metoxicumarina
1580	bergapteno
1545	bergapteno
1500	5-geranoxi-7-metoxicumarina + citropteno
1470	bergapteno
1458	bergapteno + citropteno
1380	bergapteno
1355	bergapteno + citropteno
1340	bergamotina
1330	5-hidroxiipsoraleno (bergaptol)
1281	bergapteno
1255	bergapteno
1240	citropteno
1220	citropteno
1205	bergapteno

TABLA 31 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1155	bergaptol + bergapteno + citropteno
1125	bergaptol + bergapteno + bergamotina
1095	bergapteno
1075	bergaptol + bergapteno + bergamotina
1042	bergapteno + citropteno
1022	bergapteno
983	bergapteno
940	citropteno + bergapteno
918	terpineol + bergapteno
895	bergapteno + citropteno
862	citropteno
822	bergapteno + citropteno + bergamotina
748	bergapteno + bergamotina
718	bergapteno + ceras
690	
645	bergapteno + citropteno
635	terpineol + citropteno
620	citropteno
602	bergapteno
575	bergapteno
540	terpineol + bergapteno
515 L	citropteno
502	bergapteno
465	citropteno
430 L	terpineol
415	citropteno + bergapteno
405	bergapteno
370	citropteno
345	

d) Fracción metanol.

En las figuras 112-115 se dan las fracciones arrastradas con alcohol metílico pertenecientes a una muestra de Mairena (Sevilla), Sanlúcar (Sevilla), Mallorca e Italia. Dichos espectros presentan bandas similares a los de la fracción metanol extraída de aceites de limón y naranja, aunque muestran menos cadenas parafínicas.

Las bandas a 1580 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} parecen indicar la existencia de un ión carboxilato. El catión fundamental encontrado por análisis espectroquímico fue calcio.

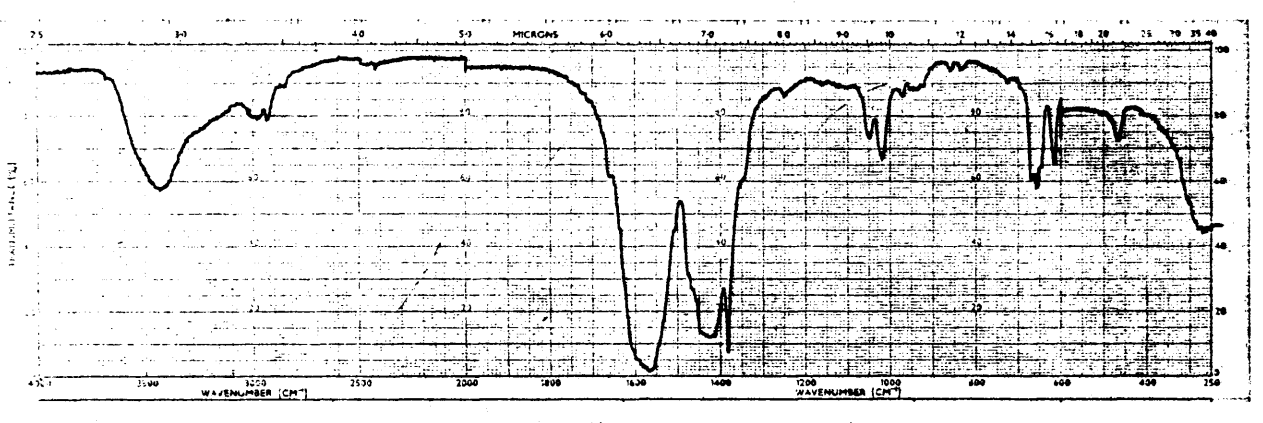


Fig. 112. Fracción metanol, en KBr. Bergamota Mairena (Sevilla) 1971.

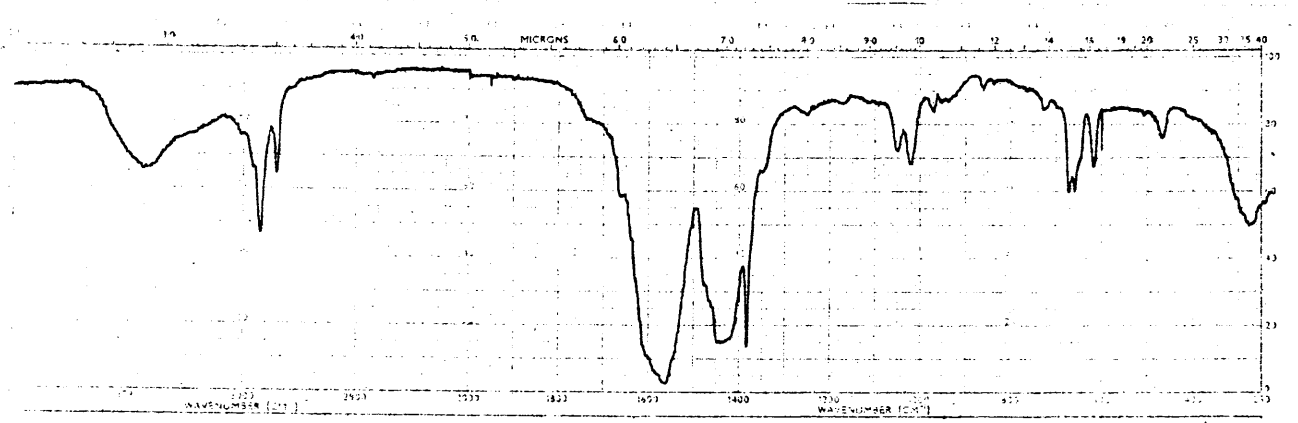


Fig. 113. Idem, Sanlúcar (Sevilla) 1971.

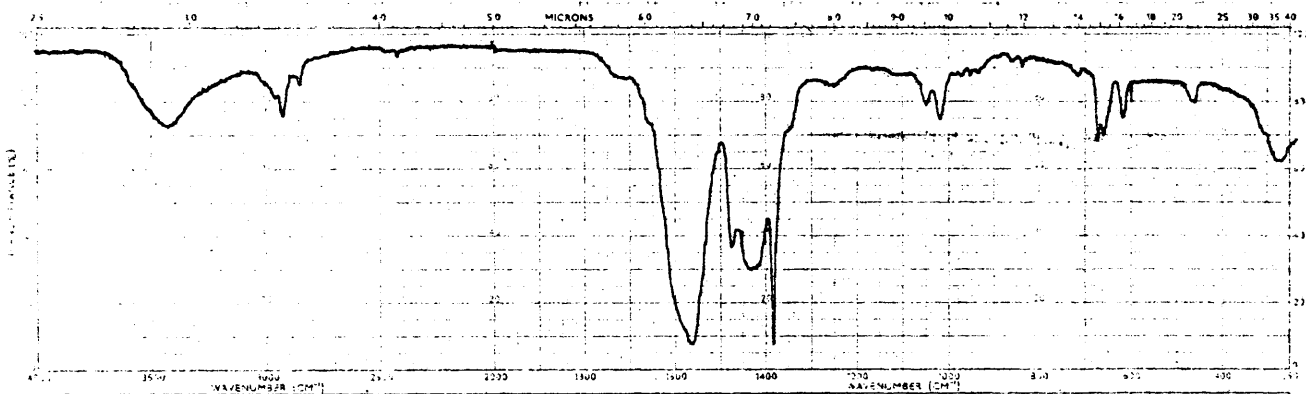


Fig. 114. Fracción metanol, en KBr. Bergamota Mallorca (1971).

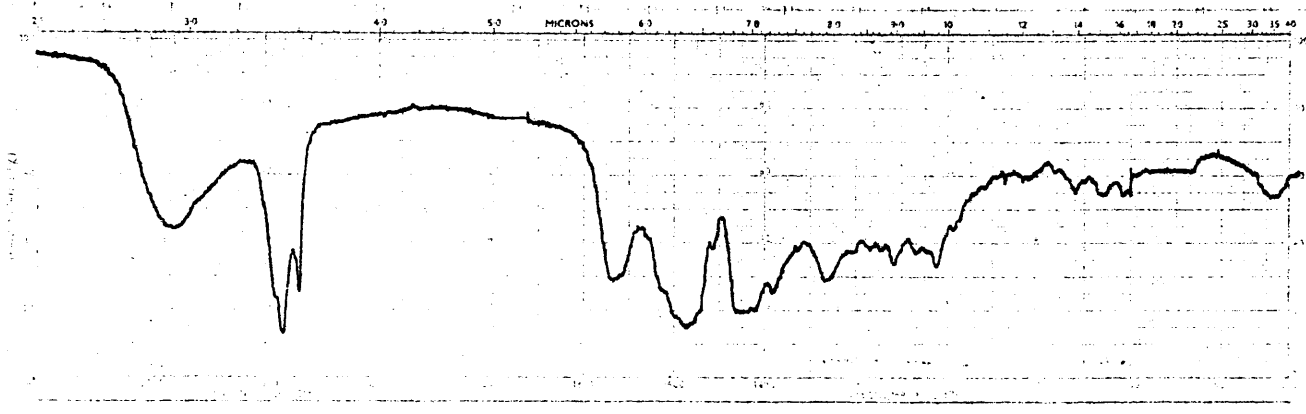


Fig. 115. Idem, Italia (1966).

4) Cromatografía de gases de la fracción oxigenada.

Con el fin de ampliar el número de componentes identificados por espectroscopía infrarroja en la fracción oxigenada, hemos recurrido a la cromatografía en fase de vapor tomando en este caso lo que llamamos "fracción oxigenada total."

En las figuras 116-120 se dan los cromatogramas correspondientes a esta fracción para cuatro muestras de diferente origen. Las sustancias identificadas fueron las siguientes:

n-octanal (1), n-nonanal (2), linalol (3), n-decanal (4), n-octanol (5), acetato de linalilo (6), terpineol (7), geranial (8), acetato de nerilo (9) y acetato de geranilo (10). El neral, presente también en esta fracción, queda enmascarado por el pico del terpineol.

Como nota característica, se advierte mayor contenido en geranial en las fracciones de los aceites sevillanos con respecto a la correspondiente al aceite mallorquín. Este contiene, sin embargo, más terpineol, lo que está de acuerdo con los resultados de los análisis infrarrojos de las fracciones. Por otra parte, la composición cualitativa en compuestos oxigenados de los aceites italianos es muy similar a la del aceite de bergamota cultivada en España.

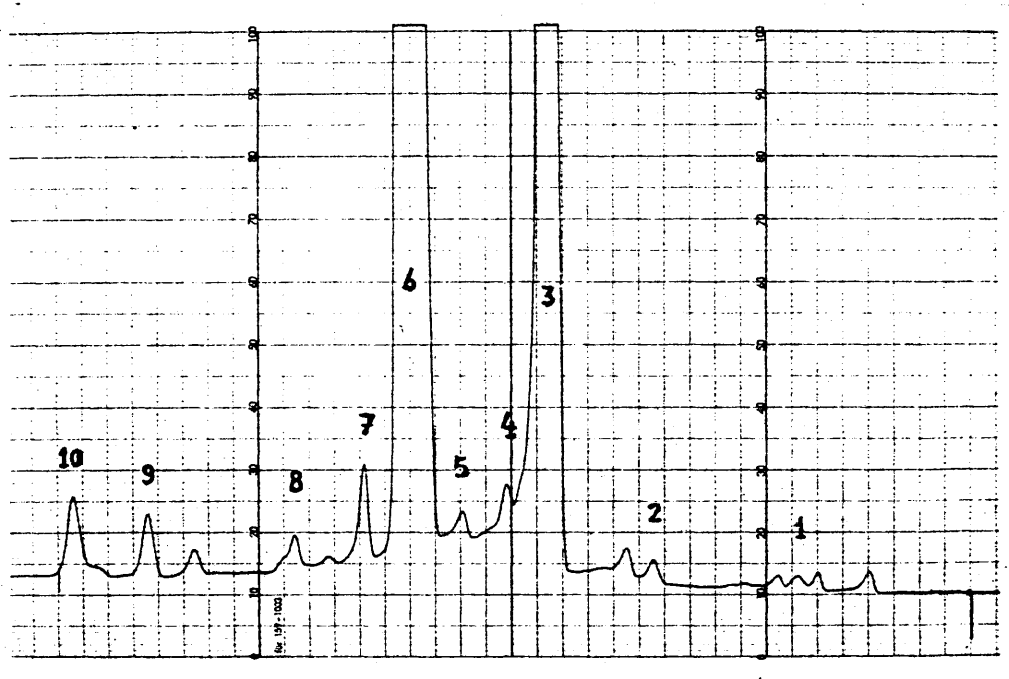


Fig. 116. Fracción oxigenada total.
Bergamota Mallorca (1971).

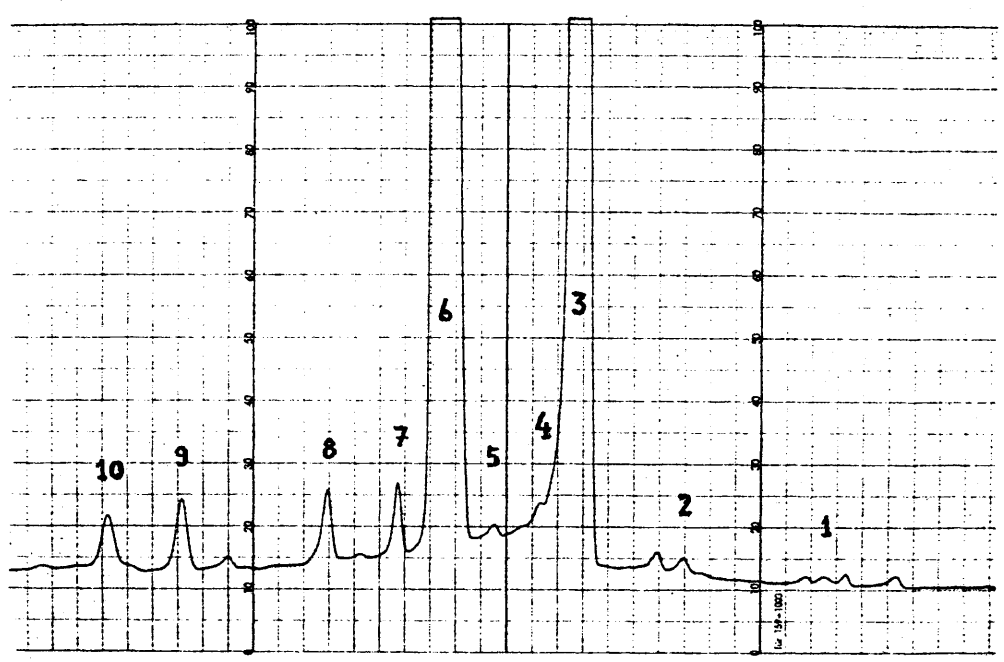


Fig. 117. Idem, Sanlúcar (Sevilla) 1971.

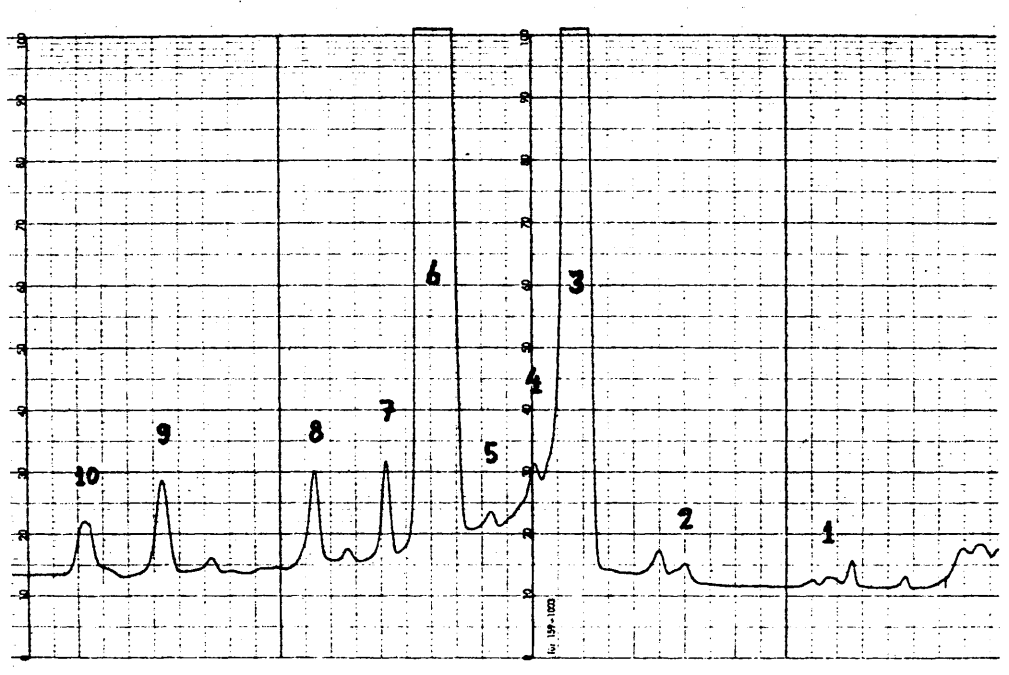


Fig. 118. Fracción oxigenada total.
Bergamota Mairena (Sevilla) 1971.

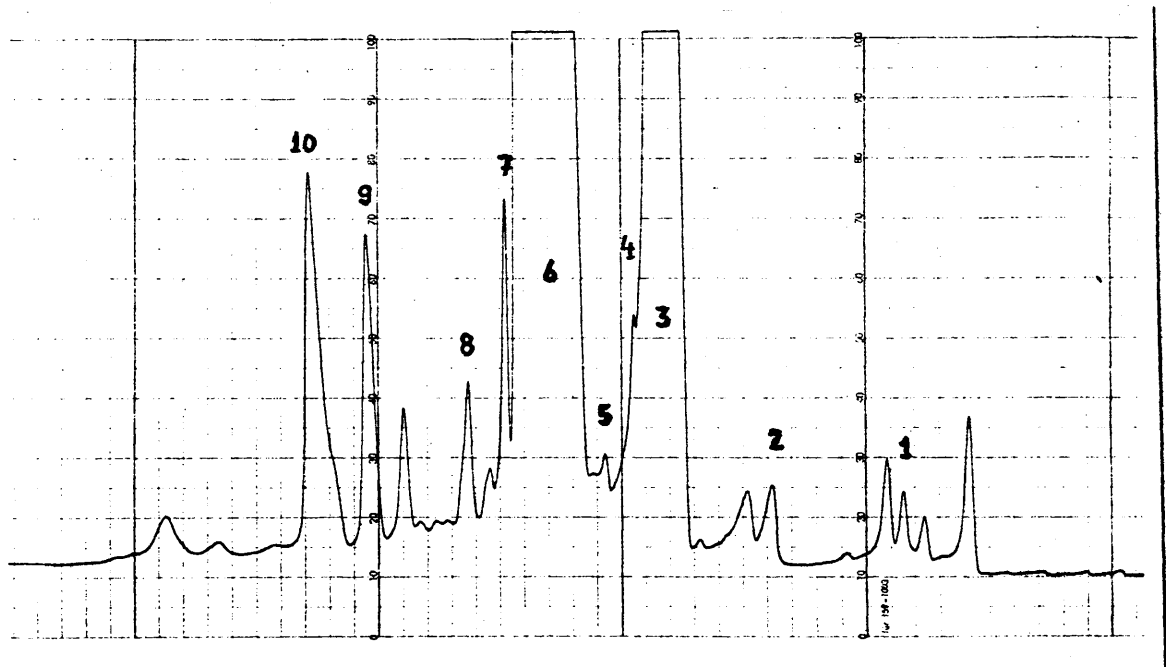


Fig. 119. Fracción oxigenada total. Bergamota Sanlúcar-Mairena 50-50 (v:v) (1971).

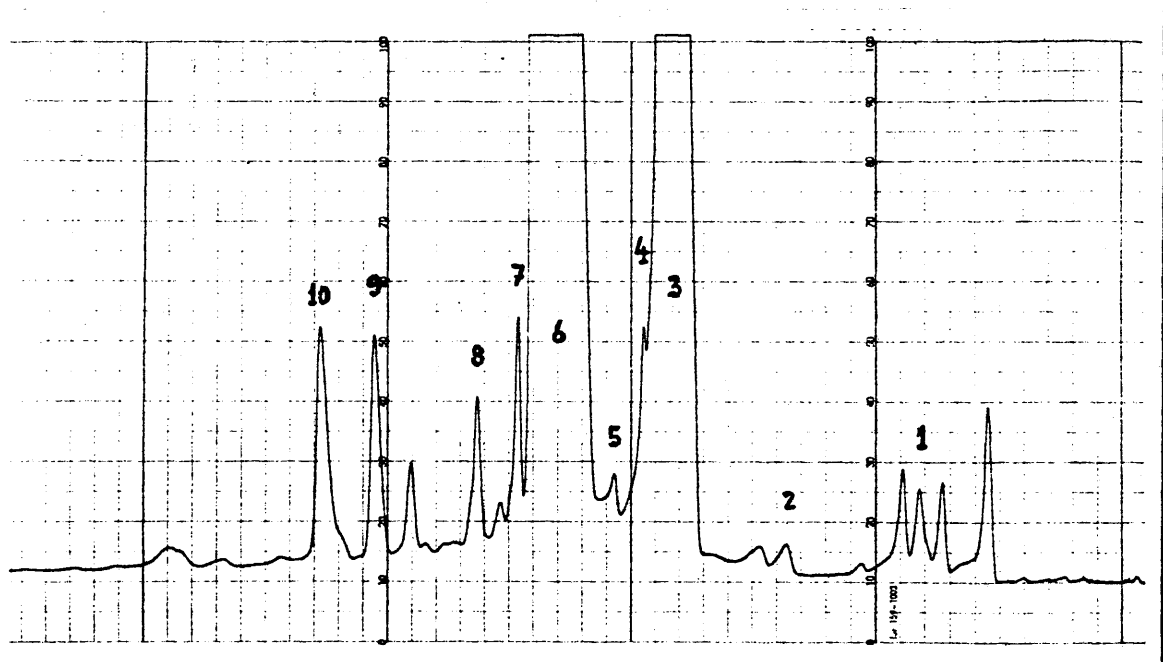


Fig. 120. Idem, Italia (1966).

5) Determinaciones semicuantitativas en aceites totales por cromatografía de gases.

Por medida de los tantos por ciento de áreas de pico corregidas, hemos determinado semicuantitativamente en aceites totales acetato de linalilo, linalol y limoneno por cromatografía de gases. En la tabla 32 se indican los resultados para muestras de diferente origen y cosecha.

Los tantos por ciento en peso obtenidos para el acetato de linalilo por espectroscopía infrarroja (tabla 27) y cromatografía de gases (tabla 32) son comparativos, lo que confirma la validez del método de valoración de este componente por espectroscopía infrarroja.

Como ya indicamos en la tabla 27, se repite sistemáticamente, durante las cosechas estudiadas, el mayor contenido de acetato de linalilo y linalol en los aceites de origen mallorquín, mostrando éstos, por otro lado, menos limoneno que los aceites de procedencia sevillana.

TABLA 32

DETERMINACIONES SEMICUANTITATIVAS POR CROMATOGRAFIA DE GASES. (% DE AREAS DE PICO).

Muestra	Origen	Cosecha	acetato de linalilo	linalol	limoneno
1. Bergamota, HMS	Mallorca	1970	44.8	28.4	14.7
2. Bergamota, HMS	Sevilla	"	41.7	19.0	29.6
3. Bergamota, P	Mallorca	1971	43.6	27.9	16.3
4. Bergamota, HMS	Sanlúcar	"	31.5	18.6	25.8
5. Bergamota, HMS	Mairena	"	30.5	17.9	26.3
6. Bergamota, P	Italia	1966	42.9	26.3	17.3

6) Determinación semicuantitativa de cumarinas por espectroscopía ultravioleta.

El bergapteno y otros productos análogos presentan una banda de absorción a 315 nm (transición $n \longrightarrow n^*$ de los electrones no enlazantes del oxígeno carbonílico). Esta banda es característica de los productos cumarínicos en el aceite esencial de bergamota y la densidad óptica (en muestras disueltas en alcohol etílico) nos da un parámetro proporcional a la concentración de cumarinas en cada caso.

En la tabla 33 se dan los valores correspondientes para concentraciones de 0.01 g/cc y células de cuarzo de 1 cm de espesor. El contenido en cumarinas no es característico del origen, pues varía de una cosecha a otra.

Los valores espectrofotométricos en el ultravioleta para los aceites sintéticos de bergamota están incluidos dentro de los límites correspondientes a los aceites naturales. Sin embargo, como veremos por el fraccionamiento cromatográfico en columna y el análisis posterior por espectroscopia infrarroja, no todas las cumarinas de los aceites naturales que dan lugar a la absorción en el ultravioleta están presentes en la esencia sintética ni en las mismas proporciones.

TABLA 32

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DE CUMARINAS POR ESPECTROSCOPIA UV. ($D_{315 \text{ nm}}$)

Muestra	Origen	Cosecha	Densidad optica (l = 1 cm; c = 0.01 g/cc)
1. Bergamota, HMS	Mallorca	1970	1.845
2. Bergamota, HMS	Sevilla	"	1.758
3. Bergamota, P	Mallorca	1971	2.150
4. Bergamota, HMS	Sanlúcar	"	2.986
5. Bergamota, HMS	Mairena	"	2.436
6. Bergamota, D (sintética)			1.954

ANALISIS DE DOS MUESTRAS SINTETICAS DE ACEITE DE BERGAMOTA

Como ocurre en otras especies de aceites esenciales, el espectro infrarrojo de una muestra sintética no difiere apreciablemente del de una esencia natural, observándose únicamente una mayor proporción de linalol en la primera (figs. 121-121a), por lo que hemos procedido a una separación cromatográfica en columna y el análisis subsiguiente de las fracciones obtenidas.

Las fracciones n-hexano-acetato de etilo son muy similares, observándose sólo variaciones en la proporción de linalol, igual que en los aceites sin fraccionar.

En las fracciones terpénicas existen diferencias marcadas en la proporción de β -pineno y p-cimeno que es mayor en la esencia sintética (figs. 122 y 122a). El mayor porcentaje de p-cimeno, que es un producto de envejecimiento, puede explicarse fácilmente si se tiene en cuenta las propiedades antioxidantes de las cumarinas, a que nos hemos referido anteriormente, productos que se encuentran en menor proporción en la muestra sintética estudiada (bandas a 1580 y 1125 cm^{-1} , figs. 121 y 121a). Como consecuencia de la transformación γ -terpineno a p-cimeno, el contenido del primero es mayor en la esencia natural.

En las figuras 123-126 se muestran comparativamente los espectros de las otras fracciones. La eluida con acetato de etilo (fig. 123-124) en el aceite sintético acusa

la presencia de algunas bandas a 1225 cm^{-1} características de esteres, lo que parece indicar la existencia de cumarinas con algún grupo hidroxilo esterificado por un ácido. La proporción de bergapteno ($1580, 1545, 1125\text{ cm}^{-1}$, etc.) es muy pequeña, así como la de 5-geranoxi-7-metoxicumarina (1500 cm^{-1}). Aparecen además bandas aromáticas a 1511 cm^{-1} ajenas a la fracción natural.

Otra fracción muy característica es la eluída con alcohol metílico (fig. 125-126). En la región $1600-1400$ se advierte la presencia de iones carboxilato en ambos casos. En la fracción sintética aparecen bandas características de un compuesto sólido de larga cadena alifática.

El análisis infrarrojo de las dos fracciones mencionadas, obtenidas por cromatografía en columna, puede constituir, por tanto, un método eficaz para la identificación de los aceites sintéticos de bergamota.

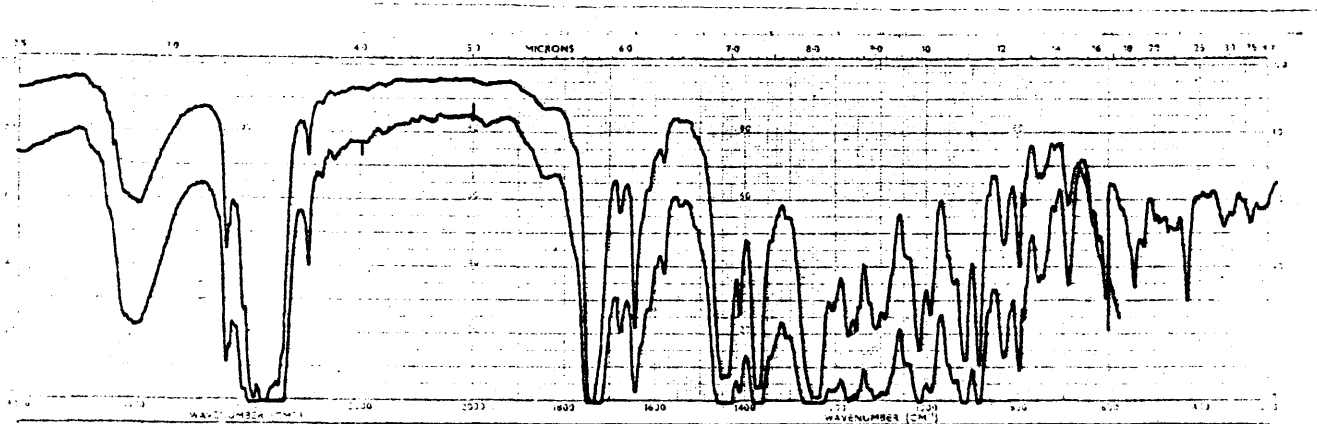


Fig. 121. Aceite esencial de bergamota Mairena (1972);
l = 0.1 mm y 0.03 mm.

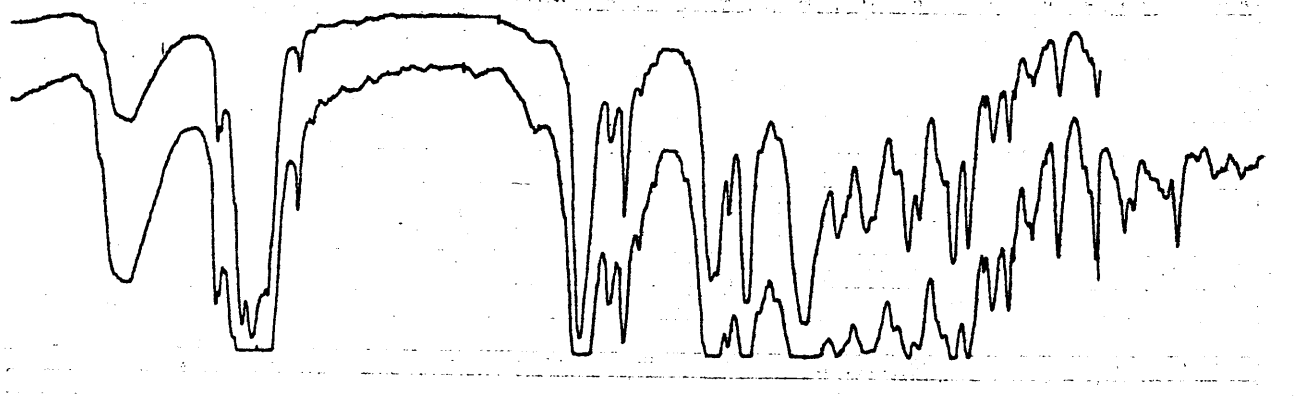


Fig. 121a. Idem, sintética. Muestra I.

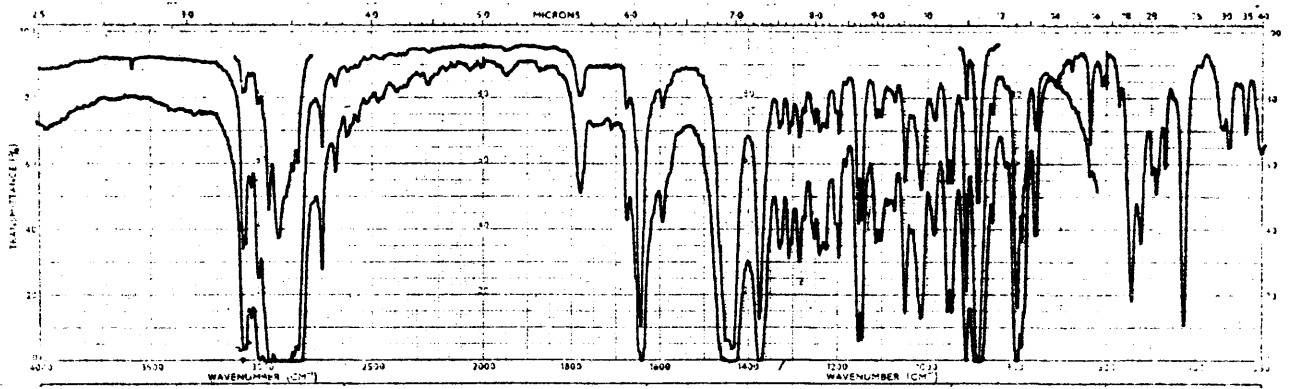


Fig. 122. Fracción terpénica. Bergamota Mairena (Sevilla) 1971;
l = 0.1 mm, 0.03 mm y film.

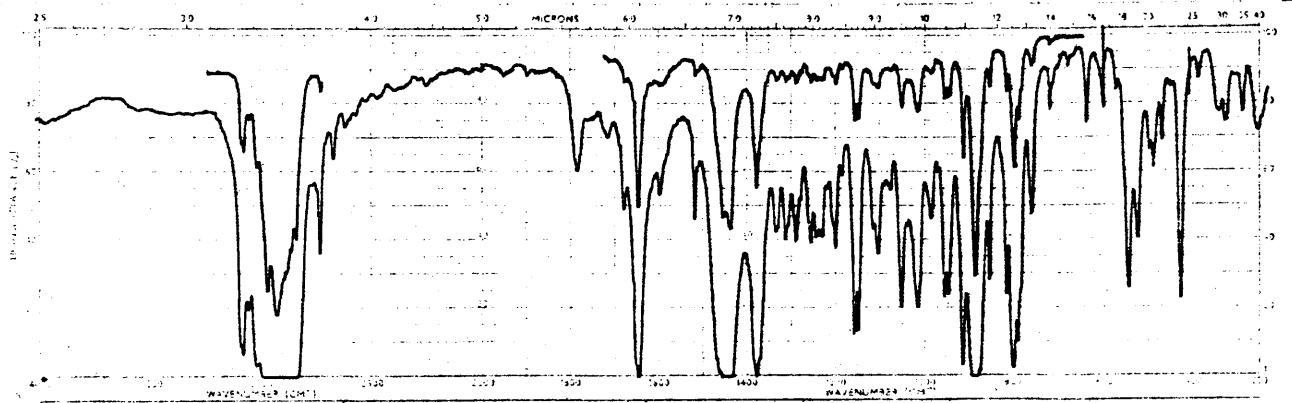


Fig. 122a. Fracción terpénica. Bergamota sintética;
l = 0.1 mm y film.

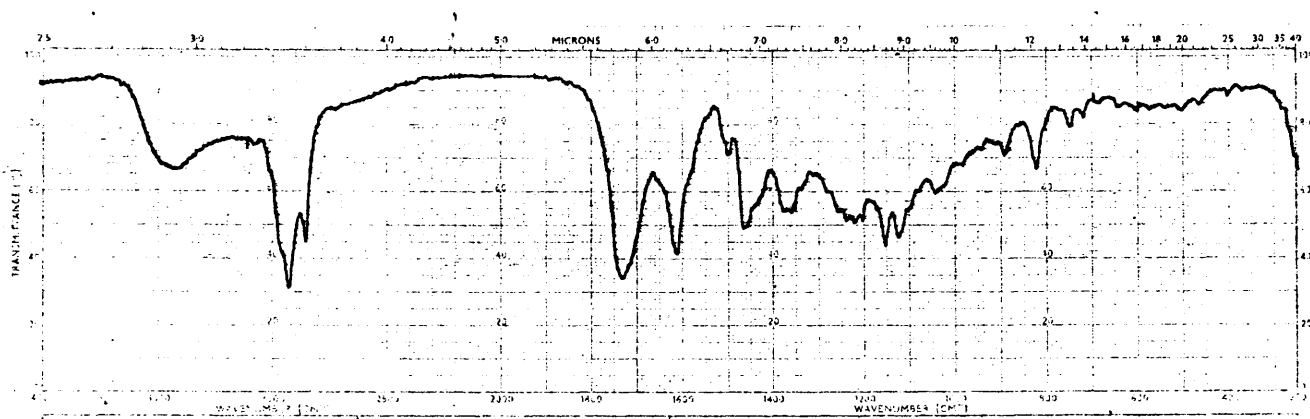


Fig. 123. Fracción acetato de etilo, film. Bergamota Sanlúcar-Mairena 50-50 (v:v) (1971).

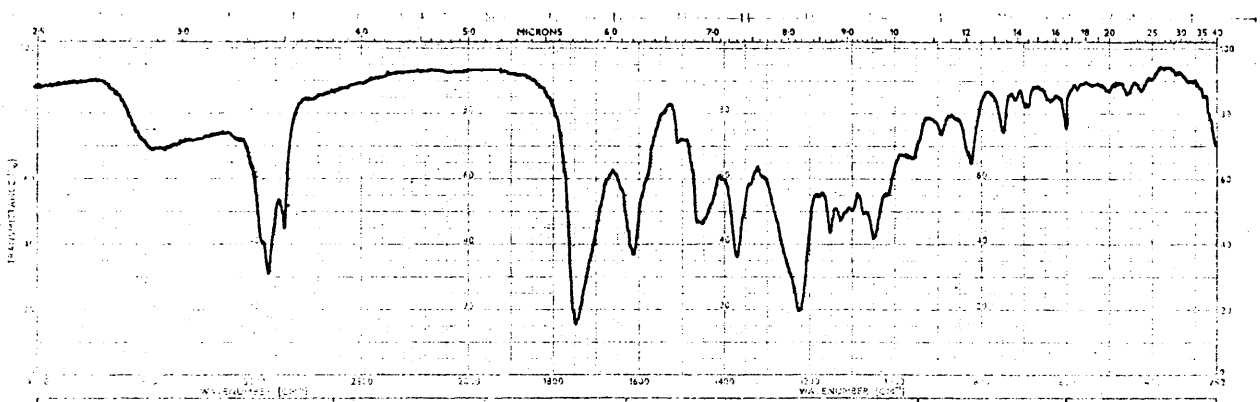


Fig. 124. Idem, bergamota sintética. Muestra I.

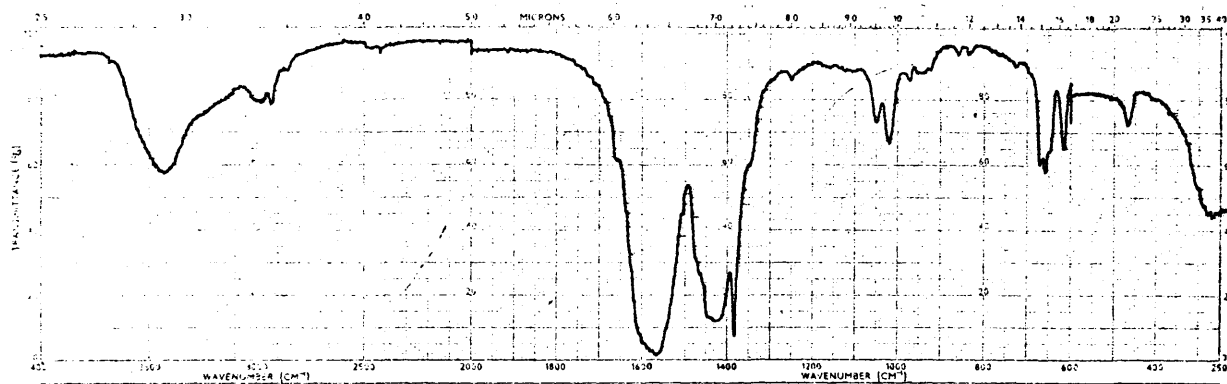


Fig. 125. Fracción metanol, en KBr. Bergamota Mairena (Sevilla) 1971.

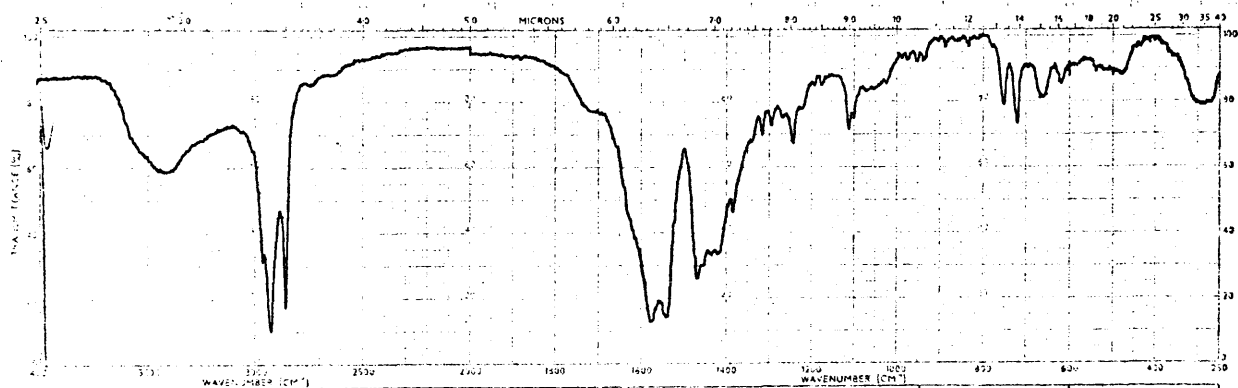


Fig. 126. Idem, bergamota sintética.

ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE BERGAMOTA.

Antecedentes.

No hemos encontrado antecedentes bibliográficos sobre el estudio del envejecimiento de este aceite, lo que posiblemente es debido a la gran estabilidad que posee, conservando buenas propiedades aromáticas durante largos periodos de almacenamiento.

Productos de oxidación. Residuos sedimentables.

Los resultados que hemos obtenido por envejecimiento natural y acelerado a 60° C muestran solamente una pequeña transformación del γ -terpineno a p-cimeno. La gran estabilidad que posee este aceite puede atribuirse al alto contenido en cumarinas, que están presentes en una proporción de alrededor del 5 %.

Por almacenamiento prolongado sedimenta un residuo sólido constituido por cumarinas. En la figura 127 se da el espectro infrarrojo de este residuo, que está constituido fundamentalmente por bergapteno (1580, 1540, 1095, 640, 602 cm^{-1} , etc.). También aparecen las bandas correspondientes al 5-geranoxipsoraleno (1430, 1325, 1195, 748 cm^{-1}) y 5,7-dimetoxicumarina (1100, 1042 cm^{-1}). La banda a 3420 cm^{-1} corresponde al grupo OH del bergaptol ó 5-hidroxi^opsoraleno, según indican las bandas a 1325, 1154, 1122, 1076, y 1027 cm^{-1} .

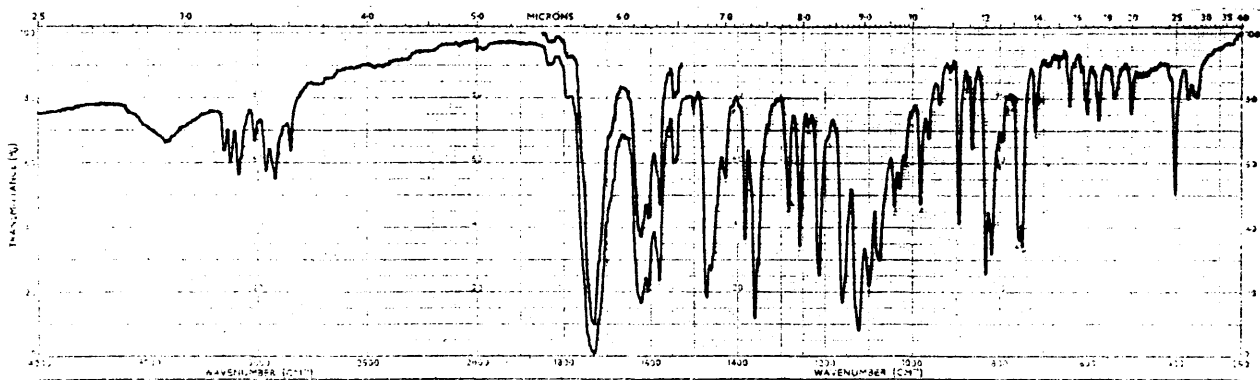


Fig. 127. Residuo sólido depositable por almacenamiento, en KBr. Bergamota Mallorca (1970).

Estabilidad frente a los factores que originan el envejecimiento.

Como hemos indicado anteriormente, la transformación del γ -terpineno a p-cimeno se produce en menor grado cuanto mayor es la concentración de cumarinas, según se deduce de los datos incluidos en la tabla 34.

Otra prueba experimental de que las cumarinas contenidas en el aceite esencial de bergamota son antioxidantes lo constituye el análisis por cromatografía de gases e infrarrojo de la fracción oxigenada con y sin cumarinas (fracción oxigenada total y n-hexano-acetato de etilo) tras un periodo de almacenamiento de dieciocho meses. En las figuras 128 y 128a se observa que la fracción carente de cumarinas muestra una disminución de geranial (pico núm. 8) y formación de un componente nuevo junto al acetato de geranilo. Este pico, que presenta mayor tiempo de retención que el geranial, puede ser un producto de oxidación de este último, ya que el geranial, según indicamos en el aceite esencial de limón, es un producto fácilmente oxidable. Las mismas conclusiones se obtienen de la comparación de los espectros infrarrojos de las correspondientes fracciones en otra muestra de aceite (figs. 129 y 129a).

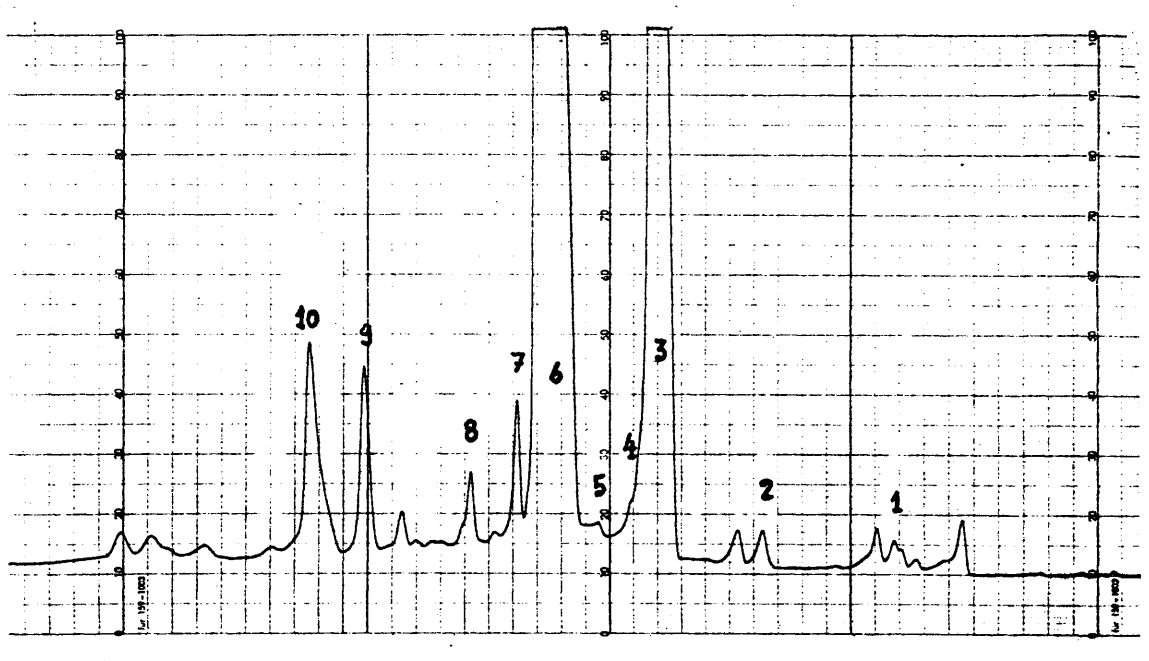


Fig. 128. Fracción oxigenada total. Bergamota Mairena (Sevilla) 1971. (Almacenada 18 meses).

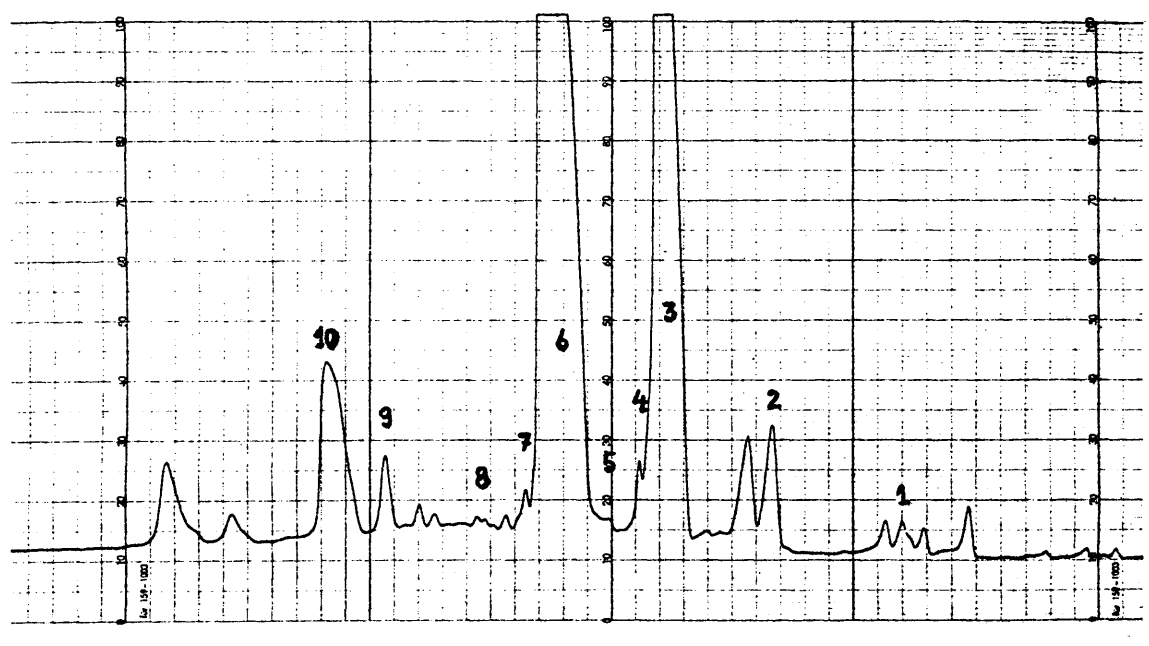


Fig. 128a. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Bergamota Mairena (Sevilla). (Almacenada 18 meses).

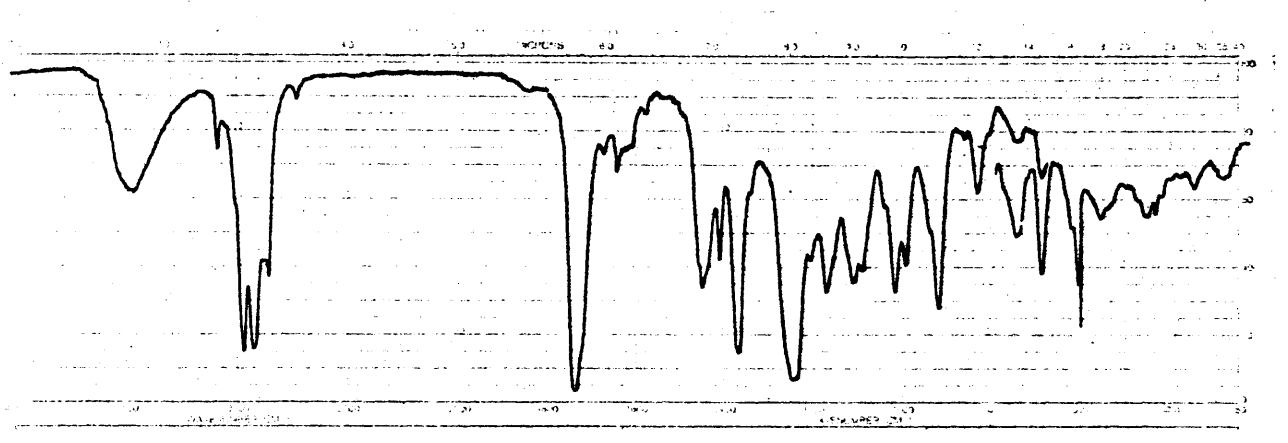


Fig. 129. Fracción oxigenada total. Bergamota Italia (1966).
(Almacenada 18 meses); 1 = 0.1 mm y 0.03 mm.

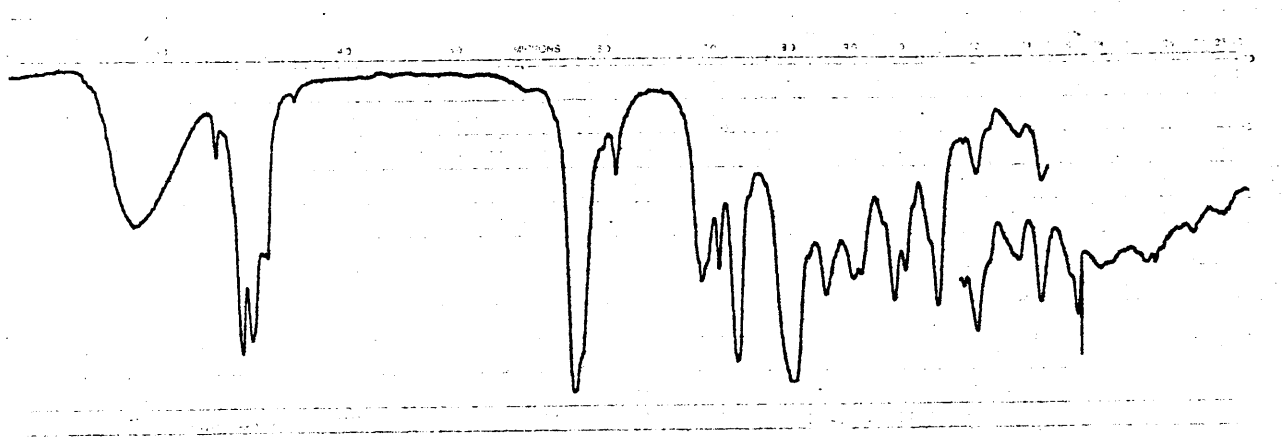


Fig. 129a. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Bergamota Italia
(1966). (Almacenada 18 meses); 1 = 0.1 mm y 0.03 mm.

TABLA 34

ACEITE ESENCIAL DE BERGAMOTA. % DE p-CIMENO PRODUCIDO POR ENVEJECIMIENTO

Muestra	Origen	Cosecha	Envejecimiento a 60° C		
			85 horas	230 horas	D _{315 nm (+)}
1. Bergamota, HMS	Sevilla	1970	2.15	3.86	1.758
2. Bergamota, HMS	Mallorca	"	1.81	3.18	1.845
3. Bergamota, HMS	Mairena	1971	0.53	0.81	2.436
4. Bergamota, HMS	Sanlúcar	"	0.48	0.69	2.986
5. Bergamota, P	Mallorca	"	0.66	1.02	2.150

% de p-cimeno producido por envejecimiento natural				
	8 meses	15 meses	D _{315 nm}	
1. Bergamota, HMS	1.39	1.90	1.758	
2. Bergamota, HMS	1.01	1.15	1.845	

(+): Densidad óptica medida en el UV a 315 nm.

ACEITE ESENCIAL DE MANDARINA

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS. COMPOSICION QUIMICA.

En la bibliografía aparecen trabajos sobre la composición química del aceite esencial de mandarina, extraído de la corteza de los frutos cultivados en Sicilia, California e Israel, fundamentalmente (1), (41).

Los componentes detectados se pueden agrupar por funciones químicas en los siguientes grupos:

Hidrocarburos terpénicos y sesquiterpénicos.

Por cromatografía en fase de vapor han sido identificados α -tujeno, α -pineno, canfeno, sabineno, mirceno, β -pineno, α -felandreno, p-cimeno, limoneno, γ -terpineno y terpinoleno. En las esencias de California han sido además identificados Δ_3 -careno, β -felandreno y α -terpineno. Esta fracción constituye alrededor del 90 % del aceite.

Han sido identificados, por otro lado, los siguientes sesquiterpenos: β -bisaboleno, β -elemeno, γ -cadineno, Δ -cadineno, cariofileno, α -copaeno, longifoleno, α -bergamoteno, selineno y γ -selineno. Esta fracción es minoritaria y se encuentra en unas concentraciones de alrededor del 1 %.

Aldehidos, cetonas, esterés.

Dentro de la serie alifática de los aldehidos, se han encontrado los términos comprendidos entre el enantaldehido y laurilaldehido, ambos inclusive. También han sido identificados el citronelal, geranial, neral, perilaldehido,

benzaldehido, cuminaldehido, metilheptenona y mentona.

Entre los esteres figura como el más importante el N-metil antranilato de metilo, del que depende, en parte, la calidad de este aceite. También han sido detectados algunos esteres del ácido acético (acetato de nonilo, decilo, undecilo, citronelilo, linalilo, geranilo, nerilo, terpenilo y bencilo).

Alcoholes.

Se conocen como componentes de este aceite los alcoholes alifáticos de cadena lineal comprendidos entre el hexanol y dodecanol ambos inclusive, y citronelal, linalol, geraniol, nerol, α -terpineol, terpinen-4-ol, cis y trans-carveol, timol, 1,8-p-mentadien-9-ol y alcohol bencílico (41).

Acidos.

Los ácidos alifáticos lineales, comprendidos entre el hexanoico y mirístico inclusive, constituyen el 1 % del aceite de mandarina (41).

Cumarinas y flavonas.

Se han identificado la 7-metoxicumarina (erniarina), 5-metoxipsoraleno (bergapteno), 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona (tangeretina) y 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina).

Carotenoides y parafinas.

Por su pequeña concentración en este aceite y por carecer de propiedades aromáticas, hemos prescindido del estudio de estos componentes.

ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA. VARIACION DE LA COMPOSICION QUIMICA CON EL AREA GEOGRAFICA DE CULTIVO.

1) Análisis infrarrojo de aceites sin fraccionar.

J. Bellanato y A. Hidalgo (11) han analizado el aceite esencial de mandarina por espectroscopía infrarroja e identificaron las bandas comprendidas entre 4000 y 650 cm^{-1} .

En este trabajo hemos estudiado siete muestras de aceite esencial de mandarina correspondientes a tres cosechas (1970, 1971 y 1972). Cuatro de las muestras estudiadas eran españolas (tres con la denominación de mandarina verde, es decir, aceite extraído de los frutos verdes) y tres de origen italiano.

En las figuras 130 y 131 se muestran los espectros correspondientes a dos aceites de mandarina española (aceite obtenido de los frutos verdes) e italiana, respectivamente. Según se deduce de la tabla 35, se pueden identificar directamente el limoneno (1645, 1155, 1145, 890 cm^{-1} , etc), γ -terpineno (1072, 1018, 948, 780 cm^{-1}), β -pineno (875, 855 cm^{-1}), p-cimeno (1513, 813 cm^{-1}), α -pineno (789 cm^{-1}) y N-metil antranilato de metilo (1690, 1608, 1581, 1260, 1242, 1172, 748, 702 cm^{-1} , etc.). En los mencionados espectros, la ampliación hasta 250 cm^{-1} no permite identificar más componentes que los visibles hasta 650 cm^{-1} , lo que es

debido al enmascaramiento producido por los componentes mayoritarios, tales como limoneno y N-metil antranilato de metilo. Por otra parte, se observan en los citados espectros diferencias apreciables en la composición cuantitativa, que comentamos más adelante.

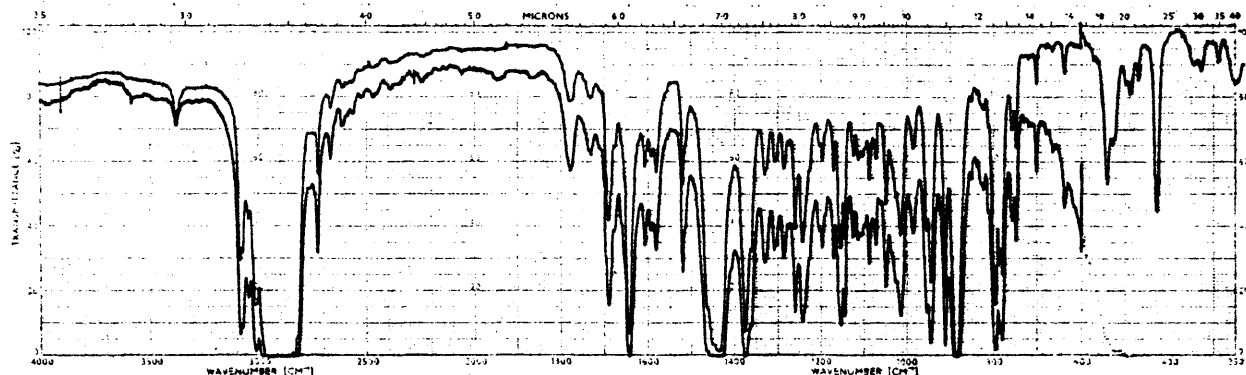


Fig. 130. Aceite esencial de mandarina verde española (1971);
l = 0.1 mm y 0.05 mm.

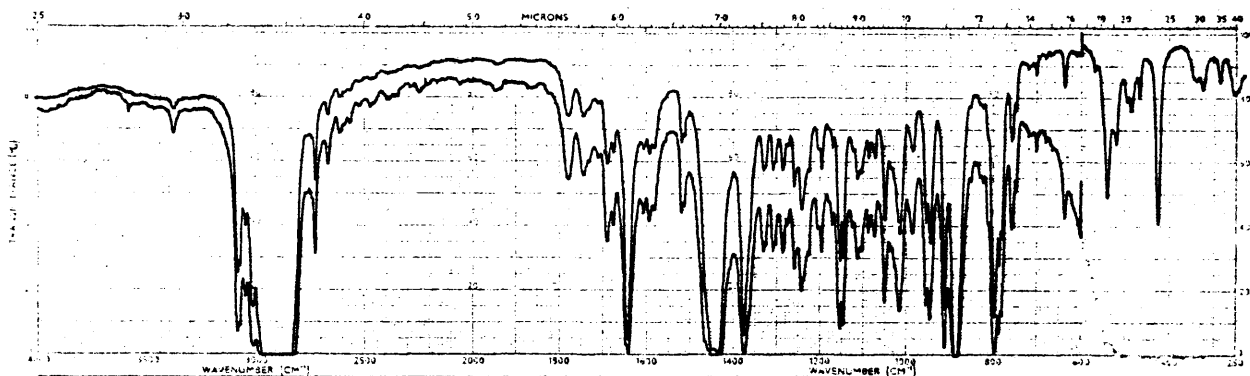


Fig. 131. Idem, mandarina natural italiana (1971).

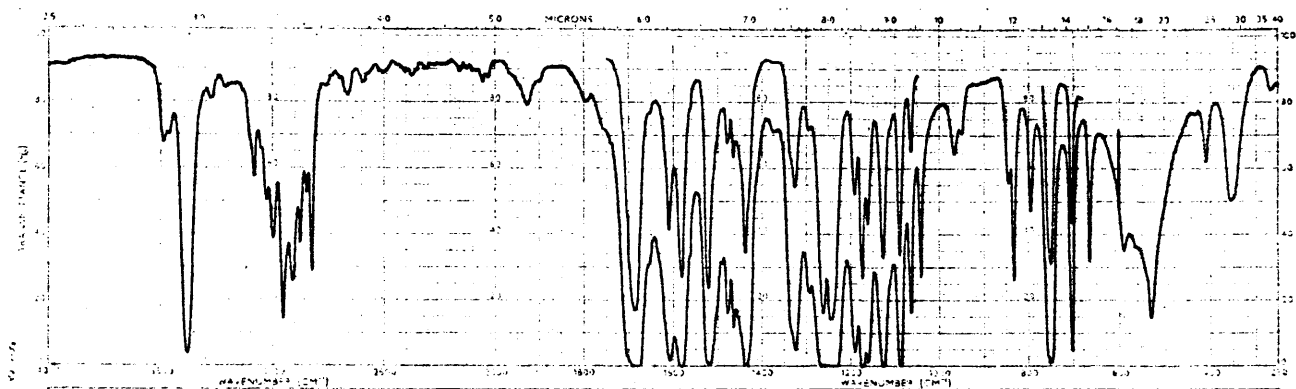


Fig. 132. N-metil antranilato de metilo.

TABLA 35

Aceite esencial de mandarina.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3380	N-metil antranilato de metilo
3085	limoneno
3075	limoneno
3042	limoneno
3010	limoneno
2965	limoneno
2920	limoneno
2880	limoneno
2850	limoneno
2830	limoneno
1780	limoneno
1745	esteres
1732	aldehidos
1712	limoneno
1690	N-metil antranilato de metilo
1680 L	citral
1645	limoneno + β -pineno
1608	N-metil antranilato de metilo
1594	limoneno + mirceno
1581	N-metil antranilato de metilo
1521	N-metil antranilato de metilo
1513	p-cimeno
1475 L	p-cimeno
1450	limoneno
1435	limoneno
1375	limoneno
1362	γ -terpineno

TABLA 35 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1331	N-metil antranilato de metilo
1310	limoneno
1285	γ-terpineno + limoneno
1278	limoneno
1260	N-metil antranilato de metilo + limoneno
1242	N-metil antranilato de metilo + limoneno
1225 L	limoneno
1205	limoneno
1198	limoneno
1190 L	N-metil antranilato de metilo
1172	N-metil antranilato de metilo
1165 L	N-metil antranilato de metilo
1155	limoneno
1145	limoneno
1125	N-metil antranilato de metilo
1115	limoneno
1105	limoneno + β-pineno
1090	N-metil antranilato de metilo
1072	γ-terpineno
1050	limoneno
1039 L	N-metil antranilato de metilo
1018	γ-terpineno + limoneno
995 L	mirceno + linalol
987	limoneno
955	limoneno
948	γ-terpineno
913	limoneno
890	limoneno
875 L	β-pineno
855	β-pineno
842	N-metil antranilato de metilo
830	N-metil antranilato de metilo

TABLA 35 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
825	γ-terpineno
813	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno + α-pineno
780	γ-terpineno
755	limoneno
748	N-metil antranilato de metilo
720	p-cimeno
702	N-metil antranilato de metilo
662	N-metil antranilato de metilo
638	limoneno
570	limoneno
540	limoneno
530	N-metil antranilato de metilo
522	limoneno + β-pineno
498	limoneno
488	limoneno
468	limoneno
455	β-pineno
425	limoneno
384	p-cimeno
342	limoneno
325	limoneno
288	limoneno

Determinación cuantitativa de N-metil antranilato de metilo por espectroscopía infrarroja.

Para determinar la concentración de N-metil antranilato hemos partido de disoluciones en sulfuro y tetracloruro de carbono, eligiendo las bandas clave a 748 y 1690 cm^{-1} .

En ambos casos, utilizamos concentraciones comprendidas entre 0.009 y 0.068 moles/l.

Las ecuaciones obtenidas mediante ajuste por mínimos cuadrados fueron, respectivamente, para las bandas a 748 y 1690 cm^{-1} las siguientes:

$$\frac{D}{l} = 61.60 \cdot M - 0.003$$

$$\frac{D}{l} = 80.65 \cdot M - 0.031$$

donde D es la densidad óptica de la banda clave, l el espesor de la célula en mm y M la concentración molar.

En la tabla 36 se dan los tantos por ciento en peso de este componente para las muestras estudiadas durante tres cosechas. Estos resultados muestran en todos los casos mayor proporción de N-metil antranilato de metilo en las esencias españolas.

En la tabla 36 se dan también los tantos por ciento en peso de limoneno (siguiendo el mismo procedimiento que el indicado en anteriores especies a partir de la banda a 1640 cm^{-1}). Este componente se encuentra en menor proporción en las esencias de origen español.

TABLA 36

N-METIL ANTRANILATO DE METILO Y LIMONENO EN ACEITES ESENCIALES DE MANDARINA (+)

Muestra	Origen	Cosecha	Limoneno	N-metil antranilato de metilo
1. Mandarina natural, R	Carcagente	1970	65.8	1.4
2. Mandarina verde, B	España	"	64.6	1.8
3. Mandarina natural, G	Italia	"	75.7	0.6
4. Mandarina verde, B	España	1971	69.2	1.5
5. Mandarina natural, G	Italia	"	82.6	0.7
6. Mandarina verde, B	España	1972	68.7	1.6
7. Mandarina natural, G	Italia	"	74.5	0.8

(+): % en peso.

Determinación cuantitativa de N-metil antranilato de metilo por espectrofluorimetría.

Para valorar este componente en aceites esenciales de mandarina, hemos determinado en primer lugar los límites de concentración para los que existe linealidad con la fluorescencia. Hemos trabajado con disoluciones patrón de N-metil antranilato de metilo en alcohol etílico, en concentraciones comprendidas entre 0.0001 g/l. Para disoluciones de 0.1 g/l de aceite en alcohol, que contendrán aproximadamente 0.001 g/l de N-metil antranilato de metilo, la intensidad de fluorescencia queda comprendida entre las correspondientes a las disoluciones patrón. La figura 133 muestra la curva de calibrado utilizada para la valoración.

Por interpolación lineal y por lectura directa determinamos las concentraciones de N-metil antranilato de metilo en las muestras estudiadas (tabla 37), que corresponden a las número 4-7 de la tabla 36.

Si comparamos los resultados de la citada tabla con los obtenidos para las mismas muestras por espectroscopía infrarroja (tabla 36), se deduce la concordancia entre las dos técnicas, cualquiera de ellas válida para valorar el N-metil antranilato de metilo en aceites esenciales de mandarina.

TABLA 37

<u>N-metil antranilato de metilo en aceites de mandarina</u>			
	Origen	Cosecha	% en peso
1. Mandarina verde, B	España	1971	1.48
2. Mandarina natural, G	Italia	"	0.69
3. Mandarina verde, B	España	1972	1.56
4. Mandarina natural, G	Italia	"	0.78

Podrían objetarse las posibles interferencias de los compuestos flavonoides, que también son fluorescentes (19), pero, como las concentraciones de N-metil antranilato de metilo son mucho mayores, se puede despreciar la fluorescencia de las flavonas eligiendo unas condiciones experimentales adecuadas en el aparato.

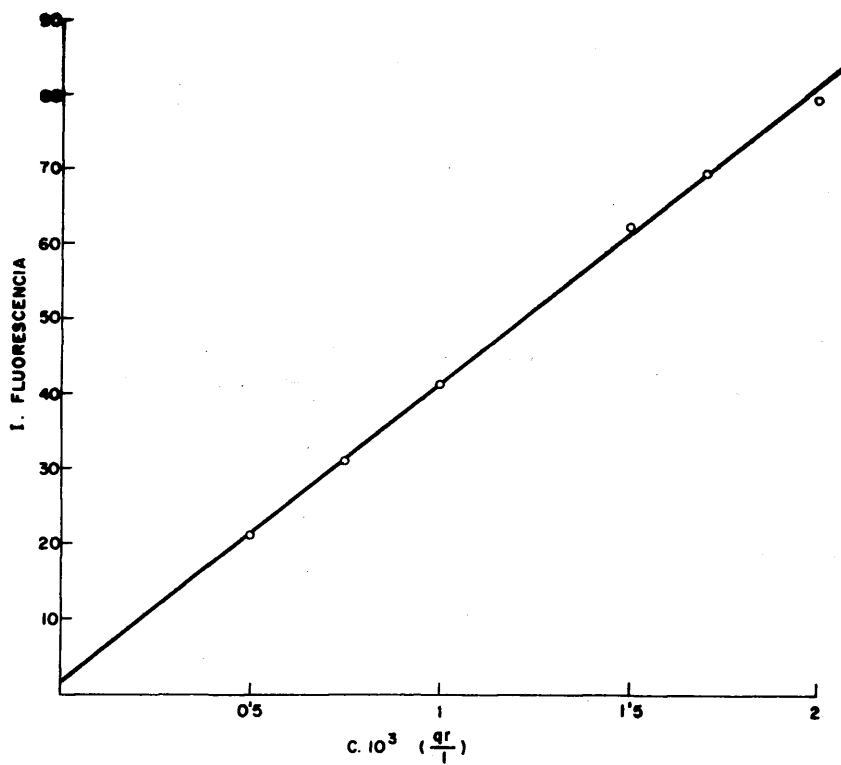


Fig. 133. Curva de calibrado del N-metil antranilato de metilo.
Banda a 423 nm.

2) Análisis infrarrojo de las fracciones cromatográficas.

a) Fracción terpénica.

En el espectro infrarrojo de esta fracción (fig. 134 y tabla 38) se hacen visibles fundamentalmente los mismos componentes que en los aceites totales. Sin embargo, se hacen patentes con más margen de seguridad α -pineno (1125, 789 cm^{-1}) y β -pineno (875, 855, 602, 450 cm^{-1}). La zona espectral entre 650 y 250 cm^{-1} no permite la observación de otros componentes que los visibles en zonas de mayor frecuencia, debido al enmascaramiento de los terpenos mayoritarios.

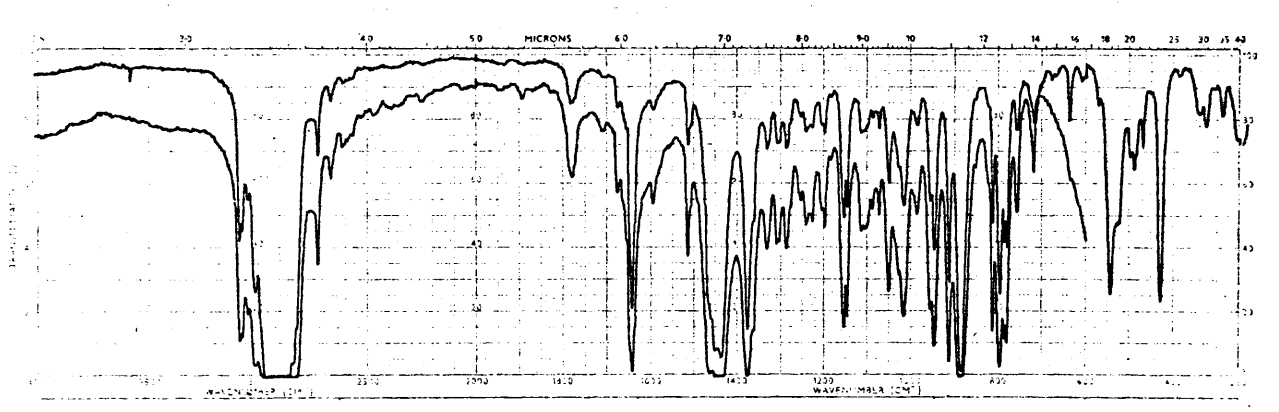


Fig. 134. Fracción terpénica. Mandarinina Carcagente (1970);
l = 0.1 mm y 0.05 mm.

TABLA 38

Aceite esencial de mandarina.

Fracción terpénica.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3085	limoneno
3075	limoneno
3045	limoneno
3010	limoneno
2960	limoneno
2920	limoneno
2870	limoneno
2830	limoneno
2730	limoneno
1780	limoneno
1680	limoneno
1645	limoneno
1595	limoneno + mirceno
1513	p-cimeno
1450	limoneno
1438	limoneno
1378	limoneno
1331	limoneno
1310	limoneno
1285	limoneno
1255	limoneno
1241	limoneno
1230	limoneno
1205	limoneno
1198	limoneno
1182	limoneno

TABLA 38 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1155	limoneno
1145	limoneno
1125 L	α -pineno
1105	limoneno + β -felandreno
1090	γ -terpineno
1075	γ -terpineno
1050	limoneno
1030 L	γ -terpineno
1018	limoneno + γ -terpineno
995 L	mirceno
985	limoneno + β -felandreno
955	limoneno
948	γ -terpineno
913	limoneno
890 L	mirceno
885	limoneno
875 L	β -pineno
865	sabineno
825	γ -terpineno + β -pineno
813	p-cimeno
798	limoneno
789	limoneno + α -pineno
780	γ -terpineno
759	limoneno
720	p-cimeno
675	limoneno
639	limoneno
602	β -pineno

TABLA 38 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
570	limoneno
540	limoneno
520	limoneno + β -pineno
498	limoneno
489	limoneno
468	limoneno
450	β -pineno
425	limoneno
388	p-cimeno
342	limoneno
328	limoneno
288	limoneno

b) Fracción n-hexano-acetato de etilo.

En esta fracción (fig. 135) el componente mayoritario es el N-metil antranilato de metilo. En el espectro también se hacen visibles el carveol ($1640, 890 \text{ cm}^{-1}$), linalol ($920, 802 \text{ cm}^{-1}$) y aldehidos (1730 cm^{-1}). En la tabla 39 se dan los números de onda y correspondientes asignaciones.

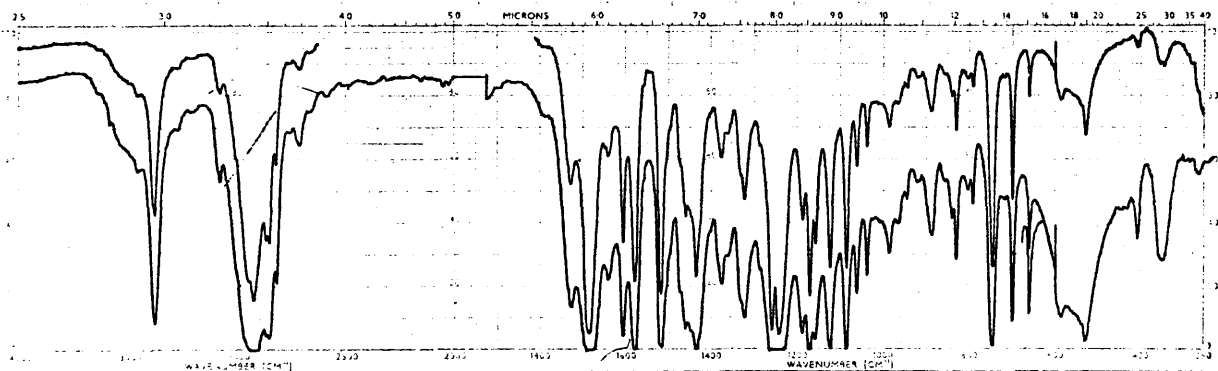


Fig. 135. Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Mandarina Carcagente (1970); l = 0.1 mm y 0.05 mm.

TABLA 39

Aceite esencial de mandarina.

Fracción n-hexano-acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3450	alcoholes (carveol, linalol fundamentalmente)
3380	N-metil antranilato de metilo
3080	N-metil antranilato de metilo
3030	N-metil antranilato de metilo
3010	N-metil antranilato de metilo
2960	N-metil antranilato de metilo + linalol + carveol
2930	carveol + linalol
2870	N-metil antranilato de metilo + linalol + carveol
2820	N-metil antranilato de metilo + carveol + aldehidos
2720	aldehidos
1730	aldehidos (octanal, nonanal, decanal)
1690	N-metil antranilato de metilo
1678 L	carvona (+)
1640	carveol + linalol
1608	N-metil antranilato de metilo
1580	N-metil antranilato de metilo
1520	N-metil antranilato de metilo
1480	N-metil antranilato de metilo
1463	N-metil antranilato de metilo
1438	N-metil antranilato de metilo
1378	N-metil antranilato de metilo
1335	N-metil antranilato de metilo
1325	N-metil antranilato de metilo
1262	N-metil antranilato de metilo

TABLA 39 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1245	N-metil antranilato de metilo
1190	N-metil antranilato de metilo
1171	N-metil antranilato de metilo
1161	N-metil antranilato de metilo
1128	N-metil antranilato de metilo
1110 L	N-metil antranilato de metilo
1088	N-metil antranilato de metilo
1062	N-metil antranilato de metilo
1038	N-metil antranilato de metilo
1010	geraniol + carveol + nerol
988	linalol
965	N-metil antranilato de metilo
947	N-metil antranilato de metilo
920	linalol
890	carveol + carvona
855	carveol
845	N-metil antranilato de metilo
831	N-metil antranilato de metilo
805	carveol
795	N-metil antranilato de metilo
748	N-metil antranilato de metilo
720	aldehidos alifáticos
702	N-metil antranilato de metilo
663	N-metil antranilato de metilo
590	N-metil antranilato de metilo
555	N-metil antranilato de metilo
530	N-metil antranilato de metilo
409	N-metil antranilato de metilo
350	N-metil antranilato de metilo

(+): visible especialmente en aceites envejecidos.

c) Fracción acetato de etilo.

Está constituida fundamentalmente por tangeretina y nobiletina, cumarinas, terpinen-4-ol y otros alcoholes en menor proporción (fig. 136 y tabla 40).

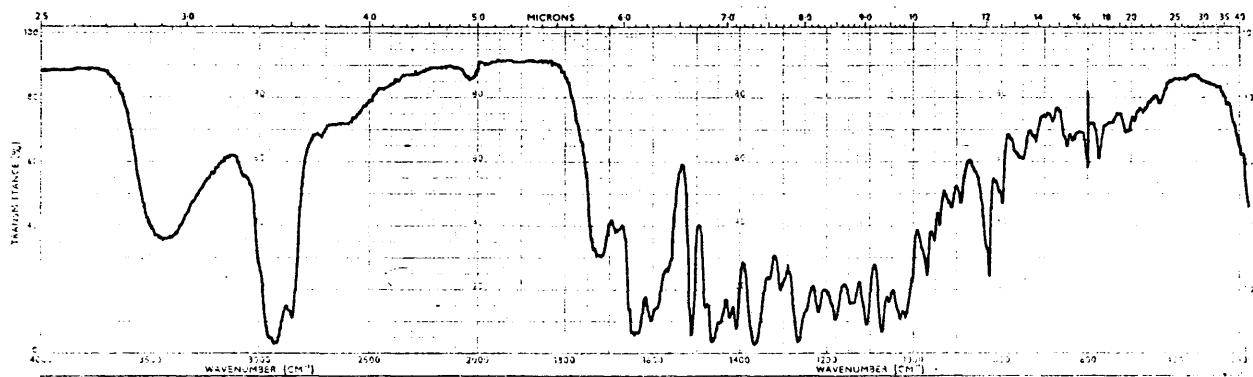


Fig. 136. Fracción acetato de etilo, film.
Mandarina Carcagente (1970).

TABLA 40

Aceite esencial de mandarina.

Fracción acetato de etilo.

Números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas.

<u>cm^{-1}</u>	<u>Componente</u>
3435	alcoholes (terpineol + geraniol + terpinen-4-ol)
3075	geraniol + linalol
3005	tangeretina + nobiletina
2960	terpinen-4-ol + geraniol + flavonas
2930	flavonas, + ceras + terpineol + terpinen-4-ol
2850	terpinen-4-ol + flavonas + geraniol
2700-2400	ácidos
1730	cumarinas (bergapteno + erniarina) + ácidos
1680	citral (geranial + neral)
1640	flavonas (tangeretina + nobiletina)
1605	tangeretina
1590	tangeretina + nobiletina
1565	tangeretina + nobiletina
1520 L	nobiletina
1515	tangeretina
1481	tangeretina + nobiletina
1465	tangeretina + nobiletina
1448	terpineol + geraniol
1438	tangeretina
1425	nobiletina
1409	tangeretina + nobiletina
1375 L	terpineol + geraniol
1365	tangeretina + nobiletina
1335	nobiletina
1308	tangeretina + nobiletina

TABLA 40 (Continuación)

<u>cm⁻¹</u>	<u>Componente</u>
1268	nobiletina + tangeretina
1250 L	terpinen-4-ol
1222	tangeretina + nobiletina
1180	tangeretina + nobiletina
1160	terpineol
1145	tangeretina + nobiletina
1110	tangeretina + nobiletina
1075	tangeretina
1055	citronelol + geraniol
1030	tangeretina + nobiletina
1020	terpinen-4-ol
1008	terpinen-4-ol
980	tangeretina + terpinen-4-ol
971	tangeretina + nobiletina
955	tangeretina
940	terpineol + terpinen-4-ol
920	terpineol
892	terpinen-4-ol
860 L	terpinen-4-ol
840	nobiletina
832	terpineol
827	tangeretina
799	terpineol + tangeretina
780 L	terpineol
771 L	terpineol
750	tangeretina + nobiletina
720	nobiletina + ceras
650	tangeretina + nobiletina
600	tangeretina + nobiletina
573	tangeretina + nobiletina
510	tangeretina + nobiletina

ENVEJECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MANDARINA.

Antecedentes.

En la bibliografía no aparece ningún trabajo que estudie el envejecimiento del aceite esencial de mandarina, si bien se conocen las modificaciones de las propiedades físicas que sufre este aceite conforme aumenta el grado de envejecimiento, como disminución del poder rotatorio, aumento de la densidad, etc. (1).

Productos de oxidación. Residuos sedimentables.

a) Envejecimiento por acción de la luz ultravioleta.

Se han sometido las muestras 1, 2 y 3 de la tabla 36 a la acción de la luz de una lámpara de xenon según el procedimiento descrito en la parte experimental.

Al cabo de 102 horas se observan algunas variaciones en los espectros. Las más significativas son: aumento de los grupos OH, grupos C=O de aldehidos, p-cimeno (1513, 813, y 720 cm^{-1}) y disminución de la banda a 1592 cm^{-1} atribuída parcialmente al mirceno.

b) Envejecimiento por acción del calor.

Se han sometido a la acción del calor las muestras de la tabla 36 durante periodos de tiempo variable.

A las 85 h. (60° C) ya se observan variaciones notables en los espectros, entre las que podemos resaltar la disminución de las bandas correspondientes al γ -terpineno y aumento de las del p-cimeno ($1513, 813, 720\text{ cm}^{-1}$) y grupos O-H

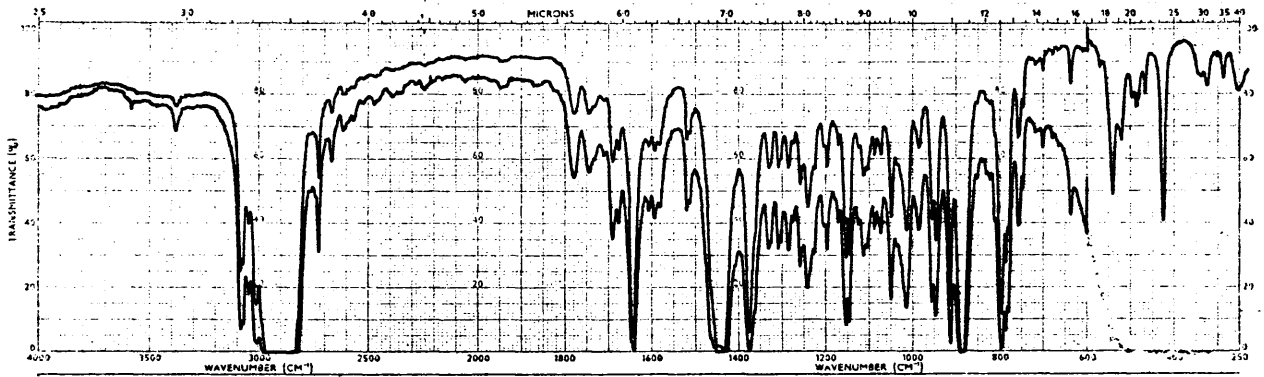


Fig. 137. Aceite esencial de mandarina natural italiana (1971);
l = 0.1 mm y 0.05 mm.

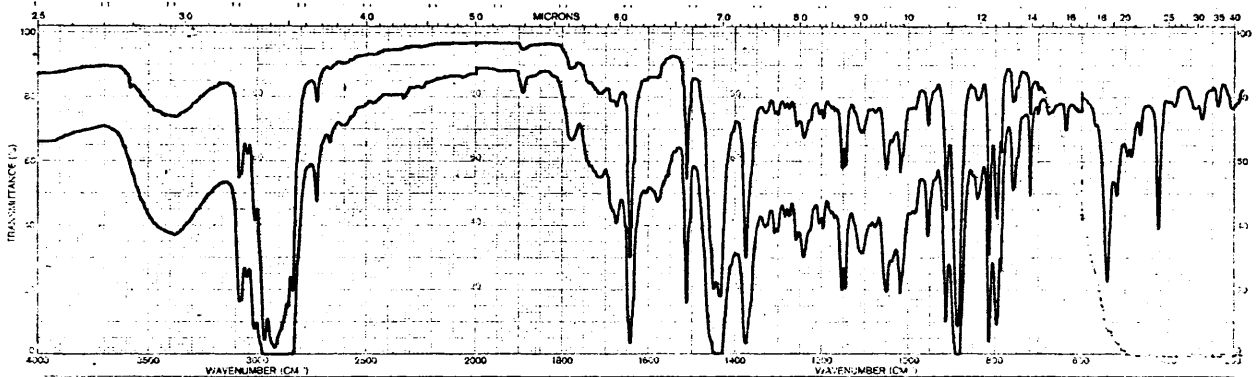


Fig. 138. Idem, envejecida 230 h. a 60°C; l = 0.05 mm y 0.03 mm.

(3500 cm^{-1}). Al aumentar el tiempo de calentamiento a 230 h. los espectros muestran alteraciones más profundas, que corresponden a una mayor proporción de los productos de oxidación y polimerización.

Las transformaciones más significativas (figs. 137-138) corresponden a la formación de epóxidos (840 cm^{-1}), carvona (1678 cm^{-1}), p-cimeno (1513, 813, 720 cm^{-1}) y alcoholes (3500 cm^{-1}). Por otro lado, disminuyen las bandas del limoneno (1645, 890, 425 cm^{-1} , etc.) y las del γ -terpineno, (948, 780 cm^{-1} , etc.), por lo que fundamentalmente procederán de estos compuestos los productos que se forman en el envejecimiento del aceite. Con el calentamiento prolongado también se observa el deterioro del N-metil antranilato de metilo.

El espectro infrarrojo de la fracción terpénica muestra como modificación fundamental una disminución del γ -terpineno y mirceno y aumento de las bandas correspondientes al p-cimeno.

Los espectros de la fracción n-hexano-acetato de etilo fresca y envejecida (figs. 139-140) muestran como variación fundamental el aumento de la banda a 890 cm^{-1} debida a los dobles enlaces terminales de los productos de oxidación derivados del limoneno, como carveol, carvona, etc.

La fracción acetato de etilo envejecida (figs. 141-142) sufre una disminución de flavonas (1640 cm^{-1}) respecto a

las cumarinas (1605 cm^{-1}). Asimismo aumenta la relación de las densidades ópticas de las bandas a 890 y 920 cm^{-1} debido a la formación de productos con doble enlace terminal.

El espectro infrarrojo de la figura 143 muestra a la tangeretina y nobiletina como productos fundamentales que se depositan en el aceite por almacenamiento prolongado.

c) Cromatografía de gases.

En las figuras 144 y 145 se dan los cromatogramas correspondientes a la fracción n-hexano-acetato de etilo obtenida de una esencia de mandarina fresca y envejecida, respectivamente.

Los siguientes productos fueron identificados:

n-octanal (1), n-nonanal (2), citronelal (5), N-metil antranilato de metilo + linalol (6), n-decanal (7), terpinen-4-ol ? (8), carvona (9), neral (10), geranial (11).

Los picos (3) y (4) los atribuimos al óxido de limoneno-1,2 cis y trans que hemos identificado en el aceite esencial de naranja envejecido (presentan los mismos tiempos de retención y aumentan con el envejecimiento).

Mecanismo del proceso de envejecimiento.

En los cromatogramas del aceite esencial de mandarina envejecido aparecen fundamentalmente los mismos picos que en los aceites envejecidos de naranja. Por ello suponemos que el limoneno es uno de los productos responsables del

envejecimiento de este aceite. Otros componentes lábiles, según muestran los resultados infrarrojos son el citral, aldehidos alifáticos y mirceno. Los componentes más estables son el linalol y N-metil antranilato de metilo.

El almacenamiento prolongado del aceite produce la sedimentación de un residuo sólido (fig. 143), constituido fundamentalmente por tangeretina y nobiletina.

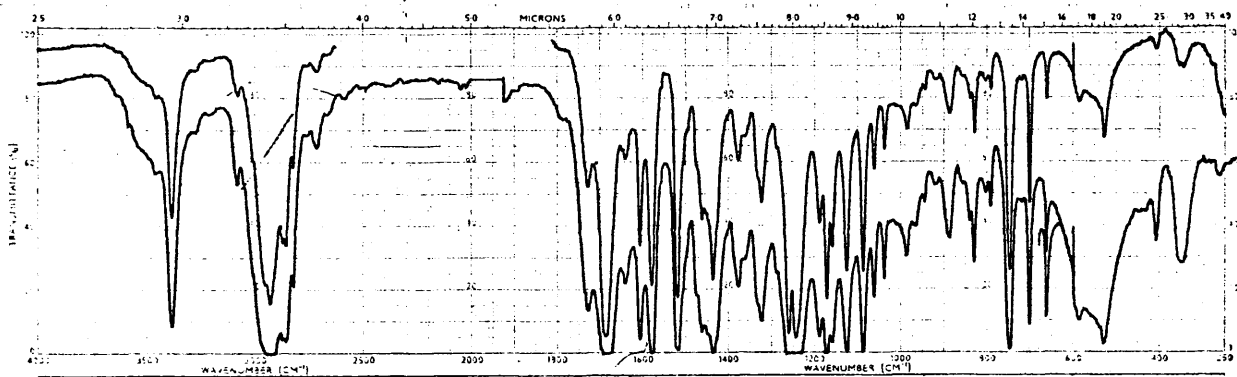


Fig. 139. Fracción n-hexano-acetato de etilo. Mandarina Carcagente (1970); l = 0.1 mm y film.

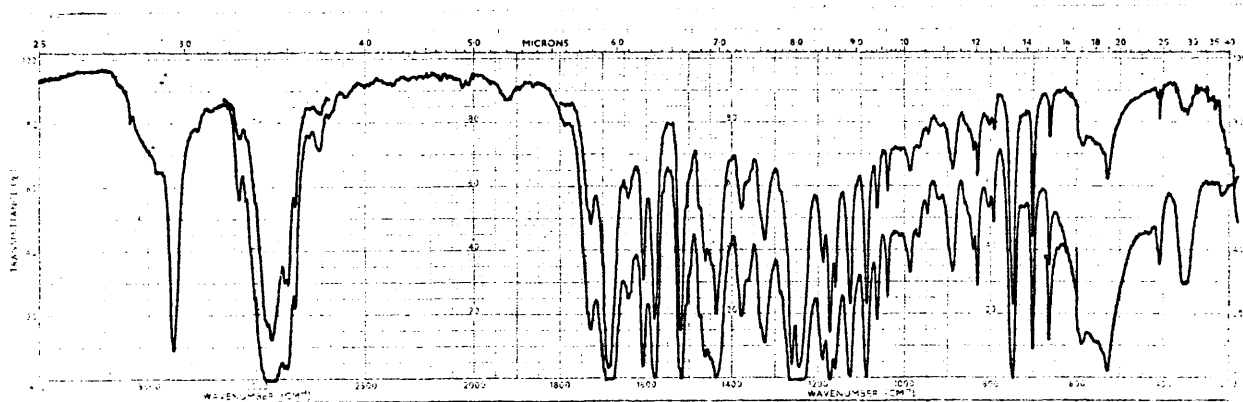


Fig. 140. Idem, aceite envejecido 230 h. a 60° C.

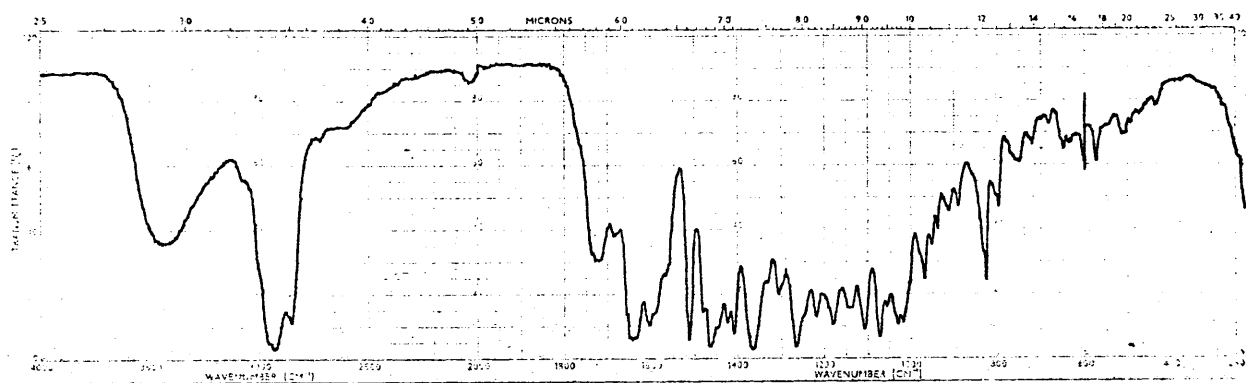


Fig. 141. Fracción acetato de etilo, film. Mandarina Carcagente (1970).

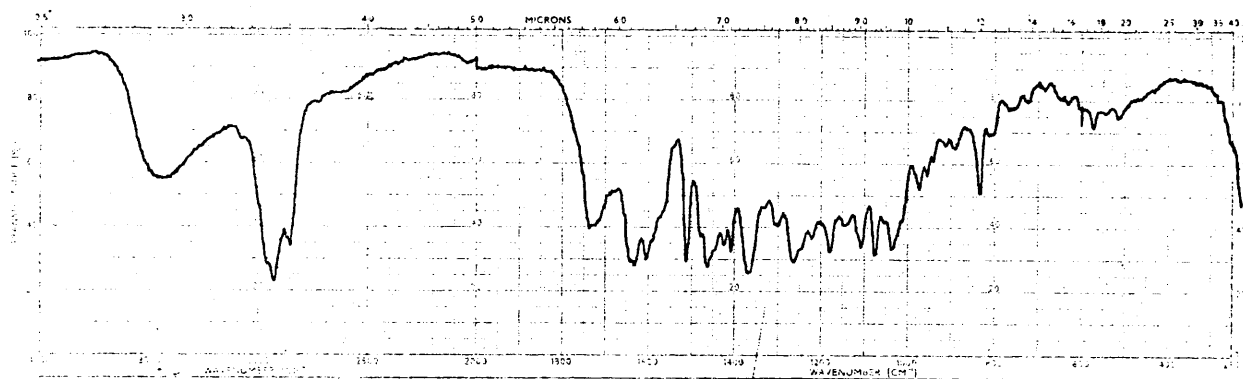


Fig. 142. Idem, aceite envejecido 230 h. a 60° C.

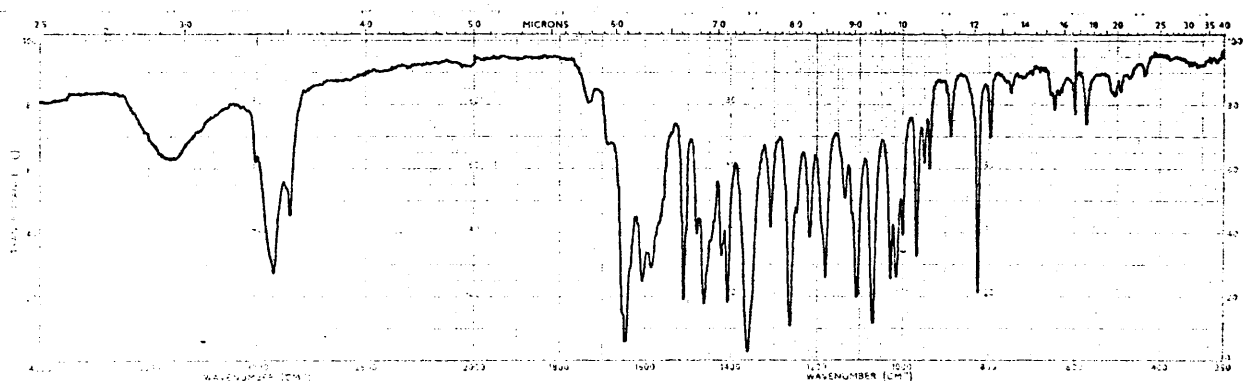


Fig. 143. Residuo sedimentable por almacenamiento, en KBr. Aceite esencial de mandarina Carcagente (1970).

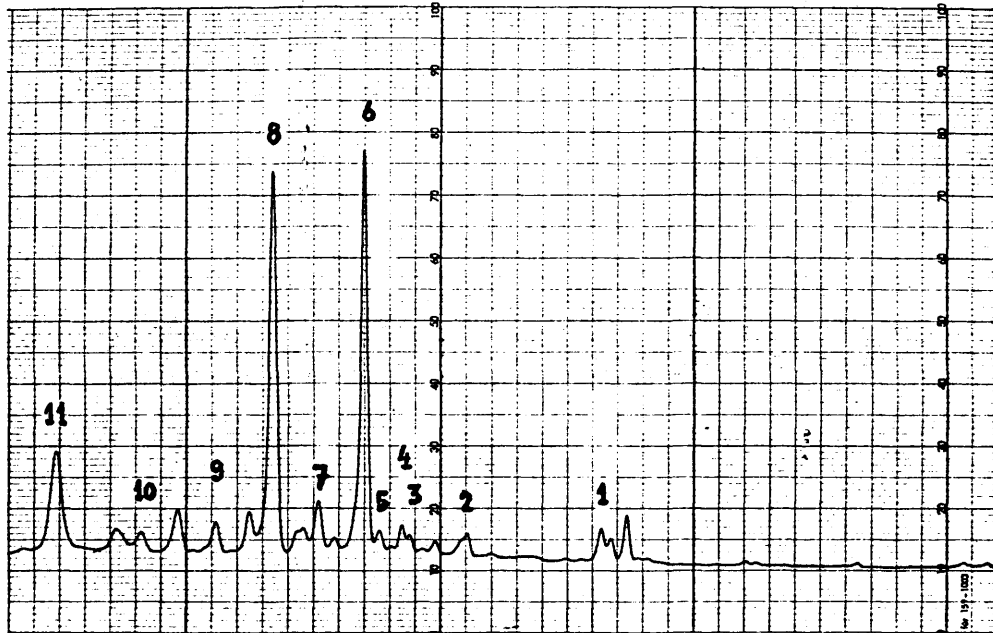


Fig. 144. Fracción n-hexano-acetato de etilo.
Mandarina Carcagente (1970).

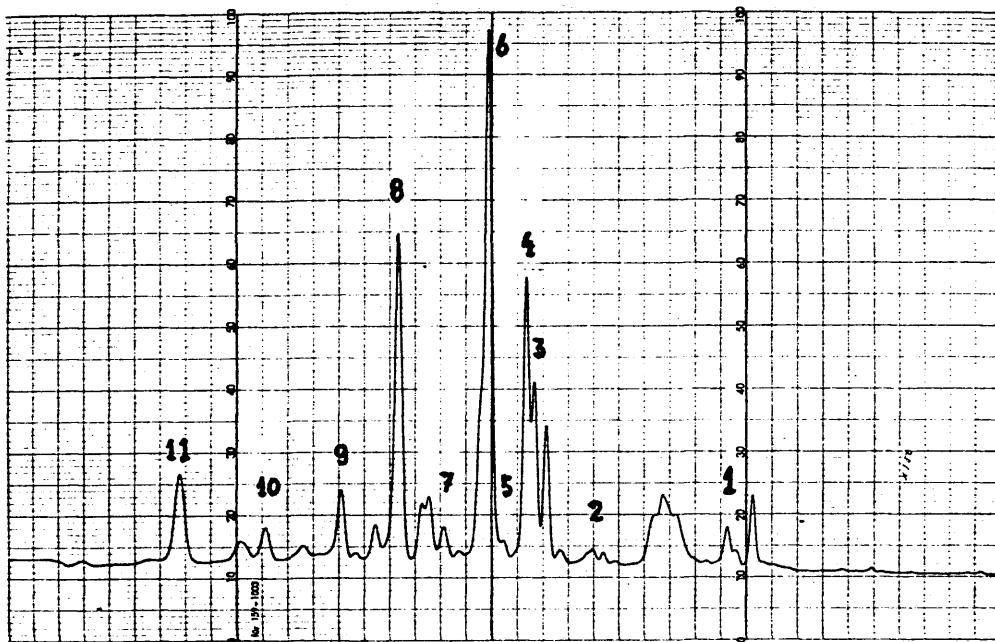


Fig. 145. Idem, envejecido 230 h. a 60° C.

4. CONCLUSIONES

1. Hemos aplicado la espectroscopía infrarroja, como método de identificación de componentes, en aceites esenciales de cítricos.

En los espectros infrarrojos de los aceites sin fraccionar, registrados entre 4000 y 250 cm^{-1} , hemos detectado, por primera vez con esta técnica, los siguientes componentes minoritarios:

- a) En aceite esencial de naranja:

Tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona) y/o nobiletina (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona).

- b) En aceite esencial de limón:

Citropteno (5,7-dimetoxicumarina), bergamotina (5-geranoxipsoraleno), β -pineno, citral, sabineno, α -felandreno y terpinoleno. En los espectros infrarrojos en disolución diluída se pueden diferenciar los alcoholes primarios (n-octanol, n-decanol, citronelol, etc.) de los terciarios linalol y terpineol y estos dos últimos entre sí.

- c) En aceite esencial de bergamota:

Bergapteno (5-metoxipsoraleno).

2. Se han puesto a punto métodos de análisis cuantitativo de los siguientes componentes:

- a) En aceite esencial de naranja:

Limoneno, por espectroscopía infrarroja.

b) En aceite esencial de limón:

Limoneno, β -pineno y citral, por espectroscopía infrarroja, y cumarinas (semicuantitativamente) por espectrofluorimetría.

c) En aceite esencial de bergamota:

Acetato de linalilo, linalol y limoneno, por espectroscopía infrarroja, y cumarinas (semicuantitativamente) por espectroscopía ultravioleta.

d) En aceite esencial de mandarina:

N-metil antranilato de metilo, por espectroscopía infrarroja y espectrofluorimetría, y limoneno, por espectroscopía infrarroja.

3. Para facilitar la identificación de componentes minoritarios, hemos realizado unas separaciones por cromatografía en columna obteniendo cuatro fracciones: a) terpenos, b) compuestos oxigenados volátiles, c) cumarinas o flavonas, fundamentalmente, más algunos alcoholes y d) un residuo sólido.

4. Mediante los espectros infrarrojos (IR) y la cromatografía de gases (CG) de las anteriores fracciones, hemos identificado las siguientes sustancias:

a) En aceite esencial de naranja:

Limoneno (IR), mirceno (IR), n-heptanal (CG), n-octanal (IR, CG), n-nonanal (CG), n-decanal (IR, CG), citronelal (IR, CG), linalol (IR, CG), neral (IR, CG), gera-

nial (IR, CG), acetato de geranilo (IR, CG), 2-hexen-1-al (IR), 2-octen-1-al (IR), caproato y caprilato de etilo (IR), α -terpineol (IR, CG), tangeretina (IR) y nobiletina (IR).

b) En aceite esencial de limón:

Limoneno (IR), γ -terpineno (IR), α -pineno (IR), β -pineno (IR), p-cimeno (IR), sabineno (IR), geranial (IR, CG), neral (IR, CG), acetato de nerilo (IR, CG), acetato de geranilo (IR, CG), linalol (IR, CG), n-heptanal (CG), n-octanal (IR, CG), n-nonanal (CG), n-decanal (IR, CG), citronelal (IR, CG), α -terpineol (IR, CG), 5-geranoxipsoraleno (IR), 8-geranoxipsoraleno (IR), 5,7-dimetoxicumarina (IR) y 5-geranoxi-7-metoxicumarina (IR).

c) En aceite esencial de bergamota:

Limoneno (IR), γ -terpineno (IR), α -pineno (IR), β -pineno (IR), p-cimeno (IR), sabineno (IR), geranial (IR, CG), neral (IR, CG), acetato de linalilo (IR, CG), linalol (IR, CG), α -terpineol (IR, CG), n-octanal (IR, CG), n-decanal (IR, CG), n-nonanal (CG), n-decanal (IR, CG), bergapteno (IR), acetato de nerilo (CG), acetato de geranilo (IR, CG), 5,7-dimetoxicumarina (IR), 5-geranoxi-7-metoxicumarina (IR), bergaptol ó 5-hidroxipsoraleno (IR) y 5-geranoxipsoraleno (IR).

d) En aceite esencial de mandarina:

Limoneno (IR), γ -terpineno (IR), α -pineno (IR), β -pineno (IR), p-cimeno (IR), sabineno (IR), N-metil antranilato de metilo (IR, CG), n-octanal (IR, CG), n-nonanal (CG), n-decanal (IR, CG), citronelal (CG), terpinen-4-ol (IR), neral (IR, CG), geranial (IR, CG), tangeretina (IR) y nobiletina (IR).

5. Hemos identificado por primera vez, por espectroscopía infrarroja, las flavonas tangeretina y nobiletina en esencias de mandarina y naranja de origen español. De la misma forma, hemos identificado varias cumarinas en esencias de limón y bergamota: 5-geranoxipsoraleno, 5-geranoxi-7-metoxicumarina, 5,7-dimetoxicumarina, 8-geranoxipsoraleno, 5-metoxipsoraleno y probablemente biacangelicina, isopimpinellina y bergapteno en limón; 5-geranoxi-7-metoxicumarina, 5-metoxipsoraleno, 5-hidroxipsoraleno y 5,7-dimetoxicumarina en bergamota.

6. El análisis sistemático realizado en aceites de tres cosechas consecutivas (1970, 1971 y 1972) revela que los aceites esenciales de limón español son más ricos en cumarinas que los italianos. Las diferencias observadas en los aceites de Murcia y Sevilla no son sistemáticas.

De acuerdo con los resultados obtenidos por espec-

troscopía infrarroja y cromatografía de gases, los aceites de bergamota española presentan la misma composición cualitativa que los de origen italiano. Respecto al contenido en acetato de linalilo y linalol, los de origen mallorquín tienen concentraciones del mismo orden (alrededor del 40 %) que los italianos. Los de procedencia sevillana son los más pobres en acetato de linalilo y linalol y, por otra parte, presentan una gran proporción de limoneno.

Los aceites esenciales de mandarina española, verde y natural, contienen menor proporción de N-metil antranilato de metilo que los de origen italiano, siendo, también, menor su contenido en limoneno.

7. El proceso de envejecimiento se caracteriza por los siguientes fenómenos:

a) Precipitación de componentes cumarínicos, en los aceites esenciales de limón y bergamota, y de flavonas en los de mandarina y naranja.

b) Autooxidación y polimerización, fundamentalmente con intervención de radicales.

8. Hemos identificado por cromatografía de gases-espectrometría de masas y comprobado por espectroscopía infrarroja los siguientes productos de oxidación del limoneno: cis y trans-carveol, cis y trans-2,8-p-mentadien-1-ol, cis y trans-óxido de limoneno-1,2 y carvona, lo que con-

firma que las posiciones más vulnerables de este compuesto son las correspondientes a los carbonos 1 y 2.

En el proceso de autooxidación se observa además que el γ -terpineno es el precursor fundamental del p-cimeno. De todos los aldehidos, el menos estable es el citral, que no se transforma en isocitral y p-cimeno, como indican otros autores (64), sino, principalmente, en un compuesto con grupos cetónico e hidroxilo.

9. De acuerdo con los productos de oxidación identificados y de sus proporciones relativas, el limoneno sigue un mecanismo de oxidación por el cual los óxidos de este compuesto se forman por adición de un átomo de oxígeno procedente de un radical peróxido.
10. Hemos comprobado por la medida del grado de envejecimiento en aceites sin fraccionar y por análisis de las fracciones oxigenadas envejecidas, con y sin cumarinas, que estos compuestos se comportan como antioxidantes inhibidores de radicales.

Debido a la mayor concentración de cumarinas, los aceites esenciales de limón españoles son más estables que los italianos.
11. La estabilidad de los aceites esenciales de naranja depende en gran parte del contenido en flavonas, que actúan también como antioxidantes.

12. Aunque los espectros infrarrojos de los aceites sintéticos y naturales de limón son similares, los espectros de sus fracciones oxigenadas permiten identificarlos fácilmente. Lo mismo ocurre con la esencia de bergamota.

BIBLIOGRAFIA

1. Araez, H. G.- "Esencias Naturales". Editorial Aguilar, 1953.
2. Guenther, E.- "The Essential Oils". Vol. 1. D. van Nostrand Company, Inc. New York, 1955.
3. Goretti, G; Laencina, J. y Liberti, A.- Riv. Ital, Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 49, 145 (1967).
4. Albaladejo, F.- Quím. Ind., 9, 199 (1962).
5. Calvarano, I y Calvarano, M.- Essenze Deriv. Agrum., 4, 216 (1968).
6. Rogers, J. A.- Amer. Perfumer Cosmet., 78, 17 (1963).
7. Theile, R.- Amer. Perfumer Cosmet., 2, 43 (1962).
8. Cazu, B. y Reggiani, M.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 38, 453 (1956).
9. Slater, C. A.- J. Sci. Food Agric., 14, 58 (1963).
10. Pennisi, L. y Di Giacomo, A.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 7, 370 (1965).
11. Bellanato, J. e Hidalgo, A.- Infrared Analysis of Essential Oils. Heyden & Son Ltd., London 1971.
12. Ziegler, E.- Deut. Lebensm.-Rundsch., 9, 290 (1970).
13. Kirchner, J. G. y Miller, J. M.- Ind. Eng. Chem., 44, 318 (1952).
14. Avertill, W.- The Perkin-Elmer Corporation. I. News, 19, 10 (1971).

15. Nielsen, B. E.- Dansk Tidssk. for Farm., 44, 111 (1970).
16. Di Giacomo, A.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 3, 159 (1972).
17. Kesterson, J. W.; Edwards, G. J. y Hendrickson, R.- Amer. Perfumer Cosmet., 84, 41 (1969).
18. Kesterson, J. W.; Edwards, G. J. y Hendrickson, R.- Amer. Perfumer Cosmet., 85, 41 (1970).
19. D'Amore, G. y Corigliano, F.- Ann. Fac. Econ. Commer., Univ. Studi Messina, 10, 12 (1966).
20. Latz, H. W. y Madsen, B. C.- Anal. Chem., 41, 1180 (1969).
21. Briggs, L. H. y Colebrook, L. D.- J. Chem. Soc., 2458 (1960).
22. Standard Spectra. Sadtler Research Laboratories, Inc., Philadelphia, Pa., 19104, 1962-69. USA.
23. Mitzner, B. M.; Marcino, V. J.; Lemberg, S. y Theimer, E. T.- Appl. Spectry., 22, 35 (1968).
24. Mitzner, B. M.; Theimer, E. T. y Freeman, S. K.- Appl. Spectry., 19, 169 (1965).
25. Unrich, G.- Die methoxylierten Flavone in Citrus Aurantium L. Subspecies Amara L. und anderen Citrusarten. Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Frankfurt am Main 1969.
26. Wenninger, J. A.; Yates, R. L. y Dolinsky, M.- J. Ass. Offic. Agr. Chem., 50, 1313 (1967).
27. Perel'son, M. E.- Zh. Obsc. Khim., 33, 952 (1963).
28. Bukreeva, T. V. y Pigulevskii, G. V.- Zh. Prikl. Khim., 39, 1541 (1966).

29. Kendal, D. N.- Applied Infrared Spectroscopy. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1966.
30. Van der Lijn, J. y Lifshitz, A. Lebens-Wiss. Technol., 2, 39 (1969).
31. Cieri, U.- J. Ass. Agr. Chem., 52, 719 (1969).
32. Keulemans, A. I. M.- "Gas Chromatography". 2^a ed. 1960. Reinhold Publishing Corporation. New York.
33. Beynon, J. H.- Endeavour, 25, 72 (1966).
34. Campbell, M. M. y Runquist, O.- J. Chem. Educ., 49, 104 (1972).
35. Vernin, G.- Parfum. Cosmet. Savons, 12, 179 (1969).
36. Cornu, A. y Massot, R.- Compilation of Mass Spectral Data. Heyden & Son Ltd., London 1966.
37. Von Sydow, E.- Acta Chem. Scand., 17, 2504 (1963).
38. Von Sydow, E.- Acta Chem. Scand., 18, 1099 (1964).
39. Hunter, G.- J. Food Sci., 31, 167 (1966).
40. Ataway, J. A. y Pieringer, A. P.- Phytochemistry, 6, 25 (1967).
41. Di Giacomo, A.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 2, 65 (1971).
42. Hunter, G. L. K.- J. Food Sci., 30, 1 (1965).
43. D'Amore, G.- Ann. Fac. Econ. Commer., Univ. Studi Messina, 6, 1 (1968).
44. Hunter, G. L. K. y Moshonas, M. G.- Anal. Chem., 37, 378, (1965).

45. Moshonas, M. G. y Lund, D.- J. Agr. Food Chem., 17, 802 (1969).
46. Flores, H. y Morse, R. E.- Amer. Perfumer Cosmet., 11, 363 (1951).
47. Bernhard, R. A. y Marr, A. G.- Food Res., 25, 517 (1960).
48. Schenck, G. O.; Neumüller, O. A.; Ohloff, G. y Schroeter, S.- Ann., 687, 26 (1965).
49. Widmark, G. y Blohm, S. H.- Acta Chem. Scand., 11, 392 (1957).
50. Simonsen, J. L. y Owen, L. N.- "The Terpenes". Vol. 1, 2nd. ed. 1953. University Press. Cambridge.
51. Flores, H.- Food Technol., 8, 6 (1952).
52. Russell, G. A.- J. Chem. Educ., 36, 111 (1959).
53. Roberts, J. D. y Caserio, M. C.- "Basic Principles of Organic Chemistry". W. A. Benjamin, Inc. New York 1965.
54. Rispoli, G.; Di Giacomo, A. y Tracuzzi, M. L.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 47, 118 (1965).
55. Di Giacomo, A.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 47, 370 (1965).
56. Leod, M.- J. Food Sci., 31, 591 (1966).
57. Carpena, O.- Anal. Real Soc. Esp. Fis. Quím., 63 B, 115 (1967).
58. Ikeda, R. M.- J. Agr. Food Chem., 10, 98 (1962).
59. Stanley, W. L. y Vannier, S. H.- J. Amer. Chem. Soc., 79, 3488 (1957).

60. Kleber, G.- Amer. Perfumer Cosmet., 6, 284 (1912).
61. Stillman, R. C.- Perfum. Ess. Oil Rec., 23, 278 (1932).
62. Calapaj, R. y Sergi, G.- Ann. Fac. Econ. Commer., Univ. Studi Messina, 5, 1 (1967).
63. Di Giacomo, A.- Riv. Ital. Essenze Profumi Piante Offic. Aromi Saponi Cosmet. Aerosol, 45, 223 (1963).
64. Strausz, G.- Perf. Ess. Oil Rec., 38, 260 (1947).
65. Ikeda, R. M.; Stanley, W. L.; Vannier, S. H. y Rolle, R.- Food Technol., 15, 9379 (1961).
66. Baines, J.- Tetrahedron, 26, 4901 (1970).
67. Calvarano, M.- Essenze Deriv. Agrum., 35, 197 (1965).