

APORTACIÓN A LA MONOGRAFÍA DE NORMALIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL

Querubina Albaladejo Meroño



**APORTACIÓN A LA MONOGRAFÍA
DE NORMALIZACIÓN DEL ACEITE
ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL**

**APORTACIÓN A LA MONOGRAFÍA
DE NORMALIZACIÓN DEL ACEITE
ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL**

[*Citrus limon* (L.) Burm. f.]

Dra. Querubina Albaladejo Meroño



Región de Murcia
Consejería de Agricultura,
Agua y Medio Ambiente

© Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente
Depósito Legal: MU-873-2003
Fotocomposición: CompoRapid, S.L.
Impresión: Pictografía, S.L.

La transformación industrial del limón, y más en concreto la obtención de su aceite esencial, se puede considerar que ha sido el origen y la principal causa de la industria de elaboración de derivados de los frutos cítricos en la Región de Murcia, donde hoy estas industrias suponen un sector muy significativo de la economía agroindustrial.

En efecto, hace escasamente cuatro décadas el aceite esencial del limón era prácticamente la única justificación económica desechando, en este caso del limón, hasta su zumo que sólo parcialmente encontraba algunas aplicaciones en la fabricación de ácido cítrico natural por el método Scheele, o en pequeñas proporciones para bebidas o en muy concretas aplicaciones industriales, como la fabricación de citrato cálcico. Si bien hoy día esta situación ha cambiado radicalmente hacia un aprovechamiento integral del limón preparando productos derivados muy diversos y de gran interés económico (zumos diversos y pulpas, sustancias pécticas, bioflavonoides, etc.), podemos considerar todavía al aceite esencial del limón como el primer producto resultante de su industrialización y que justifica el abordaje de su tratamiento industrial.

El aceite esencial natural extraído en frío (cold pressed) ha conseguido, a este respecto, ser el principal elaborado; por destilación se prepara aceite de menor calidad. Aceites solubles en mezclas hidroalcohólicas han contribuido durante mucho tiempo a las bases en la preparación de bebidas refrescantes y gaseosas, así como en muy diversos productos alimentarios, a la vez que mediante desterpenación por rectificación se preparan productos aromáticos más especializados y de mayor valor añadido, si bien estos últimos productos escapan la mayor parte de las veces a la industria transformadora primaria y son preparados en industrias principalmente de aromas, más específicas. No obstante su interés, es de destacar que el valor del aceite esencial de limón extraído en frío –que por los años sesenta alcanzaba precios en los mercados internacionales que llegaban a superar las mil pesetas el kilo–, no ha visto actualizado su valor económico, ya que su precio escasamente se ha visto triplicado en el tiempo transcurrido desde entonces, logrando cotizaciones en muchos casos inferiores al producido en otros países con mayor tradición, como sucede con Italia. Si bien en los comienzos esta

producción española era escasamente conocida en los mercados del ramo, no sucede así hoy en día en que existe una demanda que permite asegurar que prácticamente no existen excedentes de producción en cada campaña de elaboración.

A pesar de algunos intentos, hasta la fecha no se ha publicado ningún texto de normalización del aceite esencial de limón de España, ni de carácter nacional ni de organismos internacionales, lo que puede justificar en parte esta situación anteriormente mencionada. Más recientemente, AENOR está colaborando en la elaboración de una norma internacional con ISO, que recoja conjuntamente los aceites esenciales de limón de diferentes orígenes, entre ellos el de nuestro país.

La autora del presente trabajo ha realizado su tesis de grado de Doctor en el estudio de las características y análisis de aceites esenciales de limón producidos en España en diferentes campañas, siendo concedora de la industria regional y de su problemática. Todo esto le permite aportar una amplia serie de datos sobre las propiedades físico-químicas y la composición de nuestro aceite esencial de limón, que con esta publicación ofrece, tanto al propio sector industrial escaso de esta información, como a los organismos interesados en su tipificación. El tratamiento del análisis gascromatográfico del aceite resulta a este respecto muy interesante, ya que esta técnica es la principal herramienta para el análisis de los aceites esenciales, y es muy completo en cuanto al empleo de columnas diversas. Por todo ello, auguro un éxito para esta publicación que realiza la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente de la Región de Murcia.

José Laencina Sánchez

Catedrático de Tecnología de Alimentos

Universidad de Murcia

SUMARIO

I. OBJETO	9
II. INTRODUCCIÓN	13
II.1. Producción e industrialización en España	15
II.2. Transformación industrial del limón en la obtención de aceite esencial	17
II.3. Aplicaciones	20
II.3.1. Deterpenados	21
II.3.2. Alcoholatos	21
II.3.3. Aromas en polvo	22
II.3.4. Aceite esencial destilado	22
III. MATERIAL Y MÉTODOS	23
III.1. Aceite esencial de limón	25
III.2. Análisis sensorial	26
III.3. Análisis físico-químicos	27
III.4. Espectrofotometría de UV. Índice CD	29
III.5. Determinación de la fracción volátil por cromatografía de gases	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
IV.1. Determinación del aroma, aspecto y color	33
IV.2. Determinaciones físico-químicas	33
IV.3. Espectrofotometría. Índice CD	38
IV.4. Determinación de la fracción volátil por cromatografía de gases	40

V. FIGURAS	45
VI. ANEXO I. APORTACIÓN AL PROYECTO DE NORMALIZACIÓN	51
ABREVIATURAS	57
BIBLIOGRAFÍA	61

I. OBJETO

El cultivo de los cítricos en la cuenca del Mediterráneo tiene su principal exponente en las naranjas y los limones, cuya producción adquiere especial importancia en España e Italia fundamentalmente, como principales suministradores de frutos frescos a los países comunitarios de la Unión Europea. A su vez la industrialización de los frutos cítricos tiene una amplia tradición en estos países y constituye posiblemente la vía más interesante de aprovechamiento y regulación de excedentes. En nuestro país y más concretamente en la Región de Murcia la transformación industrial del limón se realiza desde hace tiempo, constituyendo desde el principio el aceite esencial de limón, por sus aplicaciones y extraordinario valor, el primer producto derivado, en contraste con la naranja para la que siempre el aceite esencial ha sido considerado un subproducto.

Existen estudios anteriores sobre los aceites esenciales de limón elaborados en España, pero hasta el momento no se ha desarrollado ninguna norma de las características y composición del aceite esencial de limón español, que sirva de referencia de su genuinidad y calidad con respecto al procedente de otros orígenes. Los objetivos del trabajo que se presenta se orientan hacia la puesta al día del conocimiento de las características de este aceite esencial y la consiguiente aportación de datos a una posible propuesta de normalización del aceite esencial de limón producido en España.

Los organismos oficiales –AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación), ISO (International Standard Organization)– vienen normalizando los distintos métodos de trabajo con vistas a facilitar las determinaciones a realizar, que garanticen la autenticidad y pureza de los productos existentes en el mercado. Lógicamente alcanzar estas certificaciones supone un incremento del valor añadido de los productos incluidos en ellas.

En éste trabajo, se aportan los datos obtenidos en la realización de la tesis doctoral “El Aceite Esencial de Limón producido en España. Contribución a su Evaluación por Organismos Internacionales” (Albaladejo, Q. 1999), en la que se pretende colaborar con la caracterización del aceite esencial de limón producido en España, para lo que se llevan a cabo estudios de la composición físico-química, así como del perfil cromatográfico representa-

tivo de la fracción volátil responsable de la calidad organoléptica y en definitiva de su valor comercial. A tal fin se establecen los siguientes objetivos:

1. Estudio de las características organolépticas de muestras de aceites esenciales de limón.
2. Estudio de las características físico-químicas del aceite esencial de limón. Para ello se consideran los siguientes parámetros: Índice de refracción, rotación óptica, peso específico, índice de carbonilo (expresado como porcentaje del aldehído citral), solubilidad en etanol y residuo seco.
3. Análisis mediante espectrofotometría de ultravioleta, para la obtención del espectro característico y el valor del índice CD.
4. Análisis por cromatografía de gases, para la identificación de un número de componentes suficientemente significativo de la fracción volátil del aceite esencial.
5. Consideración de datos para elaboración de una monografía de las características del aceite esencial de limón producido en España.

La importancia tecnológica y económica que tiene la determinación de las normas de calidad de un producto como el aceite esencial de limón, justifica el interés del presente trabajo. Será preciso que los organismos internacionales determinen, junto con las normativas comunes de técnicas analíticas hasta ahora recogidas, unas bases de datos que permitan conocer la influencia de los distintos factores externos sobre las campañas anuales y, por otra parte, las relaciones entre distintos componentes, para poder determinar la genuinidad. Por último, se aportan los valores para colaborar en la elaboración de la norma de calidad para aceite esencial de limón obtenido en España.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. PRODUCCIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN EN ESPAÑA

La producción mundial de limonero *Citrus limon* (L.) Burm. f. según denominación habitual, supera los 1,5 millones de hectáreas. Los mayores productores del mundo son, por este orden: Estados Unidos, Argentina, Italia, España, Grecia, Israel, Costa de Marfil,... En nuestro entorno próximo del área de la cuenca mediterránea destaca en primer lugar Italia cuyo limón proviene sobre todo de la zona de Sicilia, donde su cultivo goza de gran tradición.

La distribución geográfica del cultivo se encuentra localizada en nuestro país en la zona del Mediterráneo sobre todo en la Región de Murcia y Provincia de Alicante. La superficie dedicada al cultivo de cítricos en España en el año 1994 alcanza las 250.000 Ha, de las que el 20% se destinan al limón, lo que supone una producción cercana a las 500.000 Tm; actualmente se superan las 800.000 Tm. En el Levante español, y en concreto en Murcia, se procesa limón durante casi todo el año, casi el 50% del total de limón recogido en toda España. (Consejería de Agricultura Agua y Medio Ambiente Región de Murcia, 2001). La producción por comunidades autónomas se muestra en la Tabla II.1.1. Se puede observar, que es en la Región de Murcia donde se produce la mayor parte, seguida de la Comunidad Valenciana, representada por Alicante sobre todo en la zona sur en torno a Orihuela.

Esta producción de limón se ha incrementado notablemente en las dos últimas décadas. La exportación para el consumo en fresco, constituye el principal destino de la producción, de la que se dedican a comercio Intracomunitario cerca de 300.000 Tm (Tabla II.1.2), y a exportación cerca de 200.000 Tm, destacando Polonia como principal destino de la misma. Aún así no resulta suficiente como para asumir el total de lo producido. Se observa la tendencia de aumento de los volúmenes de fruta destinados a industria que se consolida en los últimos años, no sólo por el interés económico del aceite esencial del que se producen anualmente más de 750 Tm, lo que supone un total aproximado de cerca de mil millones de pesetas al año, sino de otros

subproductos de limón como corteza para pectinas, limoneno, harina de semillas, etc., elaborados de alto valor añadido, que permiten el aprovechamiento integral de los frutos (Laencina y Carpena, 1974; Coll, 1992).

Tabla II.1.1.- Distribución por comunidades autónomas de la producción de limón en las últimas campañas

	98/99 (Tm)	99/00 (Tm)	00/01 (Tm)	01/02 (Tm)
Murcia	361.500	395.000	420.000	433.000
Valencia	220.314	308.911	342.390	359.957
Andalucía	90.738	177.459	161.165	168.923
Cataluña	1.000	1.125	855	—
Baleares	2.000	2.000	2.000	—
Otras	13.300	12.700	10.900	—
Total	688.852	897.195	937.310	—

INTERCITRUS, 2001

Tabla II.1.2.- Envíos intracomunitarios de limón

País	Limones (Tm)
Francia	79.431
Bélgica-Luxemburgo	12.171
Países Bajos	28.671
Alemania	91.740
Italia	21.225
Reino Unido	36.921
Irlanda	1.126
Dinamarca	4.554
Grecia	49
Portugal	4.072
Suecia	6.504
Finlandia	1.826
Austria	3.579
Total 00/01 (a 30/06/01)	291.869

INTERCITRUS, 2001

II.2. TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL LIMÓN EN LA OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Limón, materia prima para la industria cítrica

El aceite esencial se obtiene de la expresión en frío del pericarpio fresco de las distintas variedades de limón, que presentan ligeras diferencias de grosor de corteza. La variedad “Verna” que ha pasado de ser mayoritaria con un 70% del cultivo de limón, a representar tan sólo el 40% aproximadamente en los últimos años, y la variedad conocida como “Fino” o “mesero” al que también se llama limón de invierno, que constituye casi el 60% del cultivo en la actualidad, y que permite obtener frutos desde septiembre/octubre hasta casi febrero, siendo éstos los más interesantes para la obtención del aceite esencial de limón además de por su riqueza en ácido cítrico en el zumo.

Tratamiento del fruto

La recolección de los frutos debe ser sumamente cuidadosa ya que la integridad del pericarpio va a influir en el rendimiento y la calidad del aceite esencial obtenido. Una parte importante de los frutos que se industrializan provienen de la selección realizada en los almacenes de comercialización en fresco, de donde se transportan a las industrias transformadoras; allí se recibe generalmente en balsas de agua. En caso de que provengan directamente de la recolección, se eliminan las partes sobrantes –restos de hojas y peciolos– y se procede al lavado de los frutos que a continuación pasarán a ser procesados. La humedad se elimina posteriormente mediante aire forzado que incide sobre los frutos dispuestos en mesas de rodillos.

La selección de los frutos es especialmente importante ya que el coste de la materia prima corresponde a más del 80% del coste industrial, y la calidad del producto final está íntimamente ligada con la calidad de la fruta. Por tanto, se debe adquirir la variedad, calidad y cantidad necesarias de frutos, con un estado de maduración adecuado (limpios, sanos, con buen aspecto externo, de madurez y tamaño uniforme). La falta de uniformidad en el tamaño y la maduración causa serios problemas en el rendimiento y en la calidad de los productos obtenidos (FMC, 1980). Los frutos adecuadamente cultivados soportan mejor la manipulación a que son sometidos en las diversas fases del proceso, permitiendo que la fábrica trabaje con mayor eficiencia al presentar mayor rendimiento, menores pérdidas, menos mano de obra para separar frutos en las cintas transportadoras, y permiten la obtención de mayores rendimientos de subproductos.

Los golpes pueden, al dañar las células, producir transformaciones físico-químicas indeseables o favorecer el desarrollo de hongos que contaminen el producto y por supuesto pérdidas de aceite esencial. Las condiciones ideales de transporte están más o menos lejos de la realidad, ya que es imposible eliminar totalmente las magulladuras en los frutos cuando estamos hablando en términos de decenas de toneladas métricas por hora, aunque se descarga el limón sobre lechos acuosos para minimizar los golpes. Si hubieran de almacenarse se haría en un lugar ventilado, a la sombra, manteniendo la fruta seca y procurando procesarla lo antes posible.

Obtención del aceite esencial

Industrialmente, la extracción de aceites esenciales de los frutos cítricos se asocia siempre a la obtención de zumo; para ello la tecnología opta por uno de los dos esquemas de procesos que se basan fundamentalmente en la recuperación preliminar del aceite esencial y posterior exprimido del zumo o en la obtención simultánea de ambos productos, en función de los equipos extractores existentes, que a lo largo del tiempo han evolucionado en distintas concepciones mecánicas.

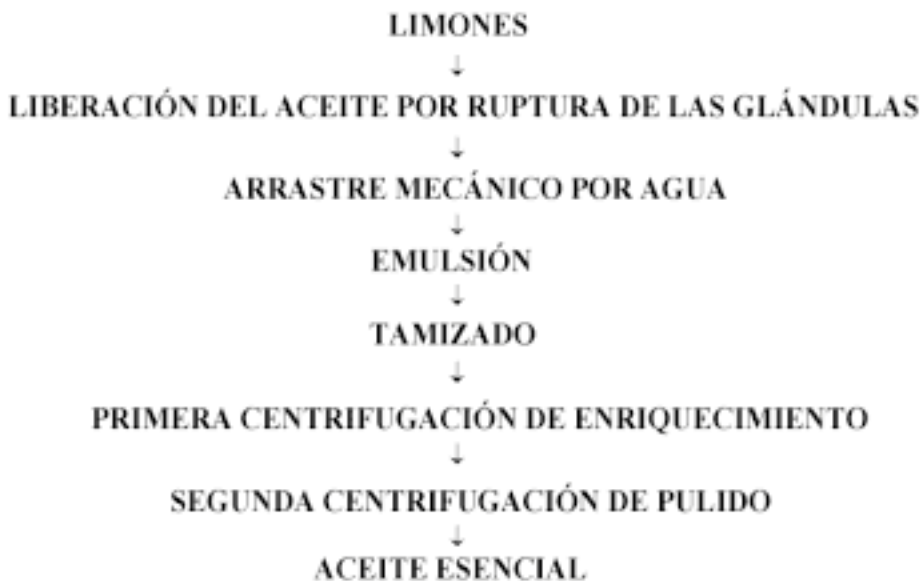
Existe gran profusión de maquinaria como: Pickin Roll, Fraser-Brace “excoriator”, AMC “scarifier”, Brown “peel shaver”, etc., que recuperan el aceite del fruto en un paso previo a la extracción de zumo (Bushman y, Holbrook 1978). En este tipo de maquinaria se opera sobre el fruto entero por abrasión como en los primeros sistemas manuales; pertenecen a éste sistema las máquinas “Pelatrice” (peladora) tales como Speciale, Indelicato y Avena, italianas. El raspado del fruto completo se lleva a cabo mediante varios pares de rodillos de superficies punzantes, dispuestos trapezoidalmente con el eje longitudinal paralelo al sentido de avance de los frutos, la rotación hacia el exterior impide que los frutos se aplasten, haciendo que resbalen sobre sí, cambiando continuamente su posición y ofreciendo toda la superficie a la acción abrasiva de las puntas de los rodillos, al mismo tiempo que el aceite es arrastrado mediante la presión de finos chorros de agua fuera de la máquina (Di Giacomo y Mincione, 1994).

La extracción simultánea de zumo y aceite esencial, se lleva a cabo mediante dos copas dentadas que intercalan sus dientes cuando se cierran a presión. Los frutos clasificados por tamaños, se sitúan en el centro de la copa inferior, la presión generada por la bajada progresiva de la copa superior produce la ruptura de las glándulas oleíferas, al mismo tiempo se produce la extracción de zumo mediante un cuchillo circular situado en el centro de la copa inferior que abre el paso a un tubo pre-refinador que se encaja entre las

dos copas y actúa de colador (Figura I), dejando pasar el zumo al interior del tubo y reteniendo la pulpa y demás fracciones sólidas. Un potente chorro de agua micronizada arrastra el aceite y se produce así una primera emulsión con cuatro componentes: agua, aceite, restos de corteza y sólidos en suspensión.

Entre la maquinaria que sigue este proceso se debe citar en primer lugar el original extractor FMC “In-Line” (Food Machine Corporation) de Norteamérica; también SPECIALE de Italia, FOMESA y LUZZYSA de España. Un esquema de elaboración del aceite esencial de limón se muestra a continuación (Esquema II.2.1).

Se obtiene así por cualquiera de ambos procesos una emulsión con el aceite esencial liberado de los utrículos y el agua de arrastre. A esto se sigue una primera tamización para eliminar restos groseros, y dos centrifugaciones, la primera de enriquecimiento y la segunda de pulido o refinado de la que se obtiene el aceite esencial.



El tratamiento mediante enzimas pectolíticas de las emulsiones acuosas durante el proceso industrial del aceite esencial de limón, permite reciclar los efluentes de extracción, suponiendo un ahorro importante de agua además de evitar la contaminación ambiental, a la vez que mejora las características del aceite obtenido al disminuir las pérdidas de componentes aromáticos oxigenados más solubles (Coll *et al.*, 1995).

Los detritos y las emulsiones de rechazo se someten a prensado y posterior destilación para aprovechar más los frutos. Para esto se utiliza maquinaria como el “Torchio” (prensa de tornillo) que realiza el prensado de la corteza mediante dos hélices que giran en sentidos opuestos, situadas en jaulas que hacen de filtro y abrasivo al estar surcadas longitudinalmente por fresas y talladas con fisuras calibradas para permitir la salida de la esencia. Los restos de corteza se someten a un segundo prensado de mayor intensidad consiguiendo una pasta densa que diluída con la fase acuosa procedente de la centrifuga atraviesa el filtro y se destina a la destilación, método con el que también se pueden tratar efluentes líquidos residuales.

Almacenamiento y conservación del Aceite Esencial

El aceite esencial refinado se almacena en tanques de acero inoxidable que se mantienen a temperaturas comprendidas entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el proceso denominado de “winterización”, para lograr la separación de ceras, trasvasándolo a continuación a bidones de 200 L de capacidad revestidos de resinas fenólicas e incluso de acero inoxidable. Así envasado, se almacena en atmósfera inerte (de nitrógeno o carbónico) y $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

II.3. APLICACIONES

Aunque el limón no se consume de igual forma que la mayoría de cítricos, tiene mayor variedad de usos –culinarios, bebidas, aplicaciones medicinales e industriales– que ninguna otra fruta; es probablemente el tercer condimento más ampliamente utilizado tras el azúcar y la sal, para ensalzar los aromas inherentes a la comida (Swisher y Swisher, 1980). El aceite de limón extraído en frío tiene tantas aplicaciones como el zumo por su uso generalizado en alimentos, refrescos, cosméticos, fármacos y productos de uso doméstico (ambientadores, limpiadores, etc.) (Safina, 1971 y 1984; Laencina, 1983; Carter, 1993).

El aceite esencial de limón obtenido durante el procesado del fruto, se considera como material aromático de “Primera generación”. Actualmente la tecnología de extracción del aceite esencial parece haber llegado al límite en cuanto se trata de conseguir los mejores rendimientos y calidades, por lo que el interés de las industrias se desplaza hacia la obtención de distintos productos, a partir de este material.

Se han creado nuevos materiales aromáticos, mediante el uso de distintos procesos físicoquímicos, que constituyen las sucesivas generaciones dentro

de los productos aromáticos y que son considerados: Productos de segunda generación (Aceites esenciales deterpenados y desesquiterpenados). Productos de tercera generación (Concentrados o “Folded oils”). Productos de cuarta generación (“Top notes”, fracciones carbonílicas o determinados componentes) (Fleisher *et al.* 1987; Pino *et al.* 1993; Kern, 1996). Así mismo interesa la recuperación de los aromas que se producen durante el procesado de aceite esencial y zumo y que posteriormente se reincorporan al zumo ya que potencian la mejora de calidad aromática.

II.3.1. Deterpenados

La eliminación total o parcial de los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos de los aceites esenciales naturales se denominan respectivamente deterpenación y desesquiterpenación, se efectúan principalmente con los siguientes fines:

- Aumentar la concentración de los componentes que contribuyen en mayor medida al aroma.
- Incrementar la solubilidad del aceite esencial de limón en etanol, incluso de baja graduación y/o agua, y así mismo en disolventes aptos para tecnología alimentaria, además los deterpenados son prácticamente solubles en agua a las dosis usadas en la aromatización de las bebidas refrescantes y desaparece el antiestético collarín provocado por los terpenos en la parte alta de la botella.
- Eliminar la aparición de olores desagradables procedentes de procesos como la resinificación y enranciamiento provocados por los hidrocarburos terpénicos.

Los sistemas de deterpenación utilizados son los siguientes:

1. Destilación fraccionada a vacío.
2. Extracción con disolventes.
3. Cromatografía de adsorción.
4. Nuevas tecnologías, entre las que cabe destacar los *Procesos de membrana* (Ultrafiltración -UF-, y la Ósmosis inversa -OR-), *Tratamiento enzimático* de la emulsión obtenida y empleo de la *Extracción con fluidos supercríticos*.

II.3.2. Alcoholatos

Los extractos alcohólicos de los aceites esenciales se conocen comúnmente como alcoholatos o aromas solubles, y revisten particular interés en

los sectores industriales de bebidas y perfumería, ya que al ser solubles en fase acuosa, permiten la aromatización de bebidas y siropes, además poseen mayor resistencia a fenómenos de oxidación, y mayor proporción de los componentes que más contribuyen al aroma, que el aceite esencial de partida. Se elaboran a partir de cortezas mediante maceración y destilación con columnas de rectificación.

II.3.3. Aromas en polvo

La producción de las llamadas esencias o aromas en polvo, se basa en la ya conocida técnica de microencapsulación por “spray drying” (secado por pulverización). Se forma una microemulsión estable de la sustancia aromática y el componente que va a servir de revestimiento, que a continuación se pulveriza para obtener el producto microencapsulado. Los materiales empleados para el revestimiento son polímeros orgánicos, gomas y gelatinas modificadas. La elección dependerá del tipo de maquinaria disponible, de las condiciones necesarias para la formación de la emulsión estable, con una viscosidad aceptable y a baja concentración, y si su destino es el uso alimentario debe estar permitido como aditivo con este fin.

II.3.4. Aceite esencial destilado

El método de destilación por arrastre con vapor de agua se emplea para recuperar el aceite esencial residual de los desperdicios del proceso general de elaboración del limón, y aunque la esencia obtenida es de una calidad claramente inferior a la obtenida por extracción en frío tiene una demanda que justifica su elaboración. Además constituye el método aplicado para la recuperación de los constituyentes volátiles de otras partes del vegetal como hojas (nerolí de limón) y de tallos y brotes (petit grain de limón).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

La materia prima utilizada la constituyen muestras de aceite esencial de limón suministradas por diferentes empresas del sector de transformación de frutos cítricos ubicadas en la región de Murcia, a las que deseo agradecer su colaboración –*AGRUMEXPORT; CIMUSA; CITROMIL; PARRA; RIVERBEND; TANA*– y que procesan fruta en su mayor parte procedente de las producciones de la Vega baja y media del río Segura, y de la provincia de Almería y Málaga. Son, por tanto, muestras genuinas de aceite esencial de limón recogidas directamente en las factorías de elaboración y representan al aceite esencial de limón que se produce en nuestro país.

Las variedades de limón procesadas son: la variedad Verna cuya producción se extiende más en el tiempo a lo largo del año por presentar varias floraciones durante el mismo, y de la variedad llamada de limón Fino que se considera como limón de invierno. Dado que las zonas de cultivo de limón en España se han difundido de forma espectacular en las últimas décadas, desde zonas próximas al litoral marítimo hasta áreas del interior, desde el Sur de la Provincia de Alicante hasta la provincia de Málaga, los calendarios de producción se han extendido solapándose ambas variedades en muchas ocasiones en sus momentos de recolección.

Muestras de aceite esencial de limón

Se han tomado ciento cuarenta y seis muestras de distintas épocas de producción de varias campañas desde el año 1993, siendo el año 1996 del que mayor número de muestras se recogieron, y por último varias muestras de la campaña 1998-99. Se toman las muestras directamente de la línea de producción, concretamente a la salida de la centrífuga de pulido, y algunas de la cámara frigorífica de conservación, días después de su industrialización en momentos de producción más limitada. Las muestras se recogen en envases de vidrio color topacio de hasta 200 mL, cerradas herméticamente y se conservan en cámara frigorífica a temperatura ligeramente superior a 0 °C.

Las muestras se someten a su análisis directamente, actuando según cada técnica lo requiere.

III.2. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial de los aceites esenciales en general y en concreto el de limón se limita a la estimación de los atributos de aspecto, color y olor fundamentalmente, en la mayoría de los casos, sólo se toma nota cuando el aspecto o el aroma que se observa no son los habituales. El aceite esencial de limón es un líquido ligeramente coloreado, que puede variar de amarillo pálido a amarillo-verdoso, algunas veces presenta incipiente turbidez y olor característico del pericarpio fresco de limón (ISO 855, 1981).

En cuanto al aroma en concreto algunos expertos pueden utilizar para describirlo diferentes calificativos: Fondo correcto, fresco, áspero, plano, regular etc. Salida muy bien, bien, correcta, verde, frutada, enclenque, etc. Cabe destacar que el olor a pericarpio fresco de limón, cuando es percibido por un experto acostumbrado, encuentra una gran cantidad de matices que pocos aprecian, de aquí la importancia que se deriva de técnicas como el estudio del espacio de cabeza y de la nariz electrónica sobre todo, ya que entre los paneles de expertos existen también variaciones en la apreciación que resultan difíciles de relacionar pues a veces depende también del destino final del aceite, por ejemplo, para aplicación en alimentación, como se ha venido usando en mejorar el gusto de los concentrados de zumo y para potenciar el aroma de zumos congelados y bebidas refrescantes y en perfumería.

Para el estudio del color se ha utilizado un colorímetro Minolta CR-200 que permite medir la cromaticidad absoluta, es decir matiz, color y luminosidad. Las muestras de aceite esencial se sitúan en tubos de vidrio de veinte mL de capacidad, llenos hasta la mitad de aceite esencial, y se realizan las medidas sobre fondo blanco. En cualquier caso la gama de color obtenida por los procedimientos de extracción actuales son comúnmente aceptados en el mercado. Las muestras con excesiva coloración incluso con tonalidades de pardeamiento son indicativas de un exceso en el tratamiento mecánico y en la separación del aceite esencial tal como sucedía con los sistemas de peladora Avena que hoy ya no se utilizan. No conviene que los frutos estén excesivamente maduros ya que las glándulas de aceite esencial en esas condiciones suelen estar más o menos agotadas y el aceite esencial así obtenido es menos aromático, ni demasiado verdes que proporcionarían un aroma excesivamente áspero.

III.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Para el control analítico de aceites esenciales de cítricos se utilizan entre otras las siguientes determinaciones:

Residuo de Evaporación

Este representa la fracción no volátil de aceite esencial que generalmente está constituida por ceras, parafinas, cumarinas, furocumarinas y componentes de elevado peso molecular. Su determinación se lleva a cabo mediante el método descrito en la norma ISO 4715 de 1978, para aceites esenciales. Es el porcentaje de masa que se obtiene tras la eliminación de la fracción volátil, por calentamiento de la muestra, al baño maría y posterior enfriamiento en un desecador. El resultado se expresa como porcentaje de masa del residuo respecto de la masa inicial. Parece estar relacionado con el tiempo que está el aceite en contacto con la corteza durante la expresión, y con el tipo de proceso de extracción que produce un mayor o menor esfuerzo mecánico sobre la corteza del fruto (Rodano, 1930; Kesterson *et al.*, 1971), este contacto es mayor en las máquinas tipo “pelatrice” que en las de tipo espumadora.

Solubilidad en Alcohol

Por este método (AENOR: UNE 153, 1984; ISO 875, 1981) se puede observar la posible adición de ciertos adulterantes, que no son solubles en alcohol de una graduación en la que se conoce la solubilidad de la esencia genuina, así como también la solubilidad disminuye en aceites esenciales envejecidos, ya que se produce la polimerización sobre todo de hidrocarburos terpénicos, que presentan este fenómeno con gran facilidad. Para los aceites esenciales de cítricos se emplean normalmente disoluciones de alcohol etílico de elevada graduación alcohólica, comprendidas entre 80% y 96%. La solubilidad será tanto mayor cuanto más rico sea en componentes oxigenados.

Peso Específico

Se utilizan dos métodos para esta determinación: El primero mediante picnómetro, a temperatura ambiente 20 °C (ISO 279, 1981). La relación entre el peso del picnómetro lleno de aceite esencial y de agua nos permite calcular la densidad del aceite esencial en g/mL.

En el segundo método (AENOR PROPUESTA UNE 84-402, 1992), se emplea un Densímetro Digital, instrumento de medida cuyo fundamento es

la variación que experimenta la frecuencia de un circuito oscilante, excitado electrónicamente, al contener un volumen fijo de muestra. La frecuencia de oscilación está influida únicamente por la masa del volumen de muestra; al mantenerse constante ésta magnitud para una temperatura dada (por las características de la célula de medida), la densidad de la muestra se obtiene como función de la medida de la frecuencia (o del periodo) de oscilación según la expresión:

$$\rho = (1/A) \times (T^2 - B)$$

donde T es el periodo de oscilación del sistema y A y B son constantes del aparato que se determinan en la operación de calibrado.

Índice de Refracción

Es la relación del seno del ángulo de incidencia de un rayo de luz y el seno del ángulo de refracción (ISO 280, 1976) medida a 20 °C. Se determina con un refractómetro de precisión, que permite apreciar las diezmilésimas. Puede usarse luz blanca si el refractómetro utilizado posee un dispositivo de compensación cromática. Se pone una gota del aceite esencial en el espacio comprendido entre los dos prismas, y se lee después de cinco minutos, al menos, de contacto.

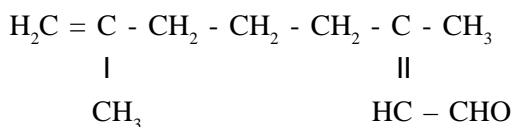
Rotación Óptica

Los aceites esenciales de cítricos tienen la propiedad de producir una rotación dextrógira, más o menos acentuada, del plano de la luz polarizada. Esta medida se realiza según la norma ISO 592, 1981; y sus equivalentes AFNOR 75-113, 1982 y AENOR 159, 1984. Se utilizan dos polarímetros uno manual que tiene como fuente de luz una lámpara de sodio, y un polarímetro semiautomático ATAGO Polax-D. La medida se efectúa igualmente a 20 °C, se introduce la muestra de aceite esencial en tubos de 20mm o de 100 mm. Se realizan tres medidas de cada muestra y obtenemos la media –siempre que no difieran entre ellas más de 0'08° o 1'4 mrad, en cuyo caso se rechazan–.

Índice de Carbonilo

El fundamento de ésta técnica (ISO 1279, 1984) se basa en que la adición del clorhidrato de hidroxilamina produce la oximación –por parte de la hidroxilamina– del doble enlace carbonílico del grupo aldehído formando una aldoxima y liberando ácido clorhídrico. Completada la reacción se valora el

HCl liberado que se relaciona con el contenido en grupos carbonílicos en la muestra y que se calcula en gramos del aldehído. El final de la reacción se determina por viraje de indicador (azul de bromofenol) o por potenciometría. En el caso de que más de un aldehído o cetona estén presentes en el aceite esencial, se expresan todos como uno de ellos, que se considera más representativo. El aldehído predominante en el aceite esencial de limón es el citral que presenta dos isómeros citral *trans* o geranial y citral *cis* o neral.



Citral

III.4. ESPECTROFOTOMETRÍA UV. ÍNDICE CD

El método se basa en la determinación del espectro de absorción de la disolución alcohólica de aceite esencial de limón (250 mg en 100 mL alcohol etílico), usando de blanco etanol, en el rango de longitudes de onda comprendido entre 260 y 400 nm, según la norma ISO 4735 (1981). La línea CD se determina por la distancia entre el máximo de absorción y el punto que corta la tangente entre el mínimo y el punto de inflexión de la curva. Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro digital UVIKON de la marca KONTRON. Para evitar el uso del método gráfico se diseña un programa en lenguaje BASIC, que permite calcular el valor de la línea CD introduciendo los datos de las absorbancias y longitudes de onda de máximo mínimo y punto de inflexión.

III.5. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

El siguiente paso en la caracterización de limón es el estudio del perfil aromático por inyección directa en cromatografía en fase gaseosa –técnica de elección en el análisis de aceites esenciales–, que permite la separación e identificación de los componentes de mezclas muy complejas como es el caso del aceite esencial (ISO 7609, 1985), y de una forma eminentemente práctica, ya que al ser un producto de elevada volatilidad, puede ser sometido a ésta técnica sin necesidad de tener que actuar sobre la muestra, evi-

tando por tanto, toda alteración en el producto original, cosa que no es usual en la mayoría de los métodos de fraccionamiento e identificación. A lo largo de varias campañas se ha realizado el análisis cromatográfico utilizando columnas capilares de diferente polaridad.

Se utiliza la inyección directa de muestra, aplicando cantidades de aceite esencial comprendidas entre 0'05 μL y 0'7 μL . Se emplea un cromatógrafo equipado con un detector de ionización de llama (FID). La separación se lleva a cabo en tres columnas capilares diferentes: OV-101, apolar cuya fase estacionaria está constituida por 100% de Polidimetilsiloxano; HP-5 ligeramente polar con un 5% de difenil y 95% de polidimetilsiloxano y CPWax 52-CB, polar con un 100% Polietilén glicol (PEG20M). La mayoría de los programas de temperatura comienzan sobre los 60 °C y finalizan entre 180 y 210 °C ya que se considera que en ese rango de temperatura eluyen todos los componentes.

El perfil cromatográfico da una idea a simple vista tanto del aceite de que se trate como de la columna. Depende de la polaridad de la fase estacionaria utilizada, del programa de temperatura aplicado, del flujo de gas portador, y de la concentración de algunos componentes mayoritarios que asumen en su concentración a picos minoritarios que eluyen muy próximos. Para determinar este orden se han utilizado las referencias bibliográficas existentes sobre cada columna o similares en su composición, además se han utilizado mezclas de patrones, bien, inyectadas a modo de estándar, bien, añadiendo una alícuota a la muestra de aceite para observar el incremento del pico a determinar. Así mismo se ha utilizado la inyección de la muestra junto con patrones de la serie hidrocarburos saturados comprendidos entre C7 y C24, con el fin de determinar los índices de retención. Sería deseable poseer todos los patrones de los componentes que se supone forman parte del aceite esencial, pero estos son compuestos naturales a veces difícilmente purificables y en cantidades realmente pequeñas como para obtenerlos comercialmente. Por último se determinan también por espectrometría de masas (MS).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. DETERMINACIÓN DEL AROMA, ASPECTO Y COLOR

Todas las muestras estudiadas presentan el aroma característico del pericarpio fresco de limón. Las muestras límpidas y transparentes sin residuo alguno presentan un color visual propio de los frutos de origen que comprende desde un verde ligero al amarillo definido. El ensayo de color realizado con muestras obtenidas a lo largo de una campaña nos permite observar que las variaciones en el mismo dependen de la época de procesado, estado de madurez de los frutos y sistema de extracción. El rango de valores obtenido para las muestras mediante el colorímetro digital es el que corresponde a la zona del amarillo y verde, cercana en algunos puntos al anaranjado. Los valores L^* (luminosidad) se sitúan entre 31 y 35 ± 0.1 . Los valores de a^* negativos indican cromaticidad verde y los positivos rojiza, los valores encontrados van de -1.02 a 0.26 . Los valores de b^* positivos que indican cromaticidad amarilla, se sitúan para las muestras estudiadas entre 0.09 y 3.64 .

IV.2. DETERMINACIONES FÍSICO QUÍMICAS

Los análisis físico-químicos habituales (densidad, índice de refracción, rotación óptica, residuo de evaporación, solubilidad en etanol, y sobre todo determinación del índice de carbonilo) permiten la detección rápida de alteraciones groseras caso de que se presentaran. Los valores máximos y mínimos encontrados para estos ensayos muestran que se sitúan dentro de los valores normales del aceite esencial de limón determinados anteriormente por otros autores para aceites de otras procedencias.

Residuo de Evaporación

En la determinación del residuo seco realizado con cuarenta y siete muestras, procedentes de varias campañas, se obtuvieron porcentajes que oscilan entre 1.7 y 3.0% y son comparables a los obtenidos por Di Giacomo y Mincione en 1994 (1.78% mínimo y 3.77% máximo), para máquinas de

tipo “Sfumatrice”, ya que las muestras no provienen de máquinas raspadoras y presentan menor porcentaje de residuo de evaporación. Kesterson *et al.* (1971) encuentran para limón italiano un mínimo de 1’5% y un máximo de 2’2%; y para el procedente de USA un mínimo de 1’5% y un máximo de 1’8%. En muestras de limón español Liberti *et al.* (1973) obtienen valores comprendidos entre 1’92% y 3’24%. Los datos obtenidos en nuestras muestras son más próximos a los que presenta el aceite esencial de limón italiano.

Solubilidad en Alcohol

En las diversas aplicaciones industriales de los aceites esenciales de limón (alimentación farmacia, perfumería, etc.) es muy frecuente recurrir a la preparación de disoluciones etanólicas. Por otro lado, la adición de sustancias poco solubles en alcohol influyen de forma notable en la solubilidad. De modo similar en el proceso de envejecimiento se producen polimerizaciones, principalmente de los constituyentes de carácter terpénico, con formación de polímeros insolubles (Di Giacomo y Mincione, 1994). Las disoluciones obtenidas pueden ser totalmente límpidas o pueden ser más o menos turbias. Los valores encontrados por Calvarano *et al.* (1988) se encuentran comprendidos entre 5’0 y 8’5 volúmenes de alcohol de 90% (v/v) a 20 °C. Las muestras estudiadas son totalmente solubles en alcohol de 95°, y en alcohol de 90° son solubles entre diez volúmenes y seis. Liberti *et al.* en 1973 encuentran valores similares a los de este estudio.

Peso Específico

Los valores bajos de peso específico se deben al alto contenido en hidrocarburos terpénicos –los deterpenados poseen densidades más elevadas– y en general a la presencia de componentes volátiles por lo que pueden indicar la presencia de aceites esenciales destilados (Di Giacomo y Mincione 1994). Los valores obtenidos con densímetro se sitúan para la densidad absoluta entre un máximo de 0’8534 y un mínimo de 0’8519; y para densidad relativa se encuentran entre 0’8534 y 0’8549 respectivamente. El picnómetro nos da valores comprendidos entre 0’8420 y 0’8520. Teniendo en cuenta que los datos encontrados por Liberti *et al.* en 1973 y posteriormente por Drouet en 1982 y Di Giacomo y Mincione en 1994, varían sus mínimos entre 0’8462; 0’849; 0’8555 y 0’8566 y sus máximos respectivos entre 0’8575; 0’858; 0’8572 y 0’8590, se consideran los valores encontrados dentro del rango de valores normales para el aceite esencial de limón.

Índice de Refracción

En los valores de Índice de Refracción el mínimo está más cercano a los valores de limón Italiano y el máximo cercano a los de aceite esencial de USA. El valor máximo de Índice de refracción observado en las muestras es de $1'4752 \pm 0'0001$, y el mínimo de $1'4722 \pm 0'0001$. El valor mínimo y el máximo tan sólo lo presenta una muestra, otras tres muestras tienen un valor de $1'4726$ y cuatro más de $1'4728$; diez se encuentran entre $1'4730$ y $1'4732$, diecinueve entre $1'4734$ y $1'4739$ y nueve entre $1'4740$ y $1'4752$ lo que implica que la mayoría de los valores obtenidos para estas campañas se hallan entre $1'4730$ y $1'4740$.

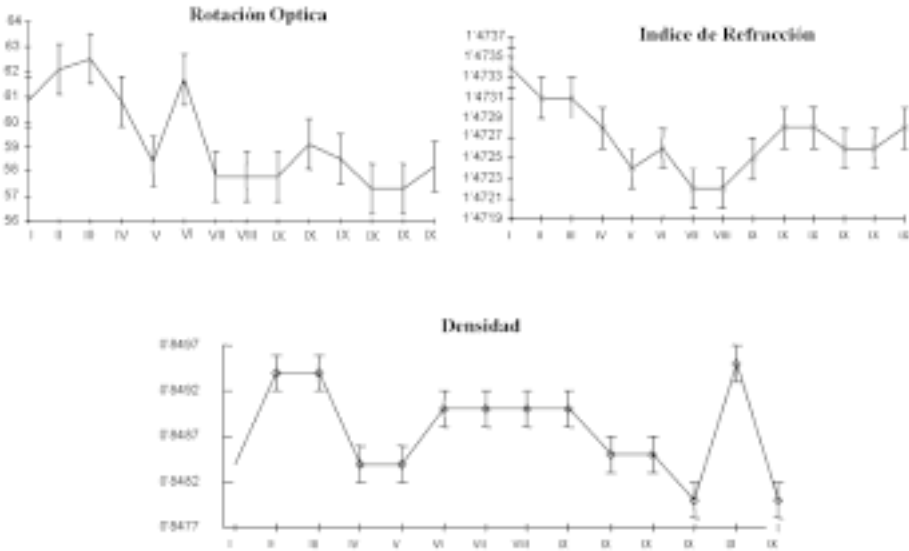
Rotación Óptica

Los componentes en mayor proporción en el aceite esencial de limón (α -limoneno y β -pineno), son los responsables de las variaciones que se producen en la rotación óptica. El limoneno es de naturaleza dextrógira y es el componente mayoritario en el aceite mientras que β -pineno, segundo en importancia, es de naturaleza levógira. La variación de las proporciones de ambos componentes es la principal causa que provoca los cambios en éste parámetro.

El valor máximo encontrado en las muestras procesadas corresponde a $+61'86$ y el mínimo a $+56'4$. Esto sitúa los valores del aceite esencial de limón de origen español obtenidos durante estas campañas (1992-1994), en un margen más estrecho que el resto, pero las diferencias no son significativas, únicamente consecuencia de las múltiples variaciones que afectan a los frutos procesados en cada campaña. En cuanto a la variación a lo largo de la misma, parece que en estas del 1992-1994 son más elevados los valores hasta los meses de abril/mayo, empezando a disminuir a partir de entonces durante la época de verano hasta diciembre, pero no son variaciones que realmente se puedan considerar como significativas de una determinada estación. De los valores normales del aceite esencial de limón determinados anteriormente por otros autores para la Rotación óptica vemos que los de limón español son más próximos a los de Italia.

Para ofrecer una visión de conjunto de algunas de las propiedades físicas se muestran las gráficas con las variaciones de Rotación Óptica, Índice de Refracción y Densidad durante la campaña de producción 1994-1995, en la Figura IV.2.1. Los resultados obtenidos de los tres últimos parámetros en distintas muestras a lo largo de varias campañas, se reflejan en la Tabla IV.2.1.

Figura IV.2.1.- Evolución de los parámetros de rotación óptica, índice de refracción y densidad.



Índice de Carbonilo expresado como porcentaje de citral

La determinación química del índice de carbonilo, expresando el resultado como porcentaje de citral, ha sido usada durante mucho tiempo como indicativa de la calidad comercial del aceite esencial de limón, y aún hoy día sigue siendo utilizada, ya que al citral se le atribuye ser el principal responsable del toque más característico del aroma del mismo y, como consecuencia, su contenido es en cierta medida un indicador del valor comercial del aceite esencial. Este valor de índice de carbonilo se corresponde, por exceso, con el porcentaje total de aldehídos que se obtiene por cromatografía de gases.

Las variaciones del índice de carbonilo se ven afectadas por numerosos factores y, aunque el valor del mismo es más elevado en los meses de enero y febrero, en la actualidad y debido a la extensión de los cultivos de floración más o menos tardía, se obtienen frutos de variadas características a lo largo de toda la campaña. Esto influye en que se observen en este parámetro algunos valores en los meses de enero/febrero inferiores a los procedentes de muestras de diciembre de la misma campaña, e incluso de los procesados en

Tabla IV.2.1.- Valores de Rotación Óptica, Índice de Refracción y Densidad.

PARÁMETRO	Mínimo	Máximo
DENSIDAD RELATIVA		
Picnómetro	0'842	0'852
Densímetro	0'853	0'855
OTROS AUTORES		
Liberti <i>et al.</i> (1973) Limón Español	0'846	0'857
Drouet (1982) Limón Costa de Marfil	0'849	0'858
Di Giacomo y Mincione(1994) Limón Italia	0'855	0'857
	0'856	0'859
INDICE DE REFRACCIÓN	1,4734	1,4752
OTROS AUTORES		
Kesterson <i>et al.</i> (1971) Limón U.S.A	1'4738	1'4745
	1'4742	1'4755
I.S.O. (1981) Limón Italia	1'4740	1'4760
Di Giacomo y Mincione (1994) Limón Italia	1'4734	1'4765
ROTACIÓN ÓPTICA	+56°	+62°
OTROS AUTORES		
Kesterson <i>et al.</i> (1971) Limón U.S.A	+57'82°	+69'98°
I.S.O. (1981) Limón Italia	+57°	+65°
Calvarano <i>et al.</i> (1988) Limón Italia	+59'37°	+67'26°

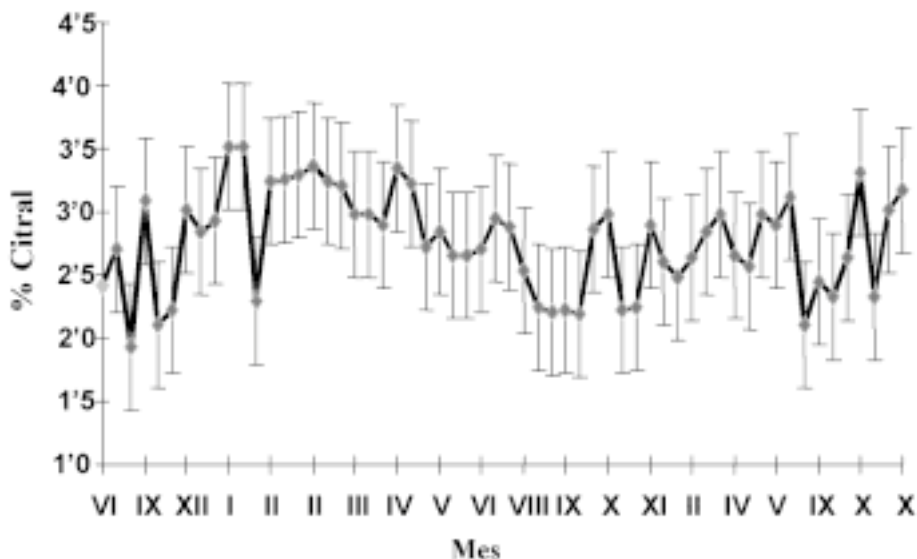
abril/mayo. Así mismo dependiendo del año, los valores de índice de carbono son más o menos elevados. En la figura IV.2.2, se observa la variación que se produce dentro de las muestras estudiadas durante una misma época del año y la que se produce de la media de todas ellas a lo largo de la campaña, además de la tendencia (representada por la línea fina), se ve la variabilidad en los valores de las distintas muestras de un mismo mes.

Se determina el contenido en aldehídos, expresados como porcentaje de citral, en ciento dieciséis muestras y los valores obtenidos oscilan entre 4'07 y 1'73%. La gran mayoría de los valores están comprendidos entre dos y tres por ciento –ochenta y dos valores–, y de tres a cuatro por ciento –veintiocho valores–. Los valores máximos y mínimos encontrados para el Índice de Carbonilo sitúan al aceite esencial español entre el de Estados Unidos y el de Italia.

Tabla IV.2.2.- Valores de Índice de Carbonilo expresados como citral.

PARÁMETRO	Mínimo	Máximo
ÍNDICE DE CARBONILO	1'73%	4'07%
OTROS AUTORES		
Stanley <i>et al.</i> (1958)	2'74%	3'16%
Yokohama <i>et al.</i> (1961)	1'87%	3'54%
Di Giacomo y Mincione (1994)	3%	4'5%
		3%

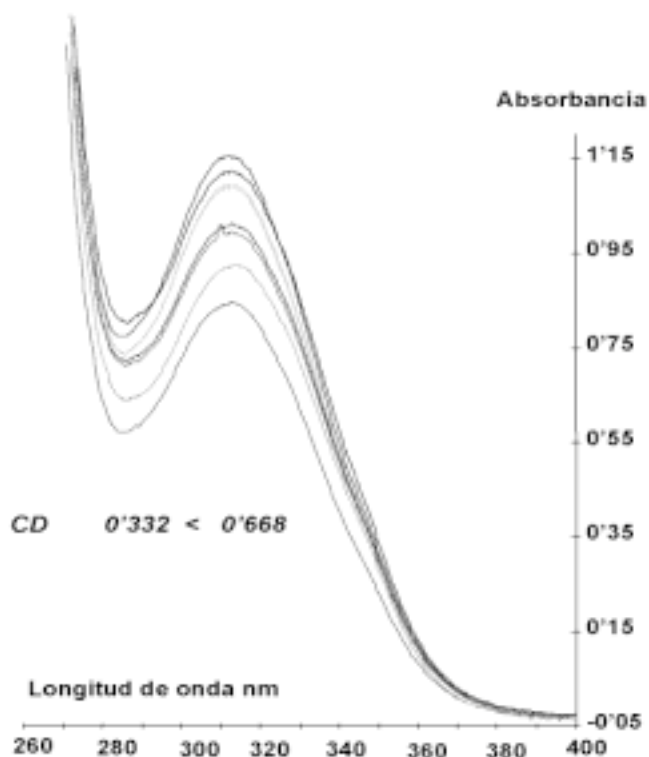
Figura IV.2.2.- Variaciones del índice de carbonilo expresado como% de citral entre muestras de la misma campaña tomadas de forma aleatoria.



IV.3. ESPECTROFOTOMETRÍA UV. ÍNDICE CD

El valor CD depende en parte de los hidrocarburos terpénicos, del citral, y principalmente de los constituyentes de naturaleza no volátil, como psoralenos y cumarinas. La curva de absorbancia en UV produce un máximo en torno a los 315 nm y un mínimo cercano a los 280. La posición de éste mínimo se desplaza hacia longitudes de onda más bajas cuando aumentan los compuestos cumarínicos, y hacia longitudes de onda más altas cuando au-

Figura IV.3.1.- Registros espectrométricos de varias muestras de aceite esencial de limón



mentan los hidrocarburos terpénicos (Calvarano *et al.*, 1979). Es un parámetro útil para determinar la fracción no volátil de aceite esencial. Parece estar relacionado con el tiempo que está el aceite en contacto con la corteza durante la expresión, ya que a mayor tiempo aumentan los materiales de deshecho (Sinclair 1984). Los valores anormalmente altos podrían indicar una contaminación con aceites de diverso origen, por el contrario valores muy bajos determinarían una mayor presencia de terpenos.

Por tanto la presencia en los aceites esenciales de cítricos de constituyentes como cumarinas, furocumarinas, y el citral, determina el comportamiento característico en la zona de absorción del ultravioleta y ha sido utilizado para la puesta a punto de métodos de valoración de la calidad y para contribuir a determinar el origen geográfico, la tecnología empleada, la época de producción e incluso, a desvelar sofisticaciones que pueden escapar al análisis

tradicional (Riganensis, 1955; Sergi *et al.*, 1968; Di Giacomo y Mincione, 1994). Los espectros de Ultravioleta obtenidos de diferentes muestras nos dan una pequeña banda entre el mínimo de absorción sobre 285nm y el máximo sobre 315. Los valores de CD obtenidos de las muestras estudiadas se sitúan entre 0'332 y 0'668 la mayoría comprendidos entre 0'39 y 0'56 (Figura IV.3.1). Para limón italiano los valores se encuentran entre 0'49 y 0'57 y para USA entre 0'2 y 0'67.

IV.4. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

El perfil cromatográfico da una idea a simple vista tanto del aceite de que se trate como de la columna (Figuras III, IV y V), pero para afinar más en la determinación de los componentes se debe conocer el orden en el que aparecen los componentes en el cromatograma, y este depende, además de la polaridad de la fase estacionaria utilizada, del programa de temperatura aplicado, del flujo de gas, y de la concentración de algunos componentes mayoritarios que asumen en su concentración a picos minoritarios que eluyen muy próximos. La comparación de los resultados obtenidos en columnas capilares de diferente polaridad puede resultar, en casos como este, en que la muestra es realmente compleja, quizás más útil resolutivamente que la detección de los espectros de masas, ya que es difícil tener los patrones naturales de todas las sustancias que intervienen en la muestra, y las cantidades en que se presentan son muy pequeñas respecto a otros picos muy próximos de proporciones mucho mayores y que por otra parte son los más claramente identificados. En OV-101 y en CPWAX la resolución de p-cimeno es mejor que en HP-5 aunque ésta mejora respecto de OV-101 en la separación de los pares de picos octanal/mirceno y geraniol/acetato de nerilo y las dos (HP-5 y OV-101) aventajan en la resolución de los picos de geraniol acetato de nerilo y bisaboleno respecto a CPWax-52CB que tiene como ventaja que permite acortar los tiempos de elución respecto a las anteriores y resuelve el pico de β -felandreno que no resuelven las anteriores. De la comparación de los datos obtenidos en las tres columnas se logra la identificación de 74 componentes del aceite esencial de limón frente a los 65 recogidos en bibliografía.

Las diferencias de concentración encontradas al comparar los resultados obtenidos en dichas columnas son debidas a la diferente capacidad de resolución de las mismas. Las columnas apolares ofrecen la identificación de un

mayor número de componentes, resultado coincidente por lo expresado por Staroscik *et al.* (1982). Sin embargo la comparación de muestras de distintas fechas y distintas campañas nos puede dar valores muy variados, como variados son los factores externos que influyen en la formación del aceite esencial en los frutos.

Los valores de limoneno suelen ser más elevados hacia el inicio de la campaña, lo que no significa que no podamos encontrar valores altos de limoneno a mediados o finales de la misma campaña. En este caso el valor más alto es el encontrado en el mes de enero, que se corresponde con el máximo también para canfeno, terpinoleno y α -terpineno y con el mínimo encontrado para el resto de hidrocarburos terpénicos. Mirceno y β -ocimeno, presentan su máximo en febrero, coincidiendo con el mínimo de sabineno. El máximo de limoneno coincide así mismo con los máximos de octanal, dodecanal y perillilaldehído y con los mínimos de citronelal y decanal, también con el mínimo encontrado para todos los alcoholes y los ésteres. neral y geranial en cambio presentan su máximo en el mes de febrero y su mínimo en mayo, coincidiendo con el mínimo y el máximo de sabineno respectivamente. La mayoría de los trabajos presentan los valores de unas muestras aisladas, salvo los de Cotroneo *et al.* (1986), Calvarano *et al.* (1988), que ofrecen las variaciones de los valores de 32 componentes, de noviembre a mayo y octubre a mayo respectivamente. Esto se realiza sobre una sola clase de columna, concretamente la apolar SE-52.

El estudio de las muestras a lo largo de una campaña nos ha permitido ver las variaciones sufridas por los distintos componentes a lo largo de la misma. Los terpenos mayoritarios limoneno β -pineno y γ -terpineno tienen una evolución muy relacionada entre ellos de forma que los aumentos de limoneno de enero, abril y mucho menor en junio, implican descensos en β -pineno y γ -terpineno.

En cuanto a los aldehídos se dan mayores proporciones de geranial y neral que presentan un máximo hacia enero febrero y otro hacia junio de menor intensidad que se corresponde con los valores más altos de índice de carbonilo y justifica el uso del índice de carbonilo como método de determinación de citral. La variación de los restantes aldehídos no aparece como significativa.

Los alcoholes mayoritarios parecen presentar valores bajos hacia enero, febrero y aumentan hacia octubre y llama la atención que la correlación de todos los alcoholes mayoritarios está relacionada con la evolución inversa de limoneno. Los ésteres presentan mayores proporciones hacia el final de la campaña.

Di Giacomo y Mincione (1994), mediante el estudio en cromatografía de gases, dan unos valores máximos y mínimos de porcentajes de unos 62 componentes del aceite esencial de limón italiano, entre estos el p-cimeno comprendido entre un mínimo de 0'025 y un máximo de 0'675 –que se supone habrá separado con otro programa distinto, como ocurre en el presente trabajo–, ya que en el cromatograma presentado por dichos autores, el pico del p-cimeno no aparece separado del limoneno y no menciona la utilización de otra columna. Las muestras aquí estudiadas ofrecen valores de este componente comprendidos entre 0'030 y 0'500.

De los trabajos anteriormente citados se pueden obtener los porcentajes máximos y mínimos de una campaña –Cotroneo *et al.* (1986) la de 82/83 y 1984 Calvarano *et al.* (1988) de octubre de 1987 a mayo del 1988–. Estos porcentajes comparados entre sí, nos indican que las distintas campañas producen variaciones de los máximos y mínimos de cada componente. Por ejemplo, para Cotroneo *et al.* (1986) los valores de limoneno más p-cimeno presentan un mínimo de 61'393% y un máximo de 65'920% y Calvarano *et al.* (1988) encuentran también en limón italiano un mínimo de limoneno sin p-cimeno de 64'559 y un máximo de 69'387. Di Giacomo y Mincione (1994) ofrecen los porcentajes a lo largo de varias campañas y encuentra para limoneno valores comprendidos entre 59'570 y 71'060. Probablemente sería conveniente disponer de un banco de datos con los porcentajes de los distintos componentes, pero esto sólo –como se deduce de las variaciones para un mismo compuesto en campañas aisladas– no nos aseguraría la genuinidad, lo que sí es más característico son las proporciones relativas de unos componentes respecto de otros, como puede deducirse a partir de las gráficas de evolución de los componentes

Esto se aprecia claramente, por ejemplo, en el caso de limoneno y β -pineno: si el primero aumenta el segundo disminuye y viceversa. Existen además correlaciones entre las variaciones de porcentajes de unos compuestos respecto de otros que deberán poner de manifiesto la relación filogenética de los mismos junto con la mayor producción de unos u otros dependiendo de la climatología, portainjerto y tipo de suelo por el que se vean afectados.

Los valores absolutos pueden variar de unas a otras ya que las propias cosechas varían los porcentajes de los mismos. Y esto se ve en los porcentajes máximos y mínimos recogidos en las campañas desde el año 1993 hasta 1999. A veces se pueden presentar sustancias en proporciones muy bajas y que dependiendo de las proporciones del resto de los componentes puedan dar o no problemas de perfil de aroma, como ocurre con el p-cimeno formado a partir del γ -terpineno, que depende de las concentraciones de citral para

ser detectado. Los datos observados nos permiten hacer una aportación a la propuesta de norma de calidad para aceite esencial de limón producido en España, recogida en el Anexo I, y que incluye además de la definición y los datos de características físico-químicas los valores de porcentajes de área máximos y mínimos encontrados para los setenta y cuatro componentes identificados entre las tres columnas.

V. FIGURAS

Figura I. Esquema de funcionamiento extractora tipo FMC "in line".

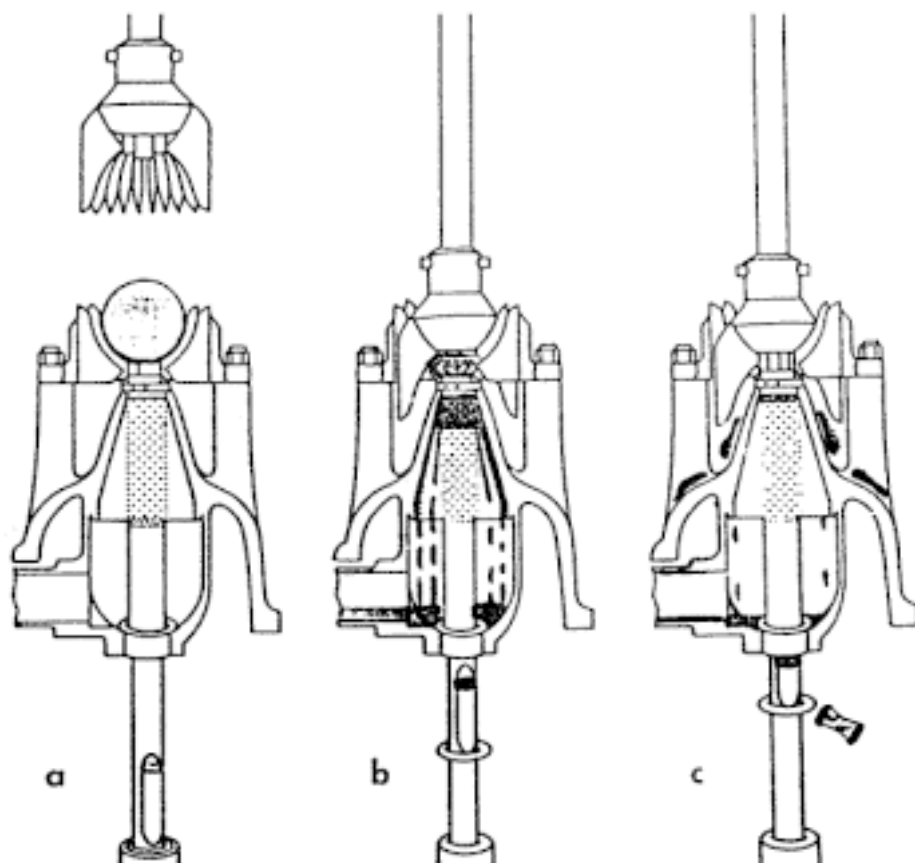
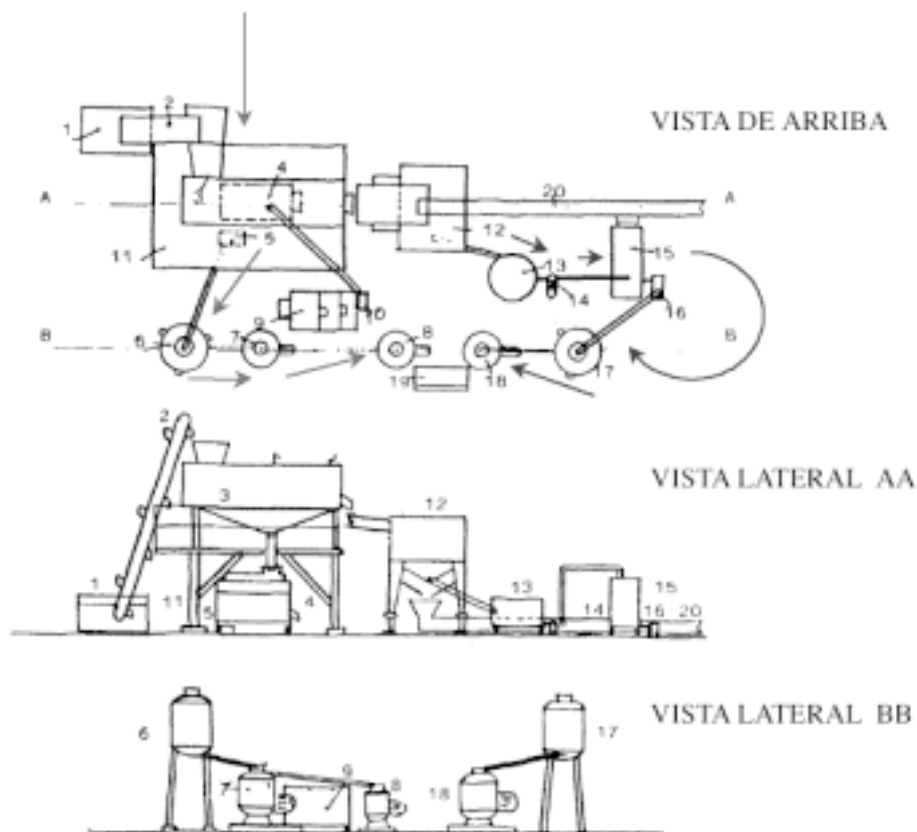


Figura II. Esquema planta de procesado “Pelatrice”.



- | | |
|--|--|
| 1) Vaso de alimentación | 11) Palco de acero. |
| 2) Elevador a tazas | 12) Extractor del jugo. |
| 3) Extractor automático del aceite esencial. | 13) Vaso del jugo. |
| 4) Filtro-prensa rotativo automático | 14) Bomba «mono» del jugo. |
| 5) Bomba de la emulsión aceite-agua. | 15) Refinadora. |
| 6) Vaso de alimentación de la centrífuga. | 16) Bomba «mono» del jugo. |
| 7) Separador autolimpiador. | 17) Vaso del jugo de clarificar. |
| 8) Separador abrillantador. | 18) Clarificador centrífugo. |
| 9) Vaso de decantación. | 19) Cuadro eléctrico de distribución. |
| 10) Bomba de recirculación. | 20) Cóclea de las cáscaras y desechos. |

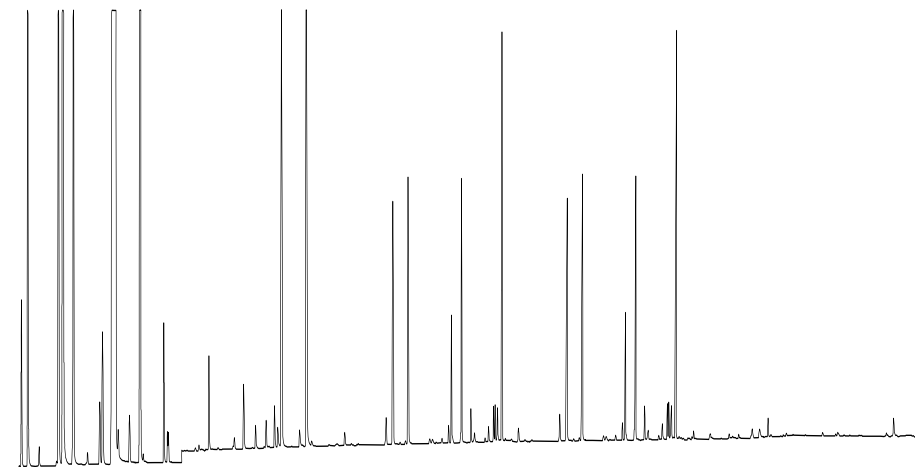


Figura III. Perfil cromatográfico de un aceite esencial de limón en ov101.

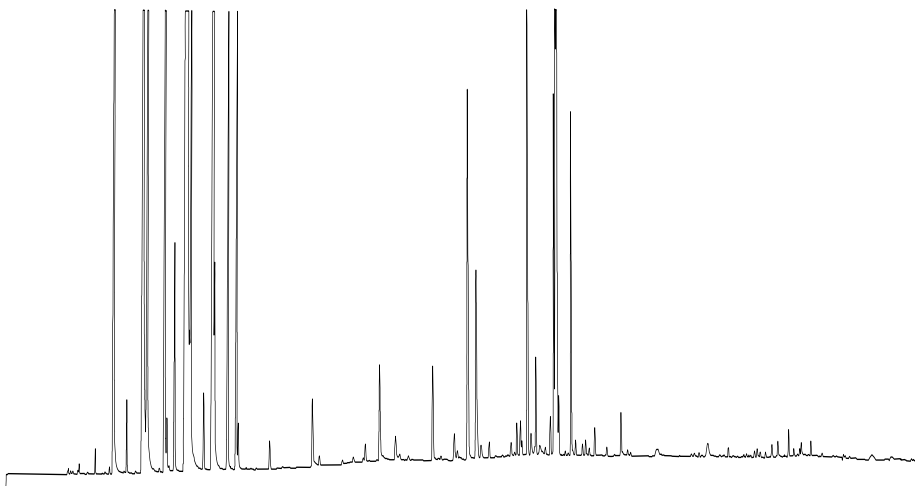


Figura IV. Perfil cromatográfico de un aceite esencial de limón en CPWax

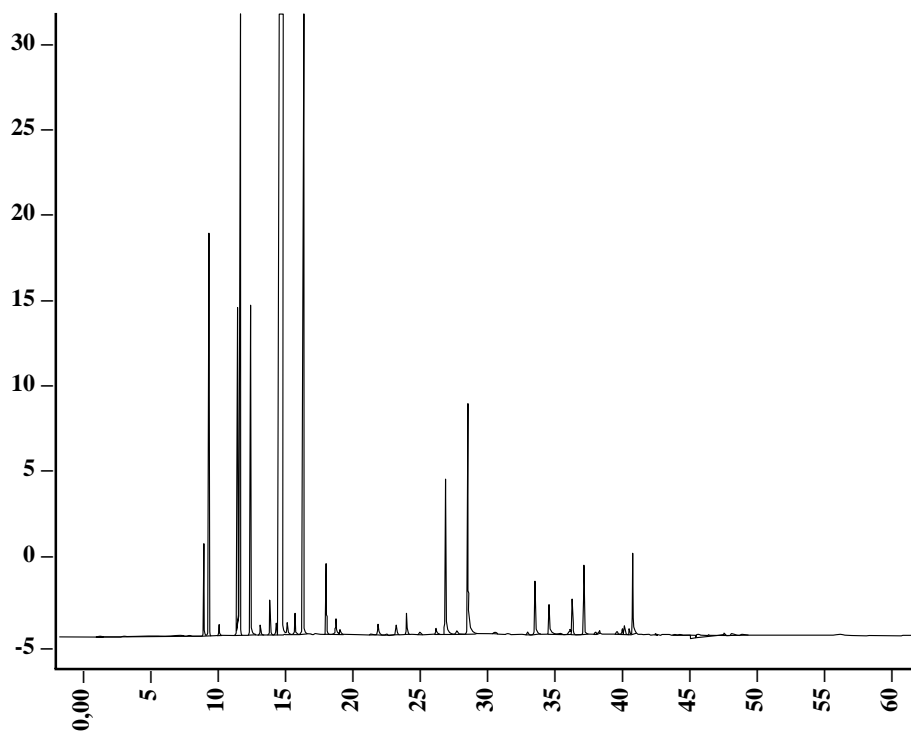


Figura V. Perfil cromatográfico de un aceite esencial de limón en HP5.

ANEXO I

**APORTACIÓN AL PROYECTO DE MONOGRAFÍA
DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN ESPAÑOL
[*Citrus limon* (L.) Burm. f.] OBTENIDO POR EXPRESIÓN**

1. Ambito de aplicación:

Esta norma especifica ciertas características del aceite esencial de limón, de España, obtenido por expresión, en vistas a facilitar la certificación de su calidad.

2. Referencias:

I.S.O./R 210:1961- *Aceites Esenciales*. Envasado

I.S.O./R 211:1961- *Aceites Esenciales*. Etiquetado

I.S.O. 212: *Aceites Esenciales*. Toma de muestras.

I.S.O. 279: *Aceites Esenciales*. Determinación de la densidad relativa a 20°.

I.S.O. 280: *Aceites Esenciales*. Determinación del índice de refracción.

I.S.O. 592: *Aceites Esenciales*. Determinación de la rotación óptica

I.S.O. 1279: *Aceites Esenciales*. Determinación del contenido en compuestos carbonílicos. Método de la Hidroxilamina libre.

I.S.O. 4715: *Aceites Esenciales*. Evaluación cuantitativa del residuo de evaporación.

I.S.O. 4735: *Aceites Esenciales de cítricos*. Determinación del valor CD mediante espectrofotometría ultravioleta.

3. Definición:

Aceite esencial de limón de España, obtenido por expresión: es el aceite extraído, sin calentar, mediante tratamiento mecánico, del pericarpio fresco del fruto de *Citrus limon* (L.) Burm. f., cultivado en España.

4. Características:

4.1. Aspecto:

Líquido transparente, que puede enturbiarse cuando disminuye la temperatura.

4.2. Color:

De amarillo pálido a verde amarillento.

CIE $L^*a^*b^*$ -(sólo información).

L^* : valores comprendidos entre 31 y $35 \pm 0,1$.

a^* : valores comprendidos entre $-1'02$ y $0'26$.

b^* : valores comprendidos entre $0'09$ y $3'64$.

4.3. Olor:

Característico del pericarpio fresco de limón.

4.4. Densidad relativa d (20/20 °C):

Mínimo: $0'842$

Máximo: $0'855$

4.5. Índice de refracción a 20 °C:

Mínimo: $1'472$

Máximo: $1'476$

4.6. Rotación óptica a 20 °C:

Comprendida entre $+56$ y $+62^\circ$

4.7. Residuo de evaporación:

Mínimo: $1'7\%$

Máximo: $3'0\%$

4.8. Índice de Carbonilo expresado como porcentaje de citral:

Mínimo: $1'70\%$

Máximo: $4'07\%$

4.9. Valor CD:

Mínimo: $0'332$

Máximo: $0'668$

Dilución de $0'25g$ de aceite esencial en $100mL$ de etanol $95\%(v/v)$.

4.10. Composición porcentual de componentes individuales de la fracción volátil del aceite esencial mediante cromatografía de gases.

Componente	% min.	% max.
triciclono	0'005	0'010
α -tuyeno	0'390	0'560
α -pineno	1'740	2'430
canfeno	0'040	0'170
metil-heptenona	0'003	0'030
sabineno	0'870	2'380
Δ^3 -careno	tr	0'010
β -pineno	8'300	15'760
octanal	0'030	0'150
β -mirceno	1'140	2'050
α -felandreno	0'016	0'080
<i>β-felandreno</i>	0'004	0'030
α -terpineno	0'130	0'400
p-cimeno	0'030	0'500
limoneno	56'280	68'800
<i>cis</i> - β -ocimeno	tr	
cineol-1,8	tr	0'029
<i>trans</i> - β -ocimeno	0'010	0'150
γ -terpineno	7'370	12'090
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	tr	0'009
octanol	0'006	0'070
tepinoleno	0'290	0'630
<i>cis</i> -hidrato de sabineno	tr	0'010
linalol	0'070	0'190
nonanal	0'053	0'110
<i>cis</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>trans</i> -óxido de limoneno	tr	tr
<i>alcanfor</i>	tr	0'010
citronelal	0'070	0'190
borneol	0'005	0'030
terpinen-4-ol	0'007	0'120
α -terpineol	0'070	0'300
decanal	0'020	0'110
acetato de octilo	0'007	0'040
nerol	0'004	0'090
citronelol	0'004	0'150
neral	0'390	1'580

4.10. Composición porcentual de componentes individuales de la fracción volátil del aceite esencial mediante cromatografía de gases (continuación).

Componente	% min.	% max.
piperitona	tr	0'010
geraniol	0'005	0'160
acetato de linalilo	0'028	0'120
acetato de nonilo	tr	0'001
geranial	0'670	2'780
perillilaldehído	0'005	0'018
<i>acetato de bornilo</i>	0'004	0'050
undecanal	0'020	0'080
geranoato de metilo	tr	0'070
acetato de citronelilo	0'026	0'090
acetato de nerilo	0'330	0'820
<i>α-copaeno</i>	tr	0'010
acetato de geranilo	0'306	0'820
dodecanal	0'004	0'080
acetato de decilo	0'003	0'019
<i>antranilato de etilo</i>	tr	0'040
β-cariofileno	0'160	0'680
bergamoteno	0'330	0'900
<i>γ-cadineno</i>	tr	tr
α-humuleno	0'010	0'080
<i>cis-β-farneseno</i>	+	+
+ β-santaleno	0'020	0'030
γ-muroleno	tr	0'004
germacreno D	0'003	0'060
valenceno	0'020	0'150
tridecanal	0'040	0'090
β-bisaboleno	0'390	0'950
<i>γ-elemeno</i>	0'002	0'060
<i>espatulenol</i>	0'008	0'020
tetradecanal	0'008	0'030
2,3-dimetil-3(4metil-3-pentenil)2-norbornanol	0'003	0'050
canferenol	0'010	0'400
α-bisabolol	0'010	0'110
<i>cis-carveol</i>	tr	tr
<i>trans-carveol</i>	tr	tr
<i>nerolidol</i>	tr	0'018
nootkatona	0'010	0'060

(+) *eluyen juntos*

ABREVIATURAS

Abs.	Absorbancia
AENOR	Asociación Española de Normalización
AFNOR	Asotiation Française de Normalisation
°C	grado Celsius
C.L.A.M.	Commite de Lieson d'Agromiculture Mediterranee
Carbowax	® Union Carbide Corp.
cm³	centímetros cúbicos
FCC	Food Chemical Codex
FID	Flame Ionisation Detector
g	gramo
GC	Gas Chromatography
GLC	Gas Liquid Chromatography
Ha	Hectáreas
HP	® Hewlett Packard
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ISO	International Standard Organization
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
min	minuto
mL	mililitro
µL	microlitro
mm	milímetro
mrads	miliradianes
MS	Espectrometría de masas
N	Normal
nm	nanómetro
OV	® Ohio Valley
pp	página
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
ppt	partes por trillón
Tm	Toneladas métricas
UV	Ultravioleta
v/v	volumen/volumen
WCOT	Columna capilar de pared recubierta "wall coated open tubular"

BIBLIOGRAFÍA

-
- AENOR. UNE 153. 1984. Aceites esenciales. Determinación de la miscibilidad en etanol.
- AENOR. UNE 159. 1984. Aceites esenciales. Determinación del poder rotatorio.
- AENOR. UNE 225. 1984. Aceites esenciales. Cromatografía en fase gaseosa. Método general para columnas capilares.
- AENOR. PROPUESTA UNE 84-402. 1992. Aceites esenciales. Determinación de la densidad absoluta y la densidad relativa.
- AFNOR. NFT 75-112. 1977. Détermination de l'indice de réfraction.
- AFNOR. NFT 75-113. 1982. Détermination du pouvoir rotatoire.
- ALBALADEJO, Q. 1999. El aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por organismos internacionales. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- ATTAWAY, J.A.; PIERINGER, A.P. y BARABAS, L.J. 1967. The origin of citrus flavor components. III. A study of the percentage of variations in peel and leaf oil terpenes during one season. *Phytochemistry* 6, 25-32.
- BUSHMAN, R.C. y HOLBROOCK, F.K. 1978. Apparatus for extracting oil from the rind of whole citrus fruits. U.S. Patent Number 4.070.959. Jan.31.
- CALVARANO, I.; FERLAZZO, A. y DI GIACOMO, A. 1979. Sulla composizione cumarinica e furocumarinica dell'essenza di bergamotto. *Essenze-Deriv. Agrum.* 59, 407.
- CALVARANO, M.; CALVARANO, I. y DI GIACOMO, A. 1988. Caratteristiche e composizione dell'essenza di limone prodotta industrialmente in Italia da frutti "invernali". *Essenze Deriv. Agrum.* Anno LVIII. Oct-Dic n° 4.

- CARTER, B.A. 1993. Lemon and Lime juices. In Fruit Juice Processing Technology. Nagy, Chen & Shaw Editors. Ag. Science, Inc. Auburndale, Fl.
- CARTONI, G.P.; GORETTI, G.; MONTICELLI, B. y RUSSO, M.V. 1986. Evaluation of capillary gas chromatographic columns in series. Analytical application to lemon oil. *J. Chromatog.* 370, 93-101.
- CHAMBLEE, T.; CLARCK, C.Jr.; BREWSTER, G.; RADFORD, T. y IACOBUCCI, G. 1991. Quantitative analysis of the volatile constituents of lemon peel oil. Effects of silica gel chromatography on the composition of its hydrocarbon and oxygenated fractions. *J. Agric. Food Chem.* 39, 162-169.
- C.L.A.M. Sezione Italiana. 1985. L'innovazione tecnologica e gestionale per la competitività dell'agromicoltura italiana. *Ess. Deriv. Agrum.* L, 165.
- COLL, L. 1992. Posibilidades de tratamiento enzimático en la recuperación industrial del aceite esencial de limón. Tesis de Licenciatura. Murcia
- COLL, L.; SAURA, D.; RUIZ, M.P.; ROS, J.M.; CANOVAS, J.A. y LAENCINA, J. 1995. Viscosimetric control in the enzymatic extraction of citrus peel oils. *Food Control*, Vol.6.Nº3 143-146.
- COMMISSION DE NORMALISATION DU SYNDICAT NATIONAL DES FABRICANTS ET IMPORTATEURS D'HUILES ESSENTIELLES ET PRODUITS AROMATIQUES NATURELS DE GRASSE. 1959. Méthodes d'analyse et constantes analytiques des huiles essentielles. XII ed.
- CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, AGUA Y MEDIO AMBIENTE DE LA REGIÓN DE MURCIA. 2001. Estadística Agraria de Murcia.
- COTRONEO, A.; DUGO, G.; LICANDRO, G.; RAGONESE, C. y DI GIACOMO, G. 1986. On the genuineness of citrus essential oils. Part. XII. Characteristics of Sicilian lemon oil produced with the FMC extractor. *Flavour and Fragrance Journal*, 1, 125-134.
- COTRONEO, A.; VERZERA, A.; LAMONICA, G.; DUGO, G. y LICANDRO, G. 1986. On the genuineness of citrus essential oils. Part.X. Research on the composition of essential oils produced from sicilian lemons using "pelatrice" and "sfumatrice" extractors during the entire 1983/1984 production season. *Flavour & Fragrance Journal*, 1, 69-86.

-
- DI GIACOMO, A. y MINCIONE, B. 1994. Gli olii essenziali agrumari in Italia. Sottoprogetto 4, monografia raisa n°3. Laruffa Editore.
- DROUET, S. 1982. Contribution a l'étude d'une huile essentielle de citron de Côte d'Ivoire et au controle des medicaments aromatisés au citron. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur. Nantes.
- FLEISHER, A.; BIZA, G.; SECORD, N. y DONO, J. 1987. UltraTtech Citrus concentrates. A new series of deterpenified citrus oils. *Perfum. Flav.*, 12(2)57-61.
- FOOD CHEMICAL CODEX. 1981. National Academic Press. Washington, D. C. 3rd Ed.
- FMC. 1980. The FMC oil recovery system. *Tech. Bull.*
- HANNEGUELLE, S.; THIBAUT, J.; NAULET, N. y MARTIN, G. 1992. Authentication of essential oils containing linalool and linalyl acetate by isotopic methods. *J. Agric. Food Chem.* 40,81-87.
- IFRA (International Fragrance Association). 1991. Code of Practice: Lemon oil cold pressed.
- IKEDA, R.M.; ROLLE, L.A.; VANNIER, S.H. y STANLEY, W. 1962 a. Lemon oil composition. Isolation and identification of aldehydes in cold-pressed Lemon oil. *J. Agric. Food Chem.* 10, 98-102.
- INTERCITRUS (Interprofesional Citrícola Española). 2001. Balance de Cosechas y Datos de Comercialización.
- ISO 1.242: Huiles essentielles. 1973. Détermination de l'indice d'acide.
- ISO 280: Huiles essentielles. 1976. Détermination de l'indice de réfraction.
- ISO 4.096: Huiles essentielles. 1978. Evaluation de la teneur en alcools libres par détermination de l'indice d'ester après formylation a froid.
- ISO 4.715: Essential oils. 1978. Quantitative evaluation of residue on evaporation.
- ISO 709: Huiles essentielles. 1980. Détermination de l'indice d'ester.
- ISO 4.735: Huiles essentielles. 1981. Détermination de la valeur CD par analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet.

- ISO 279: Essential oils. 1981. Determination of relative density at 20°C.
- ISO 592: Huiles essentielles. 1981. Détermination du pouvoir rotatoire.
- ISO 855: Essential oils. 1981. Oil of lemon Italy obtained by expression.
- ISO 875: Huiles essentielles. 1981. Evaluation de la miscibilité à l'éthanol.
- ISO 1.279: Huiles essentielles. 1984. Détermination de l'indice de carbone- Méthode au chlorure d'hydroxylammonium.
- ISO 7.609: Huiles essentielles. 1985. Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Méthode générale.
- ISO 8.432: Huiles essentielles. 1987. Analyse par chromatographie liquide sous pression. Méthode générale.
- ISO 8.899: Essential oils. 1991. Oil of lemon petitgrain [*Citrus limon* (Linnaeus) N.L. Burman].
- KERN, A.B. 1996. Citrus oil flavor derivatives: A Retrospective. International Conference on Aromas and Essential Oils. IFEAT. Israel 13-17 Octobre.
- KESTERSON, J.W.; HENDRICKSON, R. y BRADDOCK, R.J. 1979. Brown oil extractor. *Perfumer & Flavorist*. 4(4), 9.
- KESTERSON, J.W.; HENDRICKSON, R. y BRADDOCK, R.J. 1971. Florida Citrus Oil. *Fla.Agric.Exp.Stn. Bull.* 749. December.
- LAENCINA, J. 1969. Estudio del aceite esencial de limón. Tesis Doctoral. Murcia.
- LAENCINA, J. 1970. El limón Murciano. Premio Hermandad Sindical de Murcia.
- LAENCINA, J. y CARPENA, O. 1974. Perspectivas de la transformación industrial del limón español. *Rev. Las Ciencias*, XXXIX (1), 40-49.
- LAENCINA, J.; GUZMÁN, G. y CANO, J. 1979. Coumarins dans l'essence de citron espagnol. Journées Internationales d' Étude. Groupe Polyphénols. Logroño.
- LAENCINA, J.; CALVARANO, M. y MICALI, G. 1980. El aceite esencial de Limón Verna. *Ess. Deriv. Agrum.*, L (4), 311-323.

- LAENCINA, J. 1983. Derivados de la transformación industrial del limón y sus aplicaciones. Simposio Alfa Laval de Zumos, Cremogenados y Mermeladas. Murcia.
- LIBERTI, A.; CARPENA, O.; LAENCINA, J. y GORETTI, G. 1973. Estudio de las características del aceite esencial de limón español. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia -Valencia.
- MELENDRERAS, F.A.; LAENCINA, J.; ORTUÑO, A., y GUZMÁN, G. 1986. Content of essential oil during the growth and development of Verna lemon fruits. *An. Edafol. Agrobiol.* 45, 797-816.
- PINO, J.; SÁNCHEZ, M. y RONCAL, E. 1993. Preparation and chemical composition of lemon oil concentrates. *Die Nahrung* 37, 3, 277-279.
- RIGANENSIS, M.D. 1955. L'analisi spettrofotometrica nella valutazione della qualità dell'essenza di limone. *Essenze-Deriv.Agrum.*, 25, 156.
- RODANO, C. 1930. Industria e Comercio dei derivati agrumari. Ed. Ulrico Hoepli. Milano.
- SAFINA, G. 1971. Los derivados de los cítricos. Ed. Nacional Financiera, S.A. Mexico, D.F.
- SAFINA, G. 1984. I derivati Agrumari. *Staz.Sper.Ind.Conserve.* Parma.
- SHAW, P.E. 1979. Review of Quantitative Analyses of Citrus Essential Oils. *J.Agric. Food Chem.*, vol.27, nº2, 246-257.
- SERGI, G.; CALAPAY, R. y BRUNO, E. 1968. Indagine sulle sofisticazioni delle essenze di limone. *Ann. Fac. Econ. Comm. Univ. Messina*, 6, 101.
- SINCLAIR, W.B. 1984. *The Lemon.* Univ. of Calif. Press, Oakland.
- STANLEY, W.L.; LINDWALL, R.C. y VANNIER, S.H. 1958. Specific quantitative colorimetric method of analysis for citral in lemon oil. *Agric. and Food Chem.* 6(11), 858-860.
- STAROSCIK, J.A. y WILSON, A.A. 1982. Quantitative analysis of compressed lemon oil by glass capillary gas chromatography. *J.Agric. Food Chem.*30, 507-509.
- SWISHER, H.E. y SWISHER, L.H. 1980. *Lemon and Lime juices in Fruit and Vegetable juice Processing Technology*, 3rd Edition. Nelson & Tressler (Editors). AVI Publishing Co., Westport, CT.

USP XX. 1980. Lemon Oil. p.1233-1234.

YOKOHAMA, F.; LEVI, L.; LAUGHTON, P.M. y STANLEY, W.L. 1961.
Determination of citral in citrus extracts and citrus oils by conventional and modern chemical methods and analysis. J.A.O.A.C. 44(3), 535-541.