© 2017 Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 5 (6), 335-344, 2017
ISSN 0719-4250
http://jppres.com/jppres

Original Article | Artículo Original

Compuestos aromáticamente activos del aceite esencial de *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí detectados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa y cromatografía gaseosa-olfatometría

[Odour-active compounds of *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí essential oils detected by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry]

Manuel A. Minteguiaga, Caren D. Frizzo, Eduardo S. Dellacassa*

Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay.
*E-mail: edellac@fq.edu.uy

Abstract

Context: Mandarins are a complex taxonomic group including different species, cultivars and hybrids growing around the world being fruits greatly appreciated by the consumers. *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí originates from Rio Grande do Sul State (Brazil) and the fruit is characterised by its pleasant properties, especially its aroma.

Aims: To evaluate the *C. deliciosa* cold-pressed essential oils, classified as "green", "yellow" and "red" according to fruit maturity, and the one produced by distillation by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O).

Methods: The essential oils aromatic quality was evaluated by GC-O through a panel of trained judges. The identification of the volatile compounds was performed by GC-MS and their quantification by GC-FID.

Results: The chemical composition of the three types of cold-pressed essential oils was very similar. However, the distilled oil presented a higher concentration of oxygenated monoterpenes (mainly α-terpineol, 4-terpineol and sabinene hydrates). Herbaceous and floral aromatic notes were able to describe the "green" oil, while for the distilled oil wood and unpleasant notes were perceived.

Conclusions: The cold-pressed oils did not show nor chemical, or aromatic differences, by the fruit maturity. The distilled oil was characterized by aromatic nuances making the oil less appreciated (inferior quality) than the cold-pressed oil. Probably as consequence of artifacts formation during the distillation process.

Keywords: *Citrus deliciosa* var. Caí; commercial essential oils; gas chromatography flame ionization detector; gas chromatography mass spectrometry; gas chromatography olfactometry.

Resumen

Contexto: Las mandarinas son un grupo taxonómico complejo en el que existen diferentes especies, cultivares e híbridos que se cultivan alrededor del mundo con gran aceptación por parte de los consumidores. La variedad Caí de *Citrus deliciosa* Tenore es originaria del estado de Rio Grande do Sul (Brasil) donde se produce fruta con características agradables, especialmente su aroma.

Objetivos: Evaluar por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) y cromatografía gaseosa-olfatometría (GC-O) el aceite esencial exprimido (AEE) clasificado como "verde (fruta inmadura)", "amarillo (fruta madura)" y "rojo (fruta sobremadurada)" según la madurez de la fruta, y el obtenido por destilación (AED) de cáscaras de *C. deliciosa* Tenore var. Caí.

Métodos: La calidad aromática fue evaluada por GC-O mediante un panel de jueces entrenados. La identificación de los compuestos volátiles de los aceites se realizó por GC-MS y la cuantificación de los mismos por GC-FID.

Resultados: La composición química de los tres AEEs fue muy similar cualitativa y cuantitativamente, pero en el AED se determinó una mayor concentración de monoterpenos oxigenados (principalmente α-terpineol, 4-terpineol e hidratos de sabineno). El AE "verde" presentó notas aromáticas herbáceas y florales, mientras que en el AED se percibieron notas de madera y desagradables.

Conclusiones: El aroma del AED es de inferior calidad a los AEEs, lo que puede deberse a la posible formación de artefactos durante el proceso de destilación.

Palabras Clave: aceites esenciales comerciales; *Citrus deliciosa* var. Caí; cromatografía gaseosa detector de ionización de llama; cromatografía gaseosa espectrometría de masa; cromatografía gaseosa olfatometría.

ARTICLE INFO
Received | Recibido: May 9, 2017.
Received in revised form | Recibido en forma corregida: July 31, 2017.
Accepted | Aceptado: August 16, 2017.
Available Online | Publicado en Línea: August 29, 2017.
Declaration of interests | Declaración de Intereses: The authors declare no conflict of interest.
Funding | Financiación: This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, POS_NAC_2013_1_11316), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelaR, CSIC-Programa de Iniciación a la Investigación-Modalidad 1. Área Tecnológica. Proyecto n° 1004), Uruguay.
Academic Editor | Editor Académico: Gabino Garrido.

INTRODUCCIÓN

Las mandarinas (*Citrus sp.*, Rutaceae) son un grupo taxonómicamente muy complejo y fenotípicamente heterogéneo, que incluye varias especies y una gran diversidad de cultivares e híbridos originados de manera natural y artificial, los cuales muchas veces generan confusión en cuanto a su nomenclatura (Tanaka, 1969; Ortíz, 2002). Las especies que mayormente son cultivadas en el mundo incluyen a *Citrus unshiu* ("Satsumas"), *C. clementina* ("Clementinas"), *C. tangerina* ("Tangerinas"), *C. deliciosa* ("Mandarina Mediterránea"), *C. reticulata* ("Mandarinas comunes"), *C. nobilis* ("Mandarinas King") y *C. temple*, entre otras de menor importancia (Tanaka, 1969; Ortíz, 2002). En general son frutas muy apreciadas por su color, sabor dulce y aroma fragante, siendo consumidas como fruta fresca o como jugos naturales o procesados (Ting, 1980).

Brasil es el segundo país productor mundial de cítricos representando más del 15% de participación en la producción mundial por delante de países con tradición citrícola como España, Italia y Estados Unidos (FAO, 2015). Dentro de la citricultura brasileña, el estado de Rio Grande do Sul (RS) es el quinto productor del país, pero tiene gran importancia social ya que la mayor parte del cultivo se realiza en pequeños predios de agricultura familiar, bajo régimen orgánico (Frizzo et al., 2004; Valverde dos Santos et al., 2014). En el Valle del Río Caí, se cultivan principalmente mandarinas mediterráneas *C. deliciosa*, de los cultivares "Montenegrina" y "Caí", originarios del lugar pero escasamente conocidos fuera del Brasil (Rodrigues et al., 1999; Frizzo et al., 2004; Valverde dos Santos et al., 2014). Dichas frutas son ampliamente aceptadas en el mercado, debido a características organolépticas deseables como su aspecto y color, sabor dulce y agradable, facilidad de pelado, bajo número de semillas y un aroma particularmente atractivo (Rodrigues et al. 1998; Frizzo et al., 2004; Chouza et al., 2011; Polti, 2013). Es por ello que ha generado interés en la citricultura de otros países, especialmente en Uruguay, dada la proximidad geográfica (Chouza et al., 2011; Polti, 2013).

En el caso de las frutas cítricas, el aroma se debe a la presencia, en las cáscaras (exocarpos), de glándulas productoras de aceites esenciales (AEs) (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002). Los AEs cítricos son obtenidos como subproductos del procesado de las frutas, antes, durante o después de la extracción del jugo de pulpa, y son muy apreciados por sus aplicaciones en perfumería y alimentos (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002; Di Giacomo, 2002). En la industria se emplea principalmente la extracción por expresión en frío ("*cold-pressed*") y sólo marginalmente la hidrodestilación (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002), obteniéndose con la primera una composición química sumamente diversa, que incluye compuestos volátiles y no volátiles (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002; Bonaccorsi et al., 2009; Tranchida et al., 2011). Dentro de los primeros se incluyen componentes de bajo peso molecular como los terpenos, fenilpropanoides y sustancias alifáticas (aldehídos, alcoholes y ésteres), entre otros (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002; Bonaccorsi et al., 2009; Tranchida et al., 2011). La fracción no volátil es mucho más diversa e incluye esteroles, hidrocarburos y alcoholes lineales de alto peso molecular (que constituyen las ceras), polifenoles (flavonoides), psoralenos, ácidos grasos y pigmentos como clorofila y carotenos (Bonaccorsi et al., 2009; Tranchida et al., 2011; Gutiérrez Flores, 2015). Los AEs de mandarina, obtenidos por expresión en frío, se comercializan y clasifican de acuerdo a criterios comerciales como aceites "verdes", "amarillos" y "rojos" dependiendo del estado de madurez de la fruta, inmadura, madura y sobremadurada, respectivamente. Lo que hace referencia a la coloración externa que presenta la fruta en la época de colecta para su procesamiento y se presentan en el mercado como productos distintos con precios diferentes y hasta con diferentes indicaciones de uso (Dugo et al., 2011; Tranchida et al., 2011).

El análisis de los aromas en general, y de los AEs cítricos en particular, se realiza convencionalmente por cromatografía gaseosa convencional con detector de llama (GC-FID) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), aunque otras configuraciones son empleadas para caracterizar adecuadamente la calidad, el origen y la autenticidad de los mismos (Tranchida et al., 2011; Chin y Marriott, 2015). Por ejemplo, en la actualidad se cuenta con enantio-GC-MS (GC-MS con columna de separación quiral), GC-IRMS (*isotope-ratio mass spectrometry*), MDGC (*multidimensional gas chromatography*, con la segunda dimensión en general qui-

ral) y GC-O (cromatografía gaseosa acoplada a olfatometría) (Tranchida et al., 2011; Chin y Marriott, 2015). En un cromatógrafo gaseoso-olfatómetro, lo que ocurre es básicamente la separación de una mezcla compleja en sus componentes y la transferencia paralela y simultánea a un detector instrumental (por ejemplo, un detector de ionización de llama) y a un puerto olfatométrico en donde se realiza la evaluación sensorial de éstos por un panel de jueces entrenados (Grosch, 2007; Aceña Muñoz, 2011; Chin y Marriott, 2015).

La aplicación de GC-O a los AEs cítricos es amplia, demostrando su gran aplicabilidad tanto para el análisis descriptivo-deconstructivo (determinación de las notas aromáticas clave o "de impacto" en cada tipo de muestra) como para el constructivo (imitación de las características aromáticas de un producto a través de mezclas sintéticas con los compuestos de impacto aromático, también llamados compuestos aromáticamente activos) (Dharmawan et al., 2009; Tranchida et al., 2011; Chin y Marriott, 2015). Dicha aplicación de GC-O ha sido empleada tanto para evaluar aceites cítricos comerciales (Högnadóttir y Rousseff, 2003; Xiao et al., 2016) como diferentes tipos de variedades, por ejemplo *C. nobilis* var. microcarpa (Dharmawan et al., 2009), *C. sinensis* (Qiao et al., 2008), *C. reticulata* (Sawamura et al., 2004), *C. reticulata* var . Clementine (Chisholm et al., 2003) y *C. auriantum* L. var. cyathifera (Song et al., 2000), entre otros.

El objetivo de este trabajo fue aplicar GC-O a la diferenciación original de los AEs comerciales de *C. deliciosa* var. Caí obtenidos por expresión en frío y por destilación, determinando paralelamente su composición química por GC-MS y GC-FID para confirmar resultados previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación sobre dicho cultivar (Frizzo et al., 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales

Muestras comerciales de AEs de *C. deliciosa* var. Caí se obtuvieron de la empresa Bio-Citrus (Montenegro-RS, Brasil). Las muestras fueron extraídas por expresión en frío en la etapa correspondiente de madurez de la fruta: no madura (AEV), madura (AEA y sobremadurada (AER). Para propósitos comparativos también se obtuvieron muestras de AE destilado de la fruta madura. Antes de su análisis químico y olfatométrico las muestras fueron refrigeradas en su envase original a -18°C. La composición original de dicha variedad fue reportada previamente por Frizzo et al. (2004) para la fruta madura, en la que se encontró que los hidrocarburos monoterpénicos representaron el 99% de la composición del aceite esencial. En particular, los principales componentes de esta fracción fueron el limoneno, γ-terpineno, β-mirceno, α- y β-pineno. Entre los compuestos monoterpénicos oxigenados se destaca la presencia de 4-terpineol, linalol y α-terpineol. Los hidrocarburos sesquiterpénicos incluyeron β-cariofileno y (E,E)-α-farneseno como compuestos principales. El compuesto relevante en la composición del aceite esencial fue el N-metilantranilato de metilo.

Análisis por GC-FID y GC-MS

Para el análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) y cromatografía gaseosa convencional (GC-FID) se siguió el procedimiento detallado en Frizzo et al. (2004). Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14B (Tokyo, Japón) equipado con detector de ionización de llama (FID) y un software de procesamiento de datos (EZ-Chrom, Shimadzu Corp.), y un GC-MS QP 5050A (Shimadzu Europe). La identificación química de los componentes se realizó por comparación de espectros de masa con bibliotecas comerciales y por el cálculo de índices de retención lineales (IRL) en dos columnas capilares de diferente polaridad: poco polar (SE-52, Mega, Legnano, Italia) y polar (CW-20M, Mega, Legnano, Italia). La cuantificación de cada componente se realizó de acuerdo con Frizzo et al. (2004) empleando n-tetradecano (Sigma Aldrich, USA) como estándar interno. La repetibilidad del sistema de medida mostró una variación menor al 5% para todos los componentes reportados en la Tabla 1.

Análisis por GC-O

Para ello se empleó un cromatógrafo Shimadzu GC-14B (Tokyo, Japón) acoplado a un puerto olfatométrico ODO-1 (SGE, Ringwood, Australia). La interfase fue mantenida a 250°C durante todos los experimentos, empleando nitrógeno como gas auxiliar (*make-up*) (5 mL/min). El detector olfatométri-

co se equipó con un dispositivo humidificante para reducir la deshidratación y para prevenir irritación térmica de la mucosa nasal. La columna capilar separativa fue una CW-20M (Mega, Legnano, Italia; 30 m x 0,32 mm d.i. x 0,32 µm espesor de fase). El programa de temperaturas empleado fue el siguiente: 40°C (5 min), 40-100°C (4°C/min), 100-136°C (6°C/min), 136–220°C (3°C/min), 220°C (10 min). La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C en todos los análisis. Volumen de inyección: 0,2 µL de AE puro. Split, 20:1. El gas portador empleado fue nitrógeno (1 mL/min).

Un panel de cinco jueces sensoriales (panel sensorial del vino de la Facultad de Química-UdelaR) realizaron las evaluaciones durante 60 minutos, realizando cada uno de ellos una evaluación diaria. A los panelistas se les pidió clasificar la intensidad del aroma que percibían usando una escala de 4 puntos (0 = no detectado; 1 = olor débil, apenas reconocible; 2 = olor claro, pero no intenso y 3 = aroma intenso). En dicha escala también se permitieron valores medios. Los odorantes que fueron tomados en cuenta fueron aquellos detectados por al menos tres miembros del panel.

Para el procesamiento de datos se empleó la metodología de frecuencia de detección modificada (FM), que se basa en el cálculo del siguiente parámetro (Xavier et al., 2013): FM (%) = [F (%) x I (%)] ½.

En donde, F (%) fue la frecuencia de detección de un atributo aromático expresada como porcentaje mientras que I (%) fue la intensidad promedio expresada como porcentaje de la intensidad máxima. Los odorantes que fueron considerados fueron aquellos cuyos valores de FM fueron superiores a 40% (Xavier et al., 2013). Para la asignación de la identidad de los odorantes en GC-O se compararon los IRLs con los obtenidos en GC-FID y GC-MS para las mismas muestras.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de compuestos principales (PCA). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistica 7.0 software (StatSoft, Inc., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presenta la composición de los AEs de *C. deliciosa* var. Caí para cada uno de los estados de maduración de la fruta, así como los descriptores aromáticos asociados a cada uno de los compuestos obtenidos por GC-O. En la Fig. 1A se presenta la distribución de las diferentes muestras de aceite esencial (Tabla 1) utilizando la modalidad de análisis de compuestos principales (PCA) (Statistica 7.0, StatSoft, Inc.). La distribución gráfica muestra que el aceite esencial, obtenido por expresión de frutas no maduras (AEV), puede ser discriminado, por su composición química, de los aceites provenientes de frutas maduras (AEA) y sobremaduradas (AER). Pero, lo más importante, el aceite obtenido de frutas no maduras (AEV) se posiciona en el cuadrante opuesto al aceite obtenido por destilación (AED), lo que implica que el aceite esencial que mejor representa los atributos de un aceite, apreciado como más cercano al aroma de la fruta fresca, es el obtenido a partir de la expresión de frutas inmaduras (AEV). En la Fig. 1B se muestran los compuestos responsables de este comportamiento discriminante. Como se puede observar, la distribución estadística propuesta representa el 81% de la distribución total. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que el aceite esencial proveniente de fruta no madura (AEV) tiene mayor preferencia comercial.

En la Fig. 2 se presenta el aromograma comparativo que diferencia las percepciones aromáticas de los AEs extraído por expresión de la fruta inmadura (aceite verde) y destilado.

En el estudio de los AEs cítricos es muy importante disponer de una adecuada caracterización del origen botánico del material vegetal, ya que existen trabajos con clasificaciones taxonómicas incorrectas denominando *C. reticulata* a la especie que en realidad es *C. deliciosa* (Bonaccorsi et al., 2009; Dugo et al., 2010). Igualmente problemático es el caso de análisis de AEs que no destacan la procedencia geográfica de la fuente vegetal (lo que influye ampliamente en la expresión metabólica de un cultivar), así como el método que se empleó para obtener el pro-

pio aceite y el estado de madurez de la fruta que le dio origen (Dugo et al., 2010). Todos estos aspectos han sido bien definidos en este estudio de manera de generar una fuente de información confiable para posibles aplicaciones y/o ulteriores investigaciones.

En la Tabla 1 se muestra la composición volátil de los cuatro AEs analizados, mostrando las notas aromáticas que se percibieron en el análisis por GC-O (cuando éstas pudieron ser asignadas a un compuesto determinado). Se identificaron un total de 40 compuestos, entre los cuales figuran monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos alifáticos (principalmente aldehídos), además de la presencia del N-metilantranilato de metilo, un compuesto nitrogenado presente en muchas variedades de mandarina que se ha reportado como compuesto de impacto aromático en mandarina junto al timol y al α-sinensal (Naef y Velluz, 2001; Schipilliti et al., 2010). Los componentes mayoritarios en todos los casos fueron los hidrocarburos monoterpénicos (en orden decreciente de concentración) limoneno, γ-terpineno, β-pineno, α-pineno y β-mirceno, lo que es común a muchos cultivares y especies de mandarina (Verzera et al., 2000; Bonaccorsi et al., 2009; Dugo et al, 2010; Tranchida et al., 2013).

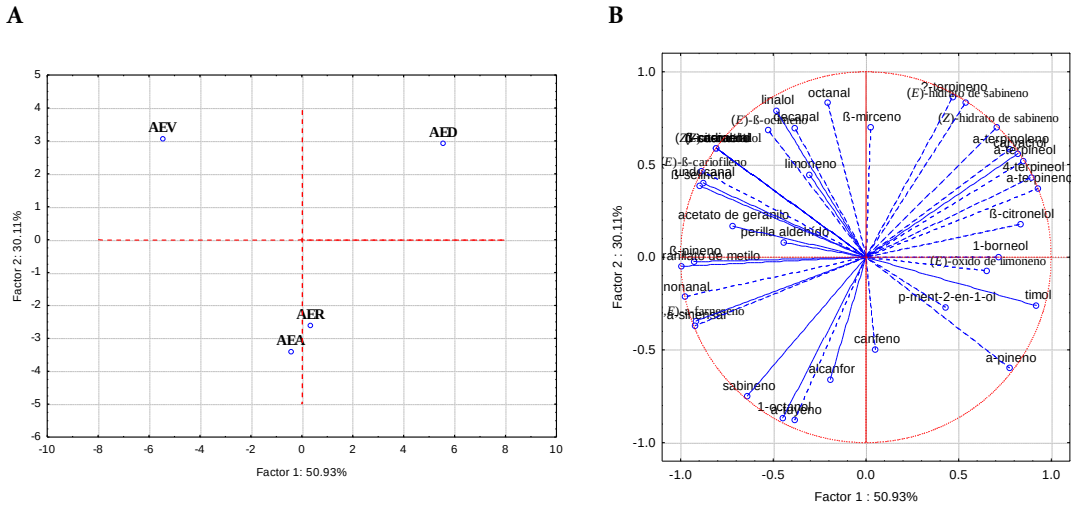

Figura 1. Representación de los aceites esenciales de *C. deliciosa* var. Caí para los diferentes estados de maduración de la fruta y el aceite destilado en el sistema de coordenadas formado por los primeros dos componentes principales.

AEV: aceite esencial verde extraído de frutas no maduras; AED: aceite destilado; AER: rojo obtenido de frutas sobremaduradas; AEA: amarillo extraído de frutas maduras.

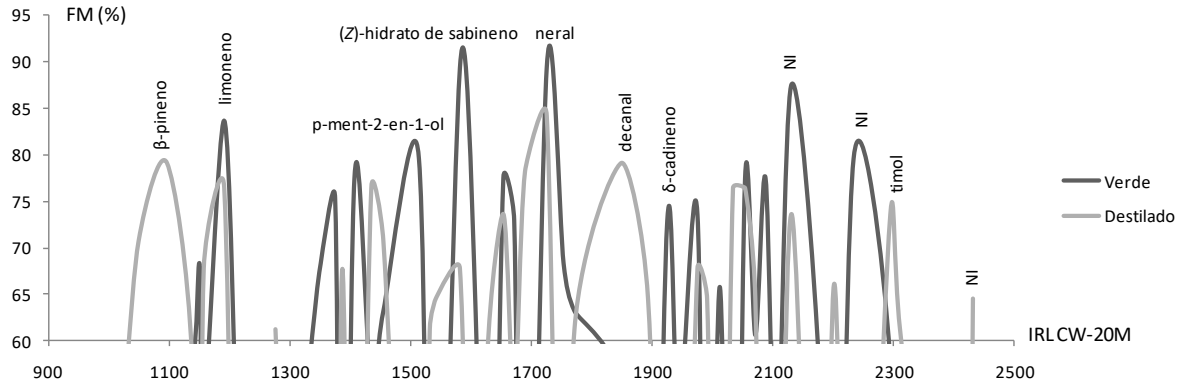

Figura 2. Aromograma comparativo obtenido por GC-O (FM > 60%) de los aceites esenciales comerciales exprimidos ("Verde") y destilados de *C. deliciosa* var. Caí.

FM: Frecuencia Modificada; IRLCW20M: Índice de Retención Lineal calculados en Carbowax 20M como fase estacionaria; NI: no identificado. Se hicieron 3 repeticiones (n = 3) para cada uno de los integrantes del panel de cinco jueces sensoriales.

Tabla 1. Composición de los aceites esenciales de *C. deliciosa* var. Caí para los estados de maduración de la fruta y descriptores aromáticos asociados a cada uno de los compuestos obtenidos por GC-O.

Compuesto	IRL[a] (SE-52)	IRL (CW-20M)	Tipo de aceite esencial				Descriptor aromático	
			AEV[b]	AEA	AER	AED	Verde	Destilado
α-tuyeno[c]	922	1013	218[d]	255	232	197	-	-
α-pineno	929	1010	626	719	697	708	-	mandarina, dulce
canfeno	943	1045	tr[e]	tr	12	tr	-	vegetal, cítrico
sabineno	949	1107	56	89	63	tr	-	-
β-pineno	972	1091	1055	917	662	526	cítrico, dulce	cítrico
β-mirceno	988	1146	589	531	584	586	plástico, goma	-
octanal	1002	1300	59	54	50	57	-	-
α-terpineno	1014	1156	112	125	134	198	químico, pino	plástico, goma
limoneno	1035	1183	24399	20505	24347	22732	cítrico, floral	cítrico, floral
(*E*)-β-ocimeno	1047	1250	11	9	10	10	-	-
γ-terpineno	1061	1228	6333	5555	5397	7350	-	-
(*Z*)-hidrato de sabineno	1067	1582	13	tr	nd	70	vegetal, floral	madera
1-octanol	1070	1274	6	10	11	tr	vegetal, dulce	floral, plástico
α-terpinoleno	1086	1254	283	257	302	377	-	-
(*E*)-hidrato de sabineno	1097	1551	25	tr	nd	64	-	-
linalol	1098	1540	69	56	50	60	-	tierra mojada
nonanal	1104	1402	13	10	10	5	especiado, tierra	-
p-ment-2-en-1-ol	1131	1506	nd	nd	13	6	vegetal, frutal	-
(*E*)-óxido de limoneno	1143	ni	tr	tr	17	13	-	-
alcanfor	1140	1483	7	7	12	5	-	-
β-citronelal	1152	1456	21	tr	tr	nd	frutal, floral	frutal, floral
1-borneol	1163	1604	tr	tr	9	8	plástico, especiado	-
4-terpineol	1174	1683	46	66	64	180	-	cítrico, caramelo
α-terpineol	1188	1768	95	85	122	240	floral, verde	azufrado, goma
decanal	1203	1846	34	24	31	30	floral, ajo	cítrico, caramelo
β-citronelol	1226	1597	nd	nd	12	16	-	-
(Z)-ascaridol	1227	ni	16	nd	nd	nd	-	-
neral	1235	1722	7	tr	nd	nd	floral, frutal	cítrico, especiado
perilla aldehído	1271	1756	24	20	26	21	-	-
(Z)-iso-ascaridol	1291	ni	41	nd	nd	nd	-	-
timol	1291	2283	nd	42	28	53	floral, quemado	sudor, cartón
carvacrol	1295	2167	tr	tr	tr	4	especiado	-
undecanal	1303	1765	19	6	tr	tr	-	-
acetato de geranilo	1387	1530	8	tr	7	tr	-	frutal, especiado
N-metilantranilato de metilo	1404	ni	186	163	156	127	-	-

Tabla 1. Continuación...

Compuesto	IRL[a] (SE-52)	IRL (CW-20M)	Tipo de aceite esencial				Descriptor aromático	
			AEV[b]	AEA	AER	AED	Verde	Destilado
(E)-β-cariofileno	1416	1658	33	27	27	26	floral, anís	floral, menta
β-selineno	1491	1753	23	13	15	11	vegetativo, dulce	-
(E,E)-α-farneseno	1504	1743	98	83	89	43	-	-
δ-cadineno	1514	1927	7	tr	nd	nd	jazmín, dulce	-
α-sinensal	1759	ni	80	66	67	13	-	-

[a]IRL: índice de retención lineal. Los componentes están ordenados en orden creciente de elución en la fase SE-52. La identificación de cada componente se basa en la comparación de sus índices lineales de retención (LRIs) en las dos columnas con los de estándares puros o reportados en la literatura, y la comparación MS con espectros de archivos; [b]AEV: aceite esencial verde extraído de frutas no maduras; AEA: amarillo extraído de frutas maduras; AER: rojo obtenido de frutas sobremaduradas; AED: aceite destilado; [c]los compuestos se ordenan por sus índice de retención calculados en SE-52; [d]el contenido de cada componente se expresa como ng equivalentes de n-tetradecano (estándar interno), donde cada valor es el promedio de tres determinaciones. La repetibilidad del sistema de medición mostró coeficientes de variación inferiores al 5% para todos los componentes; [e]tr, trazas < 0,05% (equiv. < 5,0 ng).

Los resultados de composición del AE industrial de *C. deliciosa* var. Caí analizado en este trabajo son muy similares en lo que refiere al número de componentes identificados, pro con diferencias en contenidos con los previamente reportado para los cultivares "Caí" y "Montenegrina" (Frizzo et al. 2004), así como para "Avana" y "Tardivo di Ciaculli" (Lota et al., 2001; Naef y Velluz 2001; Bonaccorsi et al., 2009; Dugo et al., 2010), "Avana Apireno", "de Chios" y "Willow-leaf" (Lota et al., 2001). Sin embargo, otros cultivares de la misma especie pueden tener una composición química diferente (Lota et al., 2001), como consecuencia de identificaciones incorrectas o a una mayor influencia de las variables ambientales sobre el metabolismo secundario de las plantas (Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

El contenido de 4-terpineol, α-terpineol e hidratos de sabineno es mayor en el AE destilado que en cualquiera de los AEs obtenidos por expresión, hecho que podría deberse a la interconversión de limoneno en esos componentes en las condiciones húmedas y de temperatura que se dan durante la destilación (Di Giacomo y Di Giacomo, 2002). Debido a ello habría formación de dichos alcoholes monoterpénicos como artefactos de destilación, lo que se sumaría al aporte original de la fuente vegetal y podrían alterar las características aromáticas (Tranchida et al., 2011). Únicamente en el caso del AE "Verde" se detectaron los compuestos hidroperóxidos (*Z*)-ascaridol y (*Z*)-isoascaridol, lo que es muy interesante ya que en los reportes previos de composición de AE de *C. deliciosa* no se han detectado ni cuantificado dichos compuestos (Lota et al., 2001; Naef y Velluz 2001; Frizzo et al., 2004; Bonaccorsi et al., 2009; Dugo et al., 2011). El ascaridol es una sustancia tóxica a nivel de la cadena respiratoria (Monzote et al. 2009), siendo el constituyente mayoritario del AE del "paico" *Chenopodium ambrosioides* (Torres et al., 2003; Monzote et al., 2009), pero su ocurrencia en AEs cítricos es limitada. De hecho, Tranchida et al. (2013) reportaron la presencia al ascaridol y su isómero por primera vez mediante análisis detallado del AE de naranja dulce (*C. sinensis*) y bergamota (*C. bergamia*), mientras que Delort et al. (2015) hicieron lo propio para el AE de la lima "dedo" *C. australasica*.

Tranchida et al. (2011) reportan que los AE cítricos destilados tienen un perfil aromático diferencial respecto a los AE extraídos por expresión, teniendo más notas aromáticas a pino y siendo menos fragantes. Dichas afirmaciones fueron corroboradas en este estudio como se puede ver en la Tabla 1 y en la Fig. 2, en que se muestra el aromograma para el AE de fruta inmadura (aceite verde) y destilado (AED). Para el AE de fruta inmadura de expresión fueron determinadas 36 notas aromáticas (valores de frecuencia modificada de detección superior al 40%), de las cuales sólo 18 pudieron ser asignadas a un componente específico. En el caso del aceite esencial destilado, se detectaron 33 notas aromáticas típicas de las que sólo se pudieron identificar 16 con su compuesto responsable. Lo anterior demuestra la utilidad de la técnica GC-O para detectar compuestos aromáticos que los detectores instrumentales no lo hacen por estar a muy bajas concentraciones,

siendo por lo tanto de gran utilidad para el control de calidad y evaluación de adulteraciones (Tranchida et al. 2011).

En la Tabla 1 se puede observar que mucho de los compuestos determinados presentaron notas aromáticas diferenciales respecto a cuál haya sido el método de extracción empleado para el AE, lo que se debe a diferencias de concentración y a las características propias del método (Tranchida et al. 2011). Sin embargo, en ambos casos proliferan las notas cítricas, y en el AE "Verde" como sería de esperar, se aprecian mayor cantidad de notas aromáticas vegetales y florales. El AE destilado por su parte, presenta notas de madera y algunas desagradables como "quemado", "goma", "plástico" y "transpiración". Además, como se puede apreciar en la Fig. 2, los atributos aromáticos en el AE "Verde" fueron más intensos (mayores valores de frecuencia modificada de detección). Todo lo anterior demuestra sin lugar a dudas que el AE obtenido por expresión es de mejor cualidad aromática que el destilado, aspecto que lo hace de preferencia para la industria de aromas y fragancias (Dugo et al. 2011).

En la Fig. 2 se observa que el aromograma obtenido es ampliamente discriminatorio entre los AE "Verde" y destilado. En la comparación de los perfiles de aroma de los dos AEs se puede observar que hay compuestos como el β-pineno, p-ment-2-en-1-ol, decanal y timol que se destacan fuertemente en uno de los AEs y no en el otro. Compuestos como el limoneno, neral y (*Z*)-hidrato de sabineno podrían aportar mucho al carácter cítrico-floral del AE de mandarina independientemente del período de colecta o el método de extracción empleado. Es de destacar que en este estudio no se percibieron aromáticamente el N-metilantranilato de metilo ni el α-sinensal a pesar de ser ampliamente asociados con el típico aroma a mandarina (Naef y Velluz, 2001).

En el análisis comparativo con otros estudios de aceites esenciales cítricos por GC-O presentes en la literatura, se puede concluir que se percibieron olfativamente los mismos compuestos: hidrocarburos monoterpenos (α-pinene, β-pineno, mirceno, limoneno), monoterpenos oxigenados (linalool, citronelal) y aldehídos alifáticos (hexanal, octanal, nonanal, decanal y dodecanal), los que imprimirían el carácter "cítrico" (Högnadóttir y Rousseff, 2003; Qiao et al., 2008; Dharmawan et al., 2009; Xiao et al., 2016). Sin embargo, en cada uno de los estudios se observan compuestos de impacto aromático que darían el carácter típico a la variedad cítrica que se está analizando. Lo anterior realza la importancia de la aplicación de la olfatometría como herramienta de evaluación de calidad y genuinidad de aceites esenciales cítricos.

CONCLUSIONES

La composición de los diferentes AEs industriales de *C. deliciosa* var. Caí es dependiente de las condiciones de extracción, así como de la época de recolección de la fruta para su procesamiento. Esta composición química es cualitativamente muy similar, con sólo mínimas diferencias perceptibles a nivel cuantitativo. Los AEs destilados, en general, aumentan su proporción en monoterpenos oxigenados (α-terpineol, 4-terpineol e hidratos de sabineno) que se podrían originar como consecuencia del proceso (artefactos), mientras que en los AE extraídos se pueden apreciar compuestos que no se encuentran en el AE destilado como es el caso del (*Z*)-ascaridol y (*Z*)-isoascaridol. Los análisis de composición que se presentan en este trabajo son altamente consistentes con los reportes previamente publicados para diferentes cultivares de *C. deliciosa* en diferentes regiones. Sin embargo, a pesar de la similitud química entre los AEs, grandes diferencias aromáticas fueron encontradas en el estudio de olfatometría, lo que demuestra la importancia de este tipo de análisis en productos de consumo humano. El AE obtenido por expresión es de mejor calidad olfativa (notas aromáticas vegetales y florales, y ausencia de notas desagradables) y más representativo del aroma de la fruta que el AE destilado.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, POS_NAC_2013_1_11316), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelaR, CSIC-Programa de Iniciación a la Investigación-Modalidad 1. Área Tecnológica. Proyecto n° 1004), Uruguay.

REFERENCIAS

Aceña Muñoz L (2011) Aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría en la caracterización del aroma del vinagre de vino, de los pistachos y del aceite de oliva [Tesis de Doctorado]. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili.

Bonaccorsi I, Dugo P, Trozzi A, Cotroneo A, Dugo G (2009) Characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. Determination of volatile, non-volatiles, physico-chemical indices and enantiomeric ratios. Nat Prod Comm 4: 1595–1600.

Chin ST, Marriott PJ (2015) Review of the role and methodology of high resolution approaches in aroma analysis. Anal Chim Acta 854: 1–12.

Chisholm MG, Jell JA, Cass Jr DM (2003) Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. clementine using gas chromatography-olfactometry. Flavour Fragr J 18: 275–281.

Chouza X, Gravina A, Borges, A (2011) Control de la autopolinización, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en mandarina "Montenegrina". Agrociencia Uruguay 15: 27–36.

Delort E, Jaquier A, Decorzant E, Chapuis C, Casilli A, Frérot E (2015) Comparative analysis of three Australian finger limes (*Citrus australasica*) cultivars: identification of unique citrus chemotype and new volatile molecules. Phytochemistry 109: 111–124.

Dharmawan J, Kasapis S, Sriramula P, Lear MJ, Curran P (2009) Evaluation of aroma-active compounds in pontianak orange peel oil (*Citrus nobilis* Lour. Var. microcarpa Hassk.) by gas chromatography-olfactometry, aroma reconstitution, and omission test. J Agric Food Chem 57: 239–244.

Di Giacomo A (2002) Flowsheet showing steps in the processing of citrus fruits. In: Dugo G, Di Giacomo A (eds), *Citrus*. Londres: Taylor and Francis, pp 68–76.

Di Giacomo A, Di Giacomo G (2002) Essential oil production. In: Dugo G, Di Giacomo A (eds), *Citrus*. Londres: Taylor and Francis, pp. 110–152.

Dugo P, Bonaccorsi I, Ragonese C, Russo M, Donato P, Santi L, Mondello L (2011) Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. Flavour Fragr J 26: 34–46.

FAO (2015) Citrus fruit statistics 2015. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Frizzo CD, Lorenzo D, Dellacassa E (2004) Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of Southern Brazil. J Agric Food Chem 52: 3036–3041.

Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicináis: fatores de influência no contéudo de metabólitos secundários. Quim Nova 30: 374–381.

Grosch W (2007) Gas chromatography-olfactometry of aroma compounds. In: Berger RG (ed.), Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berlín: Springer Verlag, pp. 362–378.

Gutiérrez Flores JN (2015) Cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante en extractos de cáscaras de *Citrus* x *sinensis* ecotipo Pica. J Pharm Pharmacogn Res 3: 49–50.

Högnadóttir A, Rousseff RL (2003) Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromat A 998: 201–211.

Lota ML, Roca Serra D, Tomi F, Casanova J (2001) Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. Biochem System Ecol 29: 77–104.

Monzote L, Stamberg W, Staniek K, Gille L (2009) Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide and ascaridol from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol 240(3): 337–347.

Naef R, Velluz A (2001) Volatile constituents in extracts of mandarin and tangerine peel. J Essent Oil Res 13: 154–157.

Ortíz JM (2002) Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In: Dugo G, Di Giacomo, A (eds), *Citrus*. Londres: Taylor and Francis, pp. 16–35.

Polti S (2013). Mejora del tamaño de fruta y control de la alternancia en mandarina "Montenegrina" (*Citrus deliciosa* Tenore) [Tesina de Ingeniero Agrónomo]. Montevideo: Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Qiao Y, Xie BJ, Zhang Y, Zhang Y, Fan G, Yao XL, Pan SP (2008). Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jichen sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. Molecules 13: 1333–1344.

Rodrígues LR, Schwarz SF, Reckziegel VP, Koller OC (1998) Raleio manual de frutos em tangerineiras 'Montenegrina'. Pesq Agrop Bras 33: 1315–1320.

Rodrigues LR, Dornelles ALC, Schifino-Wittmann MT (1999) Polyembryony and number of seeds per fruit of four mandarin cultivars. Ciência Rural 29: 469–474.

Sawamura M, Tu NTM, Onishi Y, Ogawa E, Choi HS (2004) Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) cold-pressed oil. Biosc Biotech Biochem 68: 1690–1697.

Schipilliti L, Tranchida PQ, Sciarrone D, Russo M, Dugo P, Dugo G, Mondello L (2010) Genuineness assessment of mandarin essential oils employing gas chromatography-combustion-isotope ratio MS (GC-C-IRMS). J Sep Sci 33: 617–625.

Song HS, Sawamura M, Ito T, Ido A, Ukeda H (2000) Quantitative determination and characteristic flavour of daidai (*Citrus aurantium* L. var. cyathifera Y. Tanaka) peel oil. Flavour Fragr J 15: 323–328.

Tanaka T (1969) Misunderstanding with regards *Citrus* classification and nomenclature. Bull. Univ Osaka Pref Ser B 21: 139–145.

Ting SV (1980) Nutrients and nutrition of *Citrus* fruits. In: Nagy S, Attaway, JA (eds), *Citrus* Nutrition and Quality. Washington DC: Americal Chemical Society, pp. 3–24.

Torres AM, Ricciardi GAL, Agrelo AE, Ricciardi AIA, Bandoni AL (2003) Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* L. (Paico). Facena, 19: 27–32.

Tranchida PQ, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G (2011) Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives, a review. Flavour Fragr J 27: 98–123.

Tranchida PQ, Zoccali M, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G (2013) The off-line combination of high

performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a powerful approach for highly detailed essential oil analysis. J Chromat A 1305: 276–284.

Valverde dos Santos V, Levien R, Schwarz SR, Mazurana M, Petry HB, Zulpo L, Fink FA (2014) Physical-hydraulic properties of a sandy loam typic paleudalf soil under organic cultivation of 'Montenegrina' mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore). R Bras Ci Solo 38: 1882–1889.

Verzera A, Trozzi A, Cotroneo A, Lorenzo D, Dellacassa E (2000) Uruguayan essential oils. Part XII: Composition of Nova and Satsuma mandarin oils. J Agric Food Chem 48: 2903–2909.

Xavier VB, Vargas RMF, Minteguiaga M, Umpierrez N, Dellacassa E, Cassel E (2013) Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: new applications for known products. Ind Crops Prod 49: 492–496.

Xiao Z, Ma S, Niu Y, Chen F, Yu D (2016) Characterization of odour-active compounds of sweets oranges essential oils of different regions by gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-olfactometry and their correlation with sensory attributes. Flavour Fragr J 31: 41–50.

Author contribution:

Contribution	Minteguiaga MA	Frizzo CD	Dellacassa ES
Concepts or ideas	X	X	X
Design	X	X	X
Definition of intellectual content			X
Literature search	X		X
Experimental studies	X	X	
Data acquisition	X		X
Data analysis	X		X
Statistical analysis			X
Manuscript preparation	X	X	X
Manuscript editing	X		X
Manuscript review	X		X

Citation Format: Minteguiaga MA, Frizzo CD, Dellacassa ES (2017) Compuestos aromáticamente activos del aceite esencial de *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí detectados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa y cromatografía gaseosa-olfatometría. [Odour-active compounds of *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí essential oils detected by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry]. J Pharm Pharmacogn Res 5(6): 335–344.