

1346576

R. H. 651

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Ingeniería Química

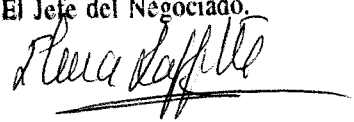
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio 14 número 192 del libro
correspondiente.

1/803

Sevilla, 27 JUN. 2000

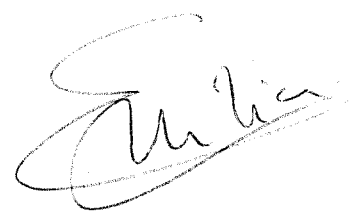
El Jefe del Negociado.



**INVESTIGACIÓN DE CONSTITUYENTES MINORITARIOS (MINERALES Y
GLUCÓSIDOS FLAVONOIDES) EN NARANJAS AMARGAS ESPAÑOLAS
(*Citrus aurantium* L.) Y PRODUCTOS DERIVADOS**

Memoria que presenta D^a Emilia Bejines Mejías,
Licenciada en Farmacia, para optar al Grado de
Doctor en Farmacia.

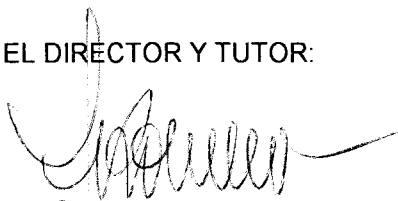
Sevilla, Junio de 2000



El presente trabajo ha sido realizado por D^a Emilia Bejines Mejías, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla, dentro del Grupo de Investigación "Tecnología de Alimentos-Sevilla" (Plan Andaluz de Investigación, AGR-155), en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química (Facultad de Química) y del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia), bajo nuestra dirección y por el presente autorizamos su presentación como Tesis Doctoral.

Sevilla, 15 de Junio de 2000

EL DIRECTOR Y TUTOR:



Fdo.: Fernando Romero Guzmán

Prof. Titular de Universidad
Área Tecnología de Alimentos

LA DIRECTORA:



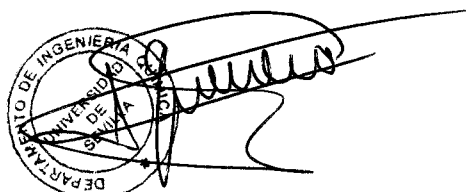
Fdo.: Isabel M^a Vicario Romero

Prof^a. Titular de Universidad
Área Nutrición y Bromatología

D^a Emilia Bejines Mejías, Licenciada en Farmacia, ha obtenido la suficiencia investigadora dentro del Programa de Doctorado "Ingeniería Química" de la Universidad de Sevilla, del que es responsable académico el Departamento de Ingeniería Química, el cual, siguiendo el procedimiento establecido por su Consejo, ha aprobado en el día de hoy la presentación de la presente Memoria de Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 26 de junio de 2000

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO:



Fdo.: Antonio Guerrero Conejo

Prof. Titular de Universidad
Área Ingeniería Química

Quiero expresar mi agradecimiento:

A Fernando Romero, mi director de tesis, que en su día me propuso embarcarme en esta grata aventura que sabiamente ha dirigido.

A Isabel Vicario que además de directora es mi amiga. Ella me ha impulsado, animado y apoyado confiando en mi en todo momento.

Seguramente sin la fuerza, el empuje e insistencia de Paco no habría llegado a este punto.

A todos mis compañeros y amigos tanto de Bromatología como de Ingeniería Química, que además de dejarme un hueco, han aportado valiosos granos de arena en este trabajo.

A Inmaculada Palencia por su desinteresado asesoramiento en la determinación de los metales

A Lourdes por estar en todo.

A ti Mamá, a Papá y a todos mis hermanos que sobre todo me han *aguantado* durante este largo período.

A ti y a todos

GRACIAS

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
Los cítricos	2
Plantas y frutos	2
Taxonomía	3
Las naranjas amargas	6
Origen y presencia en España	6
Utilización de los frutos	7
Objetivos del presente trabajo	10
Composición mineral	10
Autenticidad y contenido de fruta	12
2. ANTECEDENTES	13
Composición general de las naranjas amargas españolas	14
Características de interés tecnológico	15
Composición mineral de naranjas amargas	17
Los flavonoides de los cítricos	20
Pureza y autenticidad en derivados de cítricos	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	
Composición mineral de las naranjas	32
Muestras de naranja y su acondicionamiento	32
Preparación de muestras para análisis	34
Determinaciones analíticas	37
Contenido de flavonoides en derivados	39
Muestras	39
Preparación de las muestras para análisis	48
Determinaciones analíticas	53

4. RESULTADOS	59
5. DISCUSIÓN	76
Características generales de las frutas	77
Composición mineral de las naranjas amargas	80
Distribución de los elementos entre corteza y pulpa	80
Composición mineral de las cortezas	84
Composición mineral de las pulpas	88
Aplicación de técnicas estadísticas multivariantes	92
Composición flavonoide de derivados	110
Derivados comerciales	110
Derivados elaborados en laboratorio	115
Comparación entre muestras comerciales y de laboratorio	121
6. CONCLUSIONES	125
7. BIBLIOGRAFÍA	127

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS CÍTRICOS

1.1.1. Plantas y frutos

Los agrios o cítricos son árboles de porte pequeño y follaje perenne, que pertenecen a la familia de las *Rutáceae*, subfamilia *Aurantiodeae*, tribu *Citreae* y subtribu *Citrineae* y que se desarrollan en climas templados, aproximadamente entre los paralelos 20° y 40° de ambos hemisferios terrestres. Las especies cultivadas tienen el tronco recto y desnudo, con corteza verde que se torna gris ceniza en los árboles adultos, los cuales pueden alcanzar alturas de hasta 10 metros, aunque para facilitar la recolección de los frutos se suele limitar, mediante poda, a 3 ó 4 metros. Las ramas forman una corona de apariencia hemisférica o redondeada. Las hojas, cuyo haz presenta un color verde brillante en estado adulto, son alternas, coriáceas y glandulosas y observadas al trasluz muestran pequeños puntos claros, que son sacos con aceites esenciales, lo que hace que sean plantas muy aromáticas. Las flores, blancas o levemente violáceas en el dorso, son axilares o terminales, solitarias o en corimbos, unidas a las ramas por pedúnculos lisos, cortos y articulados. Cada flor se compone de un cáliz gamosépalo acampanado, formado por cinco apéndices soldados a la parte inferior, formando un tubo muy corto, mientras que las partes libres constituyen cinco lóbulos, con forma variable entre aguda o levemente obtusa. La corola está compuesta por entre tres y cinco pétalos, insertados alternadamente con los sépalos. Los estambres, de veinte a sesenta, están insertados más altos que los pétalos; las anteras constan de cuatro lóbulos y dos celdas, que se abren longitudinalmente. El ovario es súpero, libre, ovalado o redondeado, que lleva encima un estilo grueso, cilíndrico, largo y caduco, de la altura de los estambres y que termina en un estigma en forma lobulada. Está compartimentado en entre cinco y quince celdillas, cada una de las cuales contiene de seis a veinte óvulos superpuestos y adosados en dos filas en el ángulo interno de cada celda.

Sus frutos son bayas de forma redondeada y reciben el nombre particular de "hesperidios"; en ellas la pared ovárica se ha engrosado y diferenciado, dando lugar al epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio. Este último está dividido internamente en tantos carpelos (gajos, segmentos) como celdas tenía el ovario. La parte pigmentada más externa la constituye el epicarpio, que también se denomina flavedo, cuyo color evoluciona durante la maduración desde el verde debido a la clorofila hasta otra tonalidad característica de cada fruto (amarilla, anaranjada, rojiza). En el flavedo también se encuentran las glándulas oleíferas, pequeñas vesículas que contienen aceites esenciales muy aromáticos. Subyacente al epicarpio se encuentra el mesocarpio, constituido por un tejido esponjoso y blanco (de donde le viene el nombre de albedo por el que también se le conoce), rico en glúcidos y en flavonoides, y cuya composición es semejante a la del eje central del fruto. Más al interior está el endocarpio, en el que los gajos, carnosos y delimitados por unas paredes celulósicas más o menos gruesas (membranas carpelares), están constituidos por vesículas hinchadas de zumo. También contienen las semillas, que se suelen presentar dispuestas horizontalmente y unidas al ángulo más interno del gajo, en su centro (figura 1).

1.1.2. Taxonomía

Según Cooper y Chapot (1977), se suelen considerar como cítricos verdaderos las plantas que pertenecen a alguno de los géneros siguientes: *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* y *Clymania*. De todos ellos sólo los tres primeros tienen relevancia desde el punto de vista comercial, destacando *Citrus*, de cuyas 16 especies hay 8 que dan frutos comestibles. Linneo propuso en 1753 la primera clasificación taxonómica de los agrios, limitada a aquéllos que tuvo la ocasión de conocer en jardines europeos y a los que agrupó en dos especies: *Citrus medica* (cidras, limas y limones) y *Citrus aurantium* (naranjas amargas y dulces). Su prestigio llevó a que durante mucho tiempo su clasificación se mantuviera inalterada y no se tomaran en

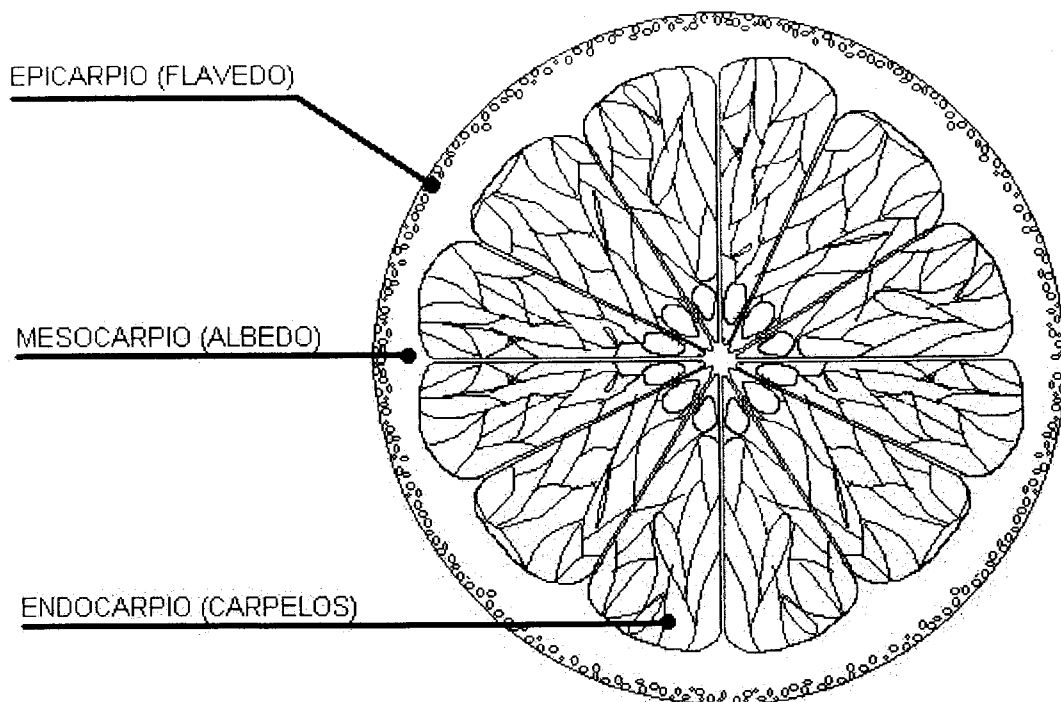


FIGURA 1 – Sección ecuatorial de un fruto cítrico.

Nombre botánico	Nombre común (Common name)
<i>Citrus aurantifolia</i>	Lima (lime)
<i>Citrus aurantium</i>	Naranja agria o amarga (sour/bitter orange)
<i>Citrus celebica</i>	Papeda de Célebes (Celebes papeda)
<i>Citrus deliciosa*</i>	Mandarina mediterránea (Mediterranean mandarin)
<i>Citrus grandis</i>	Pomelo (pummelo, shaddock)
<i>Citrus hystrix</i>	Papeda de Mauricio (Mauritius papeda)
<i>Citrus ichangensis</i>	Papeda de Ichang (Ichang papeda)
<i>Citrus indica</i>	Naranja silvestre de India (Indian wild orange)
<i>Citrus latipes</i>	Papeda de Khasi (Khasi papeda)
<i>Citrus limon</i>	Limón (lemon)
<i>Citrus macrocarpa</i>	Papeda melanésica (Melanesian papeda)
<i>Citrus medica</i>	Cidra (citron)
<i>Citrus micrantha</i>	Papeda (papeda)
<i>Citrus paradisi</i>	Toronja (grapefruit)
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarina (mandarin)
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce (sweet orange)
<i>Citrus tachibana</i>	Tachibana (tachibana)
<i>Citrus unshiu*</i>	Satsuma (Satsuma mandarin)
<i>Fortunella sp.</i>	Kumquat (kumquat)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Naranja trifoliada (trifoliolate orange)

(*) Grupos varietales de *Citrus reticulata*.

TABLA I - Clasificación de los cítricos (Hodgson, 1967; Swingle y Reece, 1967).

consideración aportaciones como la de Osbeck, publicada en 1765, sobre *Citrus limonia* (limón de Cantón), *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus grandis* (pomelo), a raíz de su viaje por Oriente y China (Cooper y Chapot, 1977). A la contribución de Osbeck pronto hubo que sumar otras muchas, de manera que el conocimiento disponible sobre los cítricos continuó creciendo y dos siglos después de Linneo, Tanaka (1954), atendiendo a los caracteres morfológicos, proponía 159 especies, introduciendo un sistema que, aún con sus defectos, fue acogido satisfactoriamente por los científicos, pues resultaba especialmente útil para poder relacionar entre sí los diversos trabajos de investigación. Sin embargo, desde el punto de vista de la hortifruticultura se considera más adecuada la clasificación propuesta por Swingle y Reece (1967) y por Hodgson (1967), que toman en consideración las especies y variedades cultivadas, aunque incluye el subgénero *Papedae*, que dan frutos no comestibles y sólo se encuentran en estado silvestre. Esta clasificación se recoge en la Tabla I, en la cual se han traducido *Citrus grandis* por "pomelo" y *Citrus paradisi* por "toronja", tal como hace Royo Iranzo en su versión española de la obra clásica de Braverman (1942), si bien teniendo presente que hay lugares en los que la toronja es conocida como "pomelo" (Real Academia Española, 1984).

Los estudios taxonómicos, utilizando nuevas herramientas analíticas, aún prosiguen en la actualidad. Recientemente Kayim et al. (1998) han estudiado los ADN de los géneros agrupados en la subtribu *Citrineae* y no hallaron diferencias significativas dentro de las especies diploides correspondientes a los que denominan "los 11 verdaderos cítricos": *Citrus aurantium*, *C. grandis* (*C. maxima*), *C. limon*, *C. limonia*, *C. paradisi*, *C. reshni*, *C. sinensis*, *C. volkameriana*, *Poncirus trifoliata* y el híbrido intergenérico de *C. sinensis* x *P. trifoliata*. En una reciente revisión crítica, Domingues y Neto (1999) estudian comparativamente, además de las ya citadas, algunas de las clasificaciones más controvertidas, como por ejemplo la de Barrett y Rhodes (1976) (que sólo consideran especies verdaderas *C. medica*, *C. grandis* y *C. reticulata*...) y discuten la utilidad de los diferentes tipos de marcadores quimiotaxonómicos.

1.2. LAS NARANJAS AMARGAS

1.2.1. Origen y presencia en España

El naranjo amargo, también conocido como naranjo agrio o naranjo borde, tiene por nombre científico *Citrus aurantium* Linneo, si bien ha recibido en el pasado otras denominaciones como *Citrus amara* Link y *Citrus bigaradia* Risso y Poiteau. En España y particularmente en Andalucía, son unas plantas muy conocidas, pues se han plantado en muchos de sus parques, jardines, plazas y calles con fines ornamentales. Se distingue ordinariamente del naranjo dulce, *Citrus sinensis*, por el menor desarrollo de la planta, follaje menos denso, lámina más ancha en el peciolo de las hojas, púas en los tallos jóvenes, flor más grande y aromática, pulpa ácida y amarga, corteza más rugosa que las naranjas dulces y de tonalidad más rojiza al madurar y con las vesículas de aceite del flavedo convexas, a diferencia de las del naranjo dulce, que las tiene cóncavas. En nuestro país, el naranjo amargo solamente se cultiva con fines comerciales en el Sur de la Península Ibérica, siendo el Valle del Guadalquivir la principal área productora, por presentar unos caracteres edáficos y climáticos especialmente adecuados para ello (Herrero, 1962). Siendo una planta oriunda de las regiones orientales de la India (aparece ya mencionada en la literatura védica, concretamente en el tratado de medicina "Caraka samhita") se extendió primero hacia Oriente (era conocida en China hacia el año 2200 a.C.) y luego hacia Occidente, a Persia, siguiendo la ruta de la seda (Toussaint, 1991). Aunque en la época romana se conocían las naranjas, la propagación de su cultivo a gran escala, no sólo como planta ornamental sino también con fines comerciales, se debe a los árabes, que introdujeron en al-Andalus la naranja amarga (narany) desde Oriente. Debió tener alguna importancia especial para que al-Tignari achacara a su cultivo todas las desgracias y calamidades que sobrevinieron a los reyes de taifas de la Península y muy particularmente a al-Mu'tamid de Sevilla... Durante varios siglos fue la única naranja cultivada en nuestro país y es muy referida la

observación que sobre su importancia económica hizo Andrea Navagero, embajador de la República Veneciana, que en 1526 asistió en el Alcázar de Sevilla a la boda de Carlos I con Isabel de Portugal. Decía Navagero que la “Huerta del Rey” (nombre que recibió la huerta de la Buhayra), propiedad del Marqués de Tarifa, “tiene un hermoso palacio con un gran estanque y tantos naranjos que de su fruto saca grandísima renta” (Bosch, 1984). La fama debió extenderse, pues años después, Francis Drake se refería al Duque de Medina Sidonia, almirante de la Armada, como “el naranjero de Sevilla”. El naranjo amargo fue a América con los descubridores y colonizadores (Colón llevó en su segundo viaje los cítricos conocidos en España) donde, según Herrero (1962), con el paso del tiempo daría origen a las variedades agrdulces, como Paraguay y Bittersweet, en las que la relación azúcares/acidez se hizo mayor, al desarrollarse en climas más cálidos. Sin embargo esta hipótesis podría quedar en entredicho tras un reciente trabajo de Protopapadakis y Papanikolaou (1998), quienes tras de estudiar componentes característicos de las hojas (isoenzimas) y del flavedo (aceites esenciales), han llegado a la conclusión de que los naranjos Bittersweet son bastante distintos de los otros tres cultivares de naranjos amargos con los que se compararon.

1.2.2. Utilización de los frutos

A pesar de su sabor, las naranjas se utilizaban como condimentos culinarios (y aún se utilizan, por ejemplo en el aliño de aceitunas) y se consumían en fresco cuando, sobremaduras, habían perdido parte de su sabor desagradable. También existen testimonios de la utilización de los frutos, desde la época árabe, en medicina y en confitería. Incluso hay quien opina que la palabra “marmalade” deriva del uso medicinal de las naranjas amargas, en forma de producto azucarado, prescrita por los físicos de la corte (“pour-Marie-malade”) a la reina María Estuardo (Rosón, 1948; Hodgson, 1967).

Las naranjas amargas no se consumen en fresco y se utilizan casi exclusivamente como materia prima industrial, habiendo sido tradicionalmente los productos principales de su transformación (Figura 2) los preparados básicos para la confección de confituras, mermeladas, jaleas y marmalades. Su industrialización comienza a finales del Siglo XVIII, cuando James Keiller inicia en Dundee (Escocia) la elaboración de derivados azucarados de naranjas amargas (marmalades) que incorporaban delgadas tiras de cortezas (corte Dundee), utilizando como materia prima naranjas amargas de Sevilla, conocidas universalmente como "Seville oranges" o simplemente "sevilles". Productos semejantes, de naranjas amargas solas o mezcladas con otros cítricos, siguieron a la mermelada de Dundee, extendiéndose también a otros mercados, si bien el Reino Unido siguió demandando la mayor parte de la fruta. Otros productos de interés comercial en la actualidad son los aceites esenciales extraídos del flavedo por medios mecánicos y las cortezas congeladas de frutos inmaduros, que se utilizan para elaboración de algunas bebidas espirituosas.

En la Figura 3 puede apreciarse la evolución de la producción de fruta a lo largo de las últimas 20 campañas citrícolas, según los datos facilitados por Asociafruit (1999). La cosecha media anual de naranjas amargas en España fue de 14.700 t en la década de los 1940, aumentando hasta alrededor de 20.000 t/a entre 1960 y 1985, para después decaer y estabilizarse en torno a los mismos niveles iniciales (media 1986-87 a 1998-99: 14.240 t/a). El declive en la producción obedece principalmente a causas económicas y viene arrastrado por una retracción en la demanda, cuyo origen puede estar en los cambios de hábitos alimentarios en los consumidores, motivados sobre todo por razones estéticas, con la exclusión de la dieta de los productos azucarados. Al no ser las confituras y similares productos de primera necesidad, por muy arraigado que estuviera su consumo en el Reino Unido, principal país importador, son los alimentos de los que más fácilmente se prescinde.

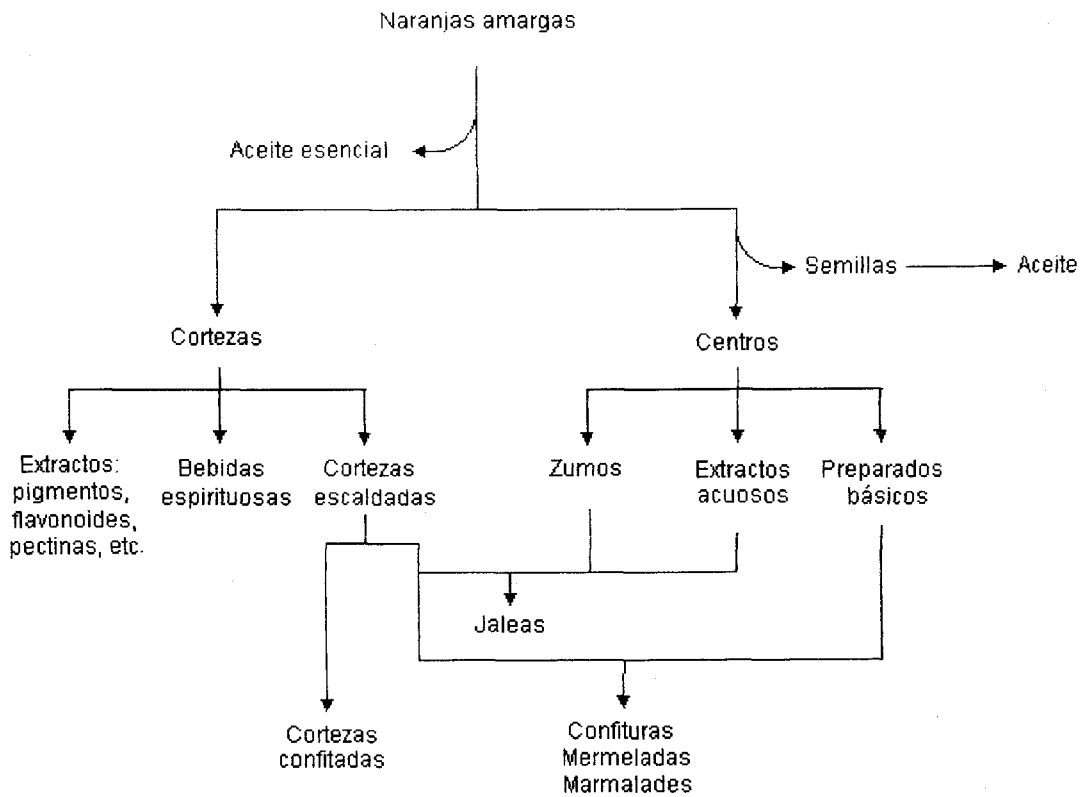


FIGURA 2. Aprovechamiento industrial de la naranja amarga.

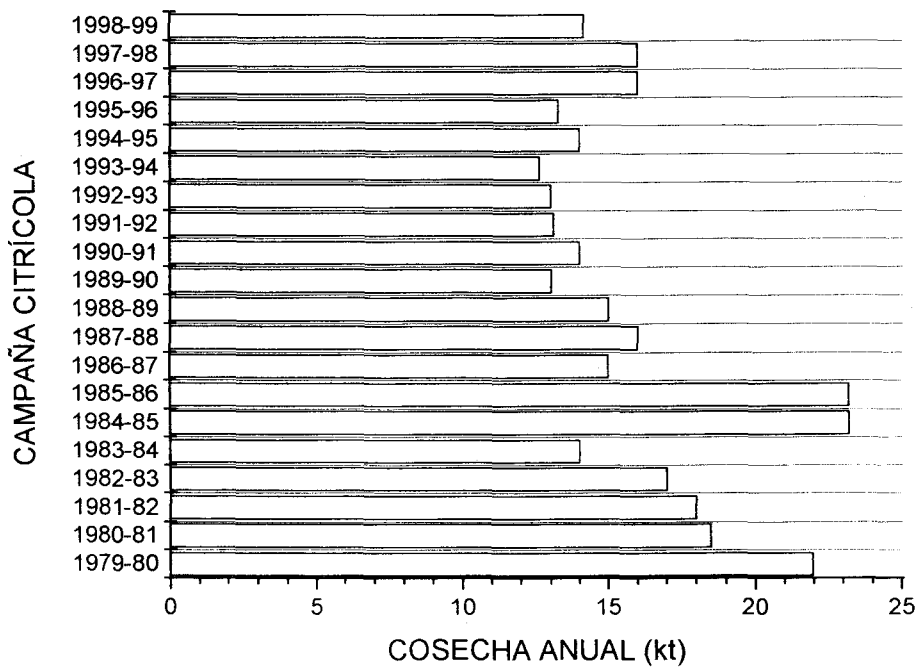


FIGURA 3. Evolución de la cosecha española de naranjas amargas (Asociafruit, 1999).

Sin embargo, para revitalizar o mantener el cultivo, se podría plantear la factibilidad económica de aplicar tratamientos destinados a la recuperación de algunos constituyentes. Por ejemplo, el residuo bruto de la industrialización de los cítricos se suele destinar, previo acondicionamiento, a la alimentación del ganado vacuno, pero también se podría utilizar como fertilizante orgánico (Correia et al., 1995), aunque tal vez sería más interesante recuperar algunos de sus múltiples constituyentes (Omar et al., 1998), como la fibra dietética, para destinarla a usos alimentarios (Khan y Sufi, 1995). Por otro lado, podría resultar rentable someter las cortezas (que son la mitad del peso fresco) a extracción a fin de beneficiar sus pectinas (Royo et al., 1980), sus pigmentos o sus antoxantinas (Larrauri et al., 1996; Calvarano et al., 1996), para utilizarlos, previo acondicionamiento o transformación, como aditivos alimentarios. Además, como se verá más adelante, las antoxantinas con acción fisiológica sobre el organismo humano ("bioflavonoides") están siendo muy estudiadas en los últimos años y tienen interés para la industria farmacéutica. Tampoco debe olvidarse que las naranjas amargas tienen semillas, que contienen aproximadamente un 30 % (en base seca) de un aceite extraíble con disolventes y apto, entre otras cosas, para el consumo humano, pudiendo aprovecharse la harina residual para la alimentación animal (Romero et al., 1988; El-Adawy et al., 1999).

1.3. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

1.3.1. Composición mineral

Con determinadas materias primas agroalimentarias sucede que no se dispone de suficientes datos sobre su composición, la cual además es variable según procedencias, técnicas de cultivo y grado de sazón. Aunque las naranjas amargas no tienen un peso económico importante en la economía andaluza, sin embargo resultan unas frutas muy familiares para los andaluces y muy características de nuestra tierra. Las naranjas amargas de Sevilla han sido

tradicionalmente apreciadas por sus peculiares características, que las hacen diferentes de las de otras procedencias (Sicilia, Reggio-Calabria, Sudáfrica). Con frecuencia, por falta de estudios sobre nuestras naranjas, se caracteriza la especie en función de datos analíticos de frutas de otros orígenes (y quizá variedades), lo que ya de por sí justificaría la investigación de su composición. Además, un factor que influye en la fiabilidad de los datos publicados, independientemente de las técnicas analíticas que se hayan aplicado, es la representatividad de las muestras y en concreto el grado de frescura de las mismas, por lo que parece conveniente que exista la mínima alteración en los materiales biológicos hasta su entrada en el laboratorio. Por eso, estando situada Sevilla en el corazón de la zona de cultivo comercial de los naranjos amargos españoles, se consideró apropiado acometer desde aquí el estudio de la composición y de las características de sus frutos.

Este trabajo de investigación se planteó inicialmente como continuación de otras investigaciones realizadas con anterioridad para completar la caracterización de los frutos de la naranja amarga de Sevilla (Romero et al, 1988; Borrero y Romero, 1986; Royo y Romero, 1973) a fin de caracterizar la composición mineral de sus distintas partes constitutivas. Ya se conocían los datos de sueros de dos campañas citrícolas con diferentes regímenes pluviométricos (1971-72, con 715,4 L.m⁻².a⁻¹ y 1982-83, con 276,4 L.m⁻².a⁻¹), así como los de las pulpas de 1982-83. Para completar los datos de esta fracción se han analizado las pulpas de las campañas 1984-85 (682,0 L.m⁻².a⁻¹) y 1987-88 (764,7 L.m⁻².a⁻¹). También se han analizado las fracciones minerales de las cortezas de las campañas 1982-83, 1984-85 y 1987-88, puesto que no se conocían datos acerca de su composición. Los valores pluviométricos indicados corresponden a las precipitaciones en la provincia de Sevilla durante los doce meses que transcurren desde la floración hasta el final de la recolección (datos facilitados por el Instituto Nacional de Meteorología, Centro Territorial de Sevilla). A la vista de los resultados obtenidos, se analizan las relaciones entre elementos en cada una de las fracciones estudiadas, así como la distribución de cada elemento particular entre ellas.

1.3.2 Autenticidad y contenido de fruta

Por otro lado, uno de los requisitos que la legislación española (y comunitaria) exige a los derivados azucarados de frutas es que tengan unos contenidos de fruta mínimos (R.D. 670/1990). Puesto que hasta el presente no existe ninguna técnica analítica oficialmente establecida para determinarlo, se consideró conveniente incluir unas experiencias encaminadas a explorar la posibilidad de estimar la pureza de los productos derivados, así como sus contenidos de fruta, mediante el análisis cuantitativo de componentes típicos (glucósidos flavonoides de la neohesperidosa). Con ello se pretende desarrollar una herramienta que permita a la Administración el correcto ejercicio de su función comprobadora y garantizar al consumidor que lo que compra es lo que quiere comprar y lleva lo que tiene que llevar. Pero también interesa su desarrollo desde el punto de vista del agricultor o del industrial, pues es obvio que sus ventas vendrán afectadas, a igualdad de producción de derivados azucarados de naranjas amargas, por el porcentaje de fruta del producto final resultante, por lo que la existencia de un método analítico que informe sobre la riqueza en fruta de los derivados resultaría de gran utilidad. Desde el punto de vista de la autenticidad, se analizó en 1996-97 (por HPLC) la fracción de antoxantinas mayoritarias presentes en 17 muestras de derivados azucarados comerciales de naranjas amargas, naranjas dulces, pomelos y limones. Posteriormente, en 1997-98, y para ver si existía alguna relación entre fruta presente y contenido de antoxantinas, se elaboraron en el laboratorio 19 muestras de derivados de naranjas amargas con composición (proporción de fruta) conocida, a partir de los preparados básicos obtenidos mediante dos procedimientos diferentes, analizándose seguidamente sus contenidos de neohesperidósidos.

En las páginas que siguen, tras de explorar la información bibliográfica disponible sobre los temas objeto de estudio, se describen los procedimientos experimentales aplicados y se presentan y discuten los resultados obtenidos, proponiéndose las correspondientes conclusiones.

2. ANTECEDENTES

2.1. Composición general de las naranjas amargas españolas

El primer estudio científico acerca de la caracterización del zumo de las naranjas amargas españolas se llevó a cabo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Valencia) durante la campaña citrícola 1971-72, analizándose 20 muestras, 18 procedentes de Sevilla y 2 de Málaga (Royo y Romero, 1973). En el zumo tamizado por una malla de 0,8 mm de luz se determinaron los grados Brix (valor medio: 10,19), la acidez (valor medio 4,55 mg de cítrico anhidro/100 mL) y la vitamina C (valor medio 35,96 mg/100 mL). En el suero resultante de la clarificación espontánea durante dos semanas, se determinaron azúcares reductores (valor medio 3,79 g/100 mL), azúcares totales (valor medio: 5,21 g/100 mL), proteína (valor medio: 0,53 g/100 mL), índice de formol (valor medio: 2,59 por 10 mL), calcio (valor medio 14,98 mg/100 mL), magnesio (valor medio: 11,46 mg/100 mL), sodio (valor medio 0,82 mg/100 mL), potasio (valor medio: 175,69 mg/100 mL) y fósforo (valor medio: 12,25 mg/100 mL). A partir de suero y de la pulpa separada se reconstituyeron zumos con un 8 % (p:p) de pulpa, determinándose carotenoides totales (valor medio: 1,09 mg/L) y cenizas (valor medio: 0,45 g/100 mL). La acidez del zumo fue disminuyendo a lo largo de la campaña, para estabilizarse hacia el final de la misma. La diferencia entre azúcares totales y azúcares reductores también se redujo al avanzar en la campaña, haciendo pensar en que tiene lugar la inversión de la sacarosa en el propio fruto. La comparación con los escasos datos bibliográficos sobre naranjas amargas de otras procedencias revelan algunas diferencias. La acidez y los azúcares reductores encontrados por Benk (1961) son inferiores a los del presente trabajo. Los grados Brix, la acidez, los azúcares reductores y totales, las cenizas, el índice de formol y la proteína del zumo de naranjas de Reggio Calabria (Kunkar, 1964) son también inferiores, por lo general a los españoles, mientras que la naranja italiana supera en vitamina C a la española. La

comparación de los contenidos de carotenoides es problemática, dado que no existe una estandarización de los contenidos de pulpa, pero el valor encontrado en las naranjas españolas es superior al comunicado por Ajon. Los datos de elementos inorgánicos se discuten en un apartado posterior.

También se ha caracterizado el aceite de las semillas (Romero et al., 1988), siendo sus ácidos grasos mayoritarios linoleico (35,1 %), oleico (26,5 %), palmítico (24,2 %), linolénico (9,2 %) y esteárico (5,0 %). A grandes rasgos concuerdan con otros datos conocidos para la misma especie (Abdel-Rahaman, 1980; Mingo et al., 1943; Dhingrra et al., 1957), pero el aceite de las semillas españolas es más rico en ácido oleico que el de las egipcias y mucho más que el de las indias. También se observó durante este estudio que la congelación de las semillas conducía a menores rendimientos en la extracción con hexano, si bien no se investigó la causa.

2.2. Características de interés tecnológico

Nebot et al. (1993) han estudiado los factores que influyen en la calidad tecnológica de los frutos de *Citrus aurantium* L., tomando como base los datos analíticos de entrada de fruta recogidos a lo largo de 12 campañas citrícolas en una fábrica de zumos situada en Sevilla. Seleccionaron en principio como parámetros indicadores de la calidad industrial los porcentajes de corteza (C) y de zumo (Z), la textura de la corteza (T) y la acidez (A), el pH y los sólidos solubles del zumo. Los valores medios obtenidos para los rendimientos de corteza y zumo fueron, respectivamente, 55,4 % y 20,6 %, considerándose el 24,9 % restante como residuo. El zumo tenía como promedio 9,9° Brix, un pH de 2,6 y una acidez de 4,11 g de ácido cítrico anhidro/100 mL. La textura de la corteza, determinada con un tenderómetro para guisantes Vettori-Manghi, presentó un valor medio de 134 psi. Proponen un índice de calidad tecnológica (ICT) con arreglo a la siguiente expresión:

$$ICT = Z.A.(C+Z)/90,2 + (T-80)$$

Aplicándolo, concluyen que la calidad tecnológica disminuye al avanzar la campaña, pudiéndose diferenciar en ella tres períodos: en el primero (ICT igual o mayor que 150) el grado de aprovechamiento de corteza y zumo es máximo, cuantitativa y cualitativamente; en el segundo (ICT comprendido entre 100 y 150) el grado de aprovechamiento de la corteza es aceptable, cuantitativamente y el del zumo lo es cualitativamente; en el tercero (ICT inferior a 100) solamente interesaría aprovechar la corteza, por su textura, ya que el rendimiento de zumo es mínimo y el residuo alcanza valores superiores al 30 %. Un posible aprovechamiento de la corteza de las naranjas amargas podría ser la obtención de pectina, estudiada por Royo et al. (1975, 1980).

Posteriormente, al estudiar la influencia de cada parámetro individual en el ICT, dada la constancia del porcentaje de corteza (coeficiente de variación 4,2 %) y de la textura de las cortezas (coeficiente de variación 6,7 %), concluyeron que el contenido de zumo y la acidez podrían bastar para reflejar adecuadamente la calidad tecnológica, pero siendo así que la evolución de la acidez a lo largo de la campaña sigue siempre la misma pauta de comportamiento decreciente, concluyen que el solo rendimiento de zumo puede bastar para reflejar la evolución de la calidad tecnológica (Romero y Nebot, 1995). Al examinar conjuntamente el rendimiento de zumo y la acidez de éste, para 13 campañas cítricas, con los datos pluviométricos de la zona, considerados desde la floración hasta la recolección (Abril a Marzo), concluyen que favorecen mayores contenidos de zumo lluvias superiores a las medias entre Abril y Julio, así como entre Diciembre y Marzo, acompañadas de precipitaciones inferiores a las medias entre Agosto y Noviembre. Los mayores valores de la acidez también se corresponden con lluvias inferiores a las medias entre Agosto y Septiembre. La mejor calidad tecnológica se correspondería, pues, con primaveras lluviosas y otoños secos.

2.3. Composición mineral de naranjas amargas

Al no existir datos sobre la composición mineral de naranjas amargas ni españolas ni de otras procedencias, Royo y Romero (1973) compararon los resultados con los de otros zumos españoles, como la naranja dulce y del limón (Primo y Royo, 1965, 1967, 1969). Se aprecian valores análogos para los contenidos de sodio, calcio, magnesio y fósforo. En cambio, las proporciones en cenizas y potasio en el suero de la naranja amarga, son algo superiores a los de la naranja dulce y próximos a los del limón, lo que atribuyen a la diferente procedencia de las muestras (Sevilla para las naranjas amargas, Valencia para las naranjas dulces y Murcia para los limones). La influencia geográfica sobre el contenido mineral había sido también puesta ya de manifiesto por otros investigadores en diferentes cítricos (Hulme et al., 1965; Money, 1964, 1966). Estudios recientes investigan elementos traza y ultratrazas en 64 zumos de 6 variedades de naranjas y seis procedencias diferentes, con el fin de adquirir información que permita determinar orígenes y variedades (Martin et al., 1997). Protopapadakis et al. (1998) han indicado que aparte del año y la procedencia, el contenido de potasio de naranjas Washington Navel depende del patrón portainjertos (la influencia del patrón también había sido estudiada por Creste y Lima, 1995, sobre satsuma y por El-Shazly et al., 1994, sobre el limón). En los estudios citados, uno de los patrones utilizados fue *C. aurantium*.

Sin embargo, algunas de las discrepancias observadas podrían deberse a variaciones en las características de las frutas, dado el tiempo que mediaba entre la recogida y el análisis (recolección, transporte a almacén, acondicionamiento, envío por ferrocarril y almacenamiento refrigerado hasta análisis), por lo que se planteó la necesidad de trabajar sobre muestras recién recolectadas. Para ello, el siguiente estudio se realizó por Borrero y Romero (1986) en la Facultad de Química de Sevilla (actual Departamento de Ingeniería Química), sobre 22 muestras recogidas aleatoriamente en la zona de recepción de una fábrica situada en Sevilla, durante la campaña 1982-83. En

la toma de muestras se descartaban los frutos desbotonados, para prevenir contaminaciones del zumo. El zumo se fraccionó en suero y en pulpa y a fin de poder establecer comparaciones y se analizaron sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y fósforo, utilizando las mismas técnicas de Royo y Romero (1973) y de Royo y Giménez (1974), basadas en Safina (1960). En el suero se obtienen concentraciones (valores medios, en mg/100 mL, entre paréntesis) menores de Na (0,61), Ca (12,17) y P (9,9), pero los de K (196,8) son superiores, aunque del mismo orden de magnitud que los comunicados por Royo y Giménez (1974). Los valores superiores de las muestras analizadas en Valencia se atribuyen a efectos de pérdida de agua en los frutos entre la recolección y el análisis y el elevado valor del potasio se atribuyó a la posible influencia de la fertilización (Moss, 1972; Kharebava, L.M., 1971; Smith y Rasmussen, 1961; Embleton et al., 1956).

En cuanto a los valores obtenidos para la pulpa no se pudieron comparar con otros relativos a la naranja amarga, por lo que la comparación se establece con los de las naranjas dulces (Royo y Giménez, 1974). De nuevo son superiores las concentraciones de potasio (178,8), pero también lo son ahora las de calcio (21,21) y fósforo (20,9). También en este caso se consiguen menores valores de sodio (0,70), lo que se atribuye a un mejor control de las causas de contaminación, que podrían haber afectado a las muestras ajenas. El hierro (0,22 en la pulpa y 0,13 en el suero) no se pudo comparar, al no existir datos disponibles. En cuanto a la distribución de los elementos entre suero y pulpa, potasio y magnesio se reparten prácticamente por igual en ambas fases, mientras que calcio, fósforo y hierro se concentran preferentemente en la pulpa. En lo que respecta al sodio, al principio de la campaña se concentra preferentemente en la porción sólida, solubilizándose a medida que aquélla avanza. Por lo tanto, se concluye que cuando se den datos analíticos de un zumo debe incluirse asimismo la proporción de pulpa que contiene, ya que afecta a los resultados.

La composición mineral de los zumos cítricos está íntimamente relacionada con los procedimientos de extracción de los mismos. Extensos estudios han llevado a Attaway y Carter (1971) y Attaway et al. (1972) a desarrollar indicadores analíticos de la calidad de los derivados de cítricos, basados en los diferentes procesos a que se han sometido. Los zumos obtenidos mediante exprimido energético contienen doble cantidad de calcio que los extraídos suavemente. Ello sugiere que el calcio se concentra preferentemente en la fase sólida, como se deduce de los datos de Borrero y Romero (1986), siendo de esperar una elevada concentración en la corteza. También presentan contenidos más elevados de magnesio y de sodio y más bajos de potasio, si bien los valores de cenizas son prácticamente idénticos. Por su parte, Bessho et al. (1974) estudiaron la influencia de la centrifugación sobre la concentración de potasio en el zumo de naranja y Guenther et al. (1968) encontraron que cuando para extraer el zumo de limón se usan presiones elevadas, las cenizas y el sodio dan también valores más altos, siendo menores los cocientes sodio/potasio que en el caso de los zumos obtenidos en el laboratorio o a escala doméstica.

Trabajos realizados con otros cítricos han puesto de manifiesto que las concentraciones de diferentes elementos inorgánicos varían a lo largo de la maduración (Soni y Randawa, 1976; Cotelí et al., 1973). También se ha estudiado la asociación de los elementos inorgánicos con otros constituyentes de las frutas, como las pectinas (Nickdel et al., 1991), que puede llegar a ser del 50 %, siendo Cu y Zn los que más interaccionan. Xu y col. (1994) han observado que el resquebrajamiento de las naranjas Hong Jiang está relacionado inversamente con el calcio presente y con la pectina hidrosoluble.

Otros estudios se dirigen a esclarecer las interacciones suelo-planta, con el fin de estudiar la evolución de la absorción de nutrientes desde la floración hasta la recolección (Haag et al., 1993) o de ver si factores tales como la presencia de metales pesados en el terreno (Kim et al., 1993) o la aplicación de lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (Espinoza et al., 1998) afectan a la composición mineral de las plantas.

2.4. Los flavonoides de los cítricos

El estudio de los flavonoides experimenta un fuerte incremento a partir de 1940, motivado por el interés de la industria farmacéutica, debido a sus potenciales efectos fisiológicos. Y es que a las antoxantinas de los frutos cítricos se les han atribuido, desde el primer tercio del Siglo XX, efectos saludables para el organismo humano, habiéndose acuñado el término "bioflavonoides" para destacar su papel biológico. Incluso se llegó a utilizar la expresión "vitamina P" para designar una mezcla de flavonoides que parecían disminuir la fragilidad de los capilares y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Sin embargo, esta "vitamina" fue excluída en 1950 por el Comité Internacional de Vitaminas, dadas las discrepancias entre los resultados comunicados por los diferentes investigadores (Braverman, 1967). Sin embargo, a partir de 1980 se recobra de nuevo el interés por los bioflavonoides, habiéndose estudiado sus efectos sobre diversas patologías tales como hipercolesterolemia (Borradaile et al., 1999; Kurowska et al., 2000), hipo e hipertensión arterial (Sawabe et al., 1998), procesos inflamatorios (Silva et al., 1994) o diversos tipos de cánceres (Kawaii et al., 1999 a, 1999 b; Miyazawa et al., 1999; Mak et al., 1996; Calomme et al., 1996). En todos estos estudios se destaca la influencia positiva de algunos de estos compuestos para prevenir desórdenes fisiológicos, estableciéndose en algunos de ellos relaciones entre actividad y estructura química. Especial atención ha merecido el estudio de su capacidad antioxidante, en relación con la neutralización de radicales libres, asociados a la aparición de enfermedades degenerativas (Suárez et al., 1998; Saleh et al., 1998). Otras investigaciones en curso son las referidas a los efectos antimicrobianos (Bae et al., 1999) y antivíricos (Lee et al., 1999) de algunos flavonoides, con esperanzadores resultados por el momento. Recientemente se han publicado algunas revisiones bibliográficas sobre el papel fisiológico de los bioflavonoides, como las debidas a Bahar et al. (1999), Benavente et al. (1997), Cook y Samman (1996), Middleton y Kandaswami (1994) y Nagy y Attaway (1992, 1994). También han despertado interés comercial los usos de ciertos flavonoides como materias primas para la

obtención de aditivos, tal como sucede con la neohesperidina, a partir de la cual se obtiene su dichidrochalcona, aditivo edulcorante autorizado en la Unión Europea (E-959) e interesante por su origen natural (R.D. 2002/1995; R.D. 2106/1996). Ello ha motivado la investigación sobre técnicas de aislamiento y purificación de neohesperidósidos a partir de cítricos y de residuos de su industrialización (Coll et al., 1998; Li et al., 1997; Larrauri et al., 1996; Calvarano et al., 1996; El-Nawawi, 1995; Cives, 1989).

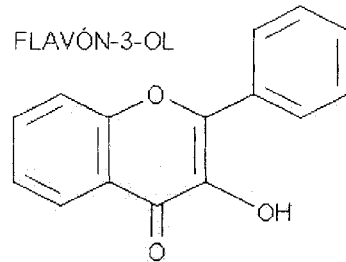
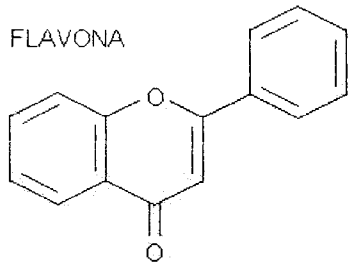
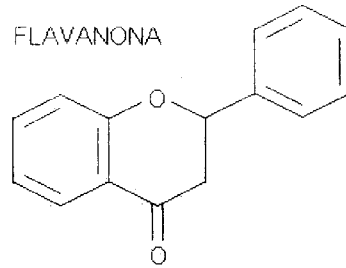
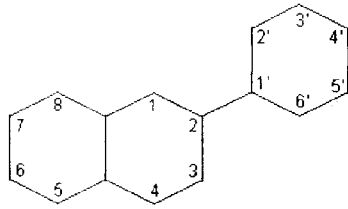
Las diferentes especies y variedades de cítricos aparentaban tener unos perfiles típicos de flavonoides, por lo que Swingle (1943) fue el primero en apuntar la posibilidad de usarlos como marcadores taxonómicos. Horowitz (1964) fue el primero en confirmar que había variedades con sólo rutinosa, variedades con sólo neohesperidosa y otras con los dos, aunque con predominio de una sobre otra. Sugirió que cuando aparecen ambos azúcares, se debía sospechar que se tratase de un híbrido. Albach y Redman (1969) examinaron la composición de flavanonas en 41 variedades de cítricos y en 49 híbridos, mediante cromatografía en capa fina. Concluyeron que los cítricos podían separarse en dos grandes grupos, según que contuvieran sólo rutinósidos o sólo neohesperidósidos, proponiendo que se considerasen híbridos aquéllos que tuvieran ambos flavonoides. A una conclusión semejante llegaron Kamiya y Esaki (1973) y Nishiura et al. (1969, 1971 a, 1971 b), tras de analizar flores, hojas y frutos de un elevado número de variedades e híbridos clasificados según el sistema de Tanaka. Utilizando técnicas cromatográficas instrumentales, Harminder et al. (1993) han estudiado los perfiles flavonoides de las hojas en 8 cruzamientos interespecíficos e intervarietales de mandarinas y naranjas dulces, observando diferencias entre sus distribuciones. La presencia de flavonoides parentales en los híbridos ha sido estudiada también por Matsumoto (1995), para el que el amargor asociado a neohesperidósidos es un carácter genético dominante que se transmite a los híbridos e igualmente otros investigadores han observado que los contenidos de flavanonas en los frutos cítricos son función más de los caracteres genéticos que de las condiciones climáticas (Ortuño et al., 1997). Kawaii et al. (1999 c) aplicaron

tratamientos estadísticos a los resultados del análisis de 24 flavonoides en 66 especies y variedades de cítricos, llegando a la conclusión de que estaban bastante de acuerdo con las clasificaciones botánicas y hortícolas basadas en criterios morfológicos (Tanaka, 1954). También aplicando criterios quimiotaxonómicos, Berhow et al. (1996), a partir de la composición limonoide y flavonoide del subgénero *Papeda*, postulan que *Citrus ichangensis* debería ser considerada como una especie, mientras que *C. latipes* y *C. hystrix* podrían ser híbridos con la cidra (por su contenido en rutina) y *C. junos* podría serlo con la toronja (por su contenido de neohesperidósidos de flavanonas). En los últimos 30 años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la fracción flavonoide de los cítricos, como puede comprobarse comparando la información recopilada por Herrmann (1998) con las recogidas en las obras de Kefford y Chandler (1970) y de Nagy et al. (1977). Sin embargo, los avances en las herramientas de análisis hacen que los intentos de actualización bibliográfica queden desfasados, pues continuamente se descubren nuevos compuestos que añadir a los ya conocidos (Chen y Montanari, 1998).

En los cítricos, los flavonoides se encuentran normalmente en forma de glucósidos, siendo las flavanonas el grupo químico predominante. Las flavonas y los flavon-3-oles se encuentran en proporciones considerablemente menores. Suelen estar distribuidos por todo el fruto, pero son una excepción las flavonas y las flavanonas permetoxiladas, ya que se presentan únicamente como compuestos libres y solamente en los sacos oleíferos de ciertas frutas. El amargor de algunos frutos cítricos está relacionado con su contenido de flavonoides, puesto que los 7- β -neohesperidósidos de las flavanonas son amargos, mientras que los 7- β -rutinósidos son insípidos. Este amargor existe ya en la propia fruta, a diferencia del debido a la limonina, sustancia presente en todas las especies de cítricos (Dreyer, 1966), el cual se desarrolla tras de la rotura de los tejidos. Los neohesperidósidos de flavanonas están ausentes en especies tales como *C. sinensis* (naranja dulce), *C. limon* (limón), *C. aurantifolia* (lima) o *C. reticulata* (tangerina) (Horowitz, 1964; Albach y Redman, 1969). La naringina y la poncirina son los más amargos, seguidos por la

neohesperidina y la neoeriocitrina. El umbral de detección del amargor de la naringina es de 20 mg/L, aunque puede verse afectado por la presencia de otras sustancias (roifolina, neodiosmina, limonina, etc.) (Guadagni et al., 1974; Guadagni et al., 1976; Horowitz, 1964). Con vistas a su mejor aceptación por los consumidores, incluso se han propuesto técnicas para reducir el amargor de los zumos (Soares y Hotchkiss, 1998).

Los primeros estudios acerca de la fracción flavonoide de las naranjas amargas (Karrer, 1949), pusieron de manifiesto que en las frutas inmaduras se encontraban la hesperidina y la neohesperidina, hecho que fue parcialmente confirmado más tarde por Venturella et al. (1964, 1965). Nakabayashi (1961) confirmó asimismo la afirmación de Kolle y Gloppe (1936) de que la neohesperidina era el flavonoide predominante en esta especie, detectando, en las muestras estudiadas, que su concentración disminuía al madurar, mientras que permanecía inalterada la del segundo flavonoide, la naringina. También aisló un tercer neohesperidósido, la roifolina, así como otro compuesto, que denominó lonicerina y del cual no se tienen referencias posteriores. De acuerdo con Castillo et al. (1992), los valores absolutos de naringina y neohesperidina en *C. aurantium* siguen aumentando al madurar, pero al ir creciendo el tamaño de las células el resultado observable es una disminución de sus concentraciones. Estos mismos investigadores han encontrado también que en la citada especie los flavonoides neohesperidósidos amargos naringina y neohesperidina tienen como precursores, respectivamente, a la prunina y a la hesperetina-7-O-glucósido (Castillo et al., 1993). En el caso de la toronja, también disminuye la concentración de la poncirina al madurar, mientras que la concentración de naringina permanece constante (Chaliha et al. 1965). Con respecto a la evolución de los flavonoides con el tiempo, en todos los cítricos estudiados siempre se observa una disminución de sus concentraciones a lo largo del período de maduración de los frutos, relacionada con la desaparición de la clorofila (Reynaldo et al., 1997; Eun et al., 1998; Wu et al., 1995).



Sustancia	Presencia natural*	Observaciones
5-O-DESMETILNOBILETINA (5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. volkameriana</i> , tangerina Robinson	
HESPERIDINA (5,7,3' trihidroxi-4' metoxiflavanona 7-β rutinósido)	<i>C. aurantium</i> *, <i>C. sinensis</i> , <i>C. limon</i> , <i>C. medica</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>C. aurantifolia</i> , <i>C. tachibama</i> , <i>C. mitis</i> , <i>C. macroptera</i> , <i>C. karma</i> , <i>C. jambhiri</i> , <i>C. halimii</i> , <i>C. volkameriana</i> , <i>C. taiwanica</i> , <i>C. limettioides</i> , <i>C. excelsa</i> , <i>C. amblycarpa</i> , <i>F. hindsii</i> , <i>F. crassifolia</i> .	Insípida.
ISOSINENSETINA (5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. sinensis</i> , tangerina Robinson, <i>F. japonica</i>	
LUTEOLINA 7-β-NEOHESPERIDÓSIDO (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. grandis</i>	
NARINGINA (5,7,4'-trihidroxiflavanona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>C. grandis</i> , <i>C. hassaku</i> , <i>C. natsudaidai</i> , <i>P. trifoliata</i> , <i>F. margarita</i>	Intensamente amarga
NEODIOSMINA (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i>	Reduce el amargor de naringina y de limonina
NEOERIOCITRINA (5,7,3',4' tetrahidroxiflavanona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. bergamia</i> , <i>C. crassifolia</i>	Menos amarga que naringina, poncirina o neohesperidina
NEOHESPERIDINA (5,7,3' trihidroxi-4'-metoxiflavanona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>C. macroptera</i> , <i>C. limon</i> f. <i>Ponderosa</i> , <i>P. trifoliata</i>	Unas diez veces menos amarga que la naringina.
NOBILETINA (5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>C. volkameriana</i> , <i>F. japonica</i>	
ROIFOLINA (5,7,4'-trihidroxiflavona 7-β-neohesperidósido)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>C. grandis</i>	Insípida, anula en parte el amargor de la naringina.
SINENSETINA (5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. sinensis</i>	
TANGERETINA (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. jambhiri</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>C. volkameriana</i> , <i>C. medica</i> , <i>C. paradisi</i> , <i>F. japonica</i> , <i>P. trifoliata</i> , tangerina Murcott	
TETRA-O-METILISOCUTELAREÍNA (5,7,8,4'-tetrametoxiflavona)	<i>C. aurantium</i> , <i>C. sinensis</i> , tangerina Robinson	

(*) Géneros: *C.*, *Citrus*; *F.*, *Fortunella*; *P.*, *Poncirus*; tangerina Robinson [(*C. paradisi* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*]

TABLA III. Principales flavonoides de la naranja amarga (Nagy et al., 1977).

2.5. Pureza y autenticidad en derivados de cítricos

Las respuestas analíticas al problema de la identidad y pureza de los alimentos han estado condicionadas en cada momento por el grado de desarrollo del análisis químico e instrumental y así se aprecia al revisar la literatura científica. Pero también han ido evolucionando los tipos de fraudes y adulteraciones, que obligan continuamente a realizar esfuerzos investigadores para ponerlos de manifiesto. Las últimas tendencias en adulteración de alimentos han sido revisadas recientemente por Simpkins y Harrison (1995), que dan cuenta de las técnicas utilizadas para su detección, de las aplicaciones de la quimiometría y avanzan las tendencias de futuro.

Puesto que los derivados de mayor importancia comercial de los frutos cítricos han sido tradicionalmente los zumos, casi toda la literatura científica disponible sobre autenticidad y pureza se refiere a ellos. Aunque los zumos de la naranja amarga no se utilizan para consumo directo, sino como ingredientes para elaborar otros derivados, en cualquier caso resultará de utilidad conocer cómo se han enfocado los estudios en este campo para abordar el problema en relación con derivados tales como confituras, mermeladas, jaleas y marmalades. Los tres tipos genéricos de fraudes en los zumos cítricos pueden ser, según Royo Irazo (1974) :

- A) La adición a los zumos de sustancias que siendo constituyentes naturales de los zumos, tengan otra procedencia diferente de los frutos en cuestión (agua, ácidos, azúcares...).
- B) La adición a los zumos de sustancias ajenas a la composición natural de los frutos (aditivos alimentarios: acidulantes, emulsionantes, etc.).
- C) La incorporación a los zumos de jugos de otras especies distintas de las declaradas o de extractos de otras partes del fruto distintas al zumo.

Para luchar contra el fraude del tipo A proponía determinar cuantitativamente los componentes habituales y característicos del zumo; contra los del tipo B, la determinación cualitativa de las sustancias extrañas; para descubrir el fraude del tipo C, sugería la determinación de compuestos característicos en las diferentes partes anatómicas de los frutos.

Para ello, destacaba la necesidad de que en los distintos países productores se confeccionaran tablas normalizadas con los intervalos de variación de los componentes más característicos de los cítricos y de la distribución de los mismos entre las diversas partes de los frutos, confeccionadas con rigor científico. Suponiendo que la información conseguida fuera correcta y completa, advertía de que no todos los componentes pueden utilizarse indiscriminadamente como parámetros de calidad, pues hay que considerar también tanto el margen de variabilidad de cada uno de ellos (tanto la variabilidad natural debida a la procedencia, climatología, variedades, etc., como la introducida por los tratamientos tecnológicos a que se someten las frutas) o la facilidad de su adición. Veinte años después, Marini y Balestrieri (1994) siguen llamando la atención sobre la variabilidad natural de determinados constituyentes de los zumos, cuya utilización como parámetros de calidad habría que descartar o reevaluar, pues valores fuera del intervalo considerado normal no tienen por qué significar invariablemente que el zumo no sea auténtico.

Greeve (1997) da cuenta de las directrices de la Asociación de la industria de zumos y néctares vegetales de la Unión Europea (AIJN), con vistas a comprobar la calidad y la autenticidad de los zumos de frutas, tras de contrastar las guías de referencia existentes (RSK, AFNOR, PGF) con la experiencia del Sector. Es obvio que a cada nueva técnica de detección se puede oponer una nueva forma de adulteración, por lo que a veces algunos organismos oficiales no publican en su totalidad las marchas analíticas más complejas a fin de que no puedan ser conocidas por los defraudadores (Royo, 1974), pero dado que la motivación de la adulteración es siempre económica,

la mejor manera de combatirla sería desarrollando índices basados en varios constituyentes cuya "corrección" fraudulenta no resultara rentable (Navarro, 1980). Con un planteamiento semejante, Brause (1993), tras estudiar diversos problemas reales documentados, propone la utilización combinada de diversas técnicas analíticas si se pretende dictaminar de manera fiable sobre la autenticidad de un zumo.

Precisamente así enfocaron el problema Vandercook y Rolle (1963), quienes combinaron la medida espectrofotométrica de los flavonoides, junto con datos sobre aminoácidos totales y ácido l-málico, para caracterizar la autenticidad de muestras de zumo de limón y para comprobar el contenido de fruta en productos derivados; el método dio resultados satisfactorios a pesar de las variaciones en las concentraciones de flavonoides y de otros constituyentes del zumo, debidas a variaciones en la presión aplicada durante la extracción (Rolle y Vandercook 1963). Este procedimiento fue examinado más tarde en ensayos de colaboración y se aprobó por la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) como primera acción (Yokoyama 1965).

Para los limones de California-Arizona, Rolle y Vandercook (1963) daban la siguiente fórmula:

$$C = 36,54 + 12,04.A + 30,06.P + 2,71.M$$

Siendo C el contenido estimado de ácido cítrico, A el contenido en aminoácidos, P el de polifenoles y M el de ácido málico, todos ellos expresados como miliequivalentes por 100 mL. Si por valoración de la muestra se obtiene un resultado superior en más de un 20 % al que da la fórmula, la muestra quedaría dentro de los límites de confianza (99 %) y se puede considerar razonablemente que el zumo es anormal o ha sido adulterado por adición de ácido. La validez de esta relación no se ve afectada por el almacenamiento de la fruta, ni por los diferentes procedimientos de obtención del zumo, ni por la presencia de conservadores químicos, ni por el almacenamiento del zumo (Vandercook et al, 1966; Vandercook y Guerrero, 1968).

El método descrito antes desapareció como método de la A.O.A.C., que en cambio, recogió en 1986 una primera acción (posteriormente revisada en 1993) consistente en un método espectroscópico para detectar la adición de agua o de extracto acuoso de pulpa a los zumos de naranja de Florida, que figura como método oficial 986.14 (A.O.A.C. International, 1996). También es un método combinado de carácter cualitativo, cuyo criterio de decisión se basa en la suma de las absorbancias a 443, 325 y 280 nm, en el cociente entre las absorbancias a 443 y a 325 nm y en los espectros de fluorescencia (excitación y emisión). Para este mismo tipo de adulteración, Mouly et al. (1993) proponen asimismo dos procedimientos combinados alternativos, uno de los cuales es espectrofotométrico y el otro se basa en el análisis de componentes principales de: cenizas, calcio, magnesio, índice de polifenoles, flavonoides totales, hesperidina y narirutina.

Existen constituyentes que se concentran preferentemente en una de las fases del zumo, lo que introduciría un elemento de variabilidad en la composición de éstos, ya que su proporción de pulpa puede oscilar entre el 2 y el 15 % (Royo, 1974). Pero además, la concentración preferente de constituyentes en el sólido significaría que las condiciones tecnológicas en las que se extrae el zumo afectarían a la composición del mismo. Ambas consideraciones harían inviable la confección de tablas normalizadas de composiciones de zumos para usarlas como referencias. Por este motivo, aunque Kefford (1959) había sugerido el empleo de los flavonoides como indicadores de la autenticidad de los productos derivados de cítricos, Royo Iranzo (1974) no era partidario de su empleo como parámetros, al no estar uniformemente distribuidos por el fruto y ser variables en los zumos las proporciones de suero y de pulpa. Efectivamente, Davis (1947) había encontrado más flavanona en el albedo que en las vesículas del zumo, las membranas carpelares o el flavedo, al igual que posteriormente Swift (1965) halló que el extracto de cortezas de naranjas era más rico en principios amargos que las vesículas del zumo. En cuanto a la distribución de la naringina en la natsudaidai, Bessho et al. (1964) encontraron semejanzas con los datos

de Kefford (1959) para el pomelo: la mayor parte se encontraba en el albedo (hasta un 1,9 %), mientras que en las vesículas de zumo la proporción era mínima (0,02 a 0,03 %), lo que también se ha confirmado recientemente por Su et al. (1998). Y es que en los frutos cítricos, en general, la distribución de los flavonoides no es homogénea y siempre las concentraciones en las cortezas (concretamente en el albedo) son superiores a las de la pulpa o su zumo, que a su vez son mayores que en las semillas (Premi et al., 1994; Yusof et al., 1990; Río et al., 1998; Sheu y Gow, 1997; McIntosh y Mansell, 1997; Jong et al., 1996). Esto también implica que las concentraciones de glucósidos en el zumo dependan de las condiciones tecnológicas de operación, como han puesto de manifiesto Grandi et al. (1994) para el zumo de limón, en el que la hesperidina, menos soluble, tiende a quedar en la fase sólida mientras que la eriocitrina pasa al líquido, por lo que los zumos de segunda prensada tendrían altas concentraciones de ésta y bajas de hesperidina.

Sin embargo y a pesar de todo lo expuesto, los flavonoides, determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), son los compuestos que mayor favor encuentran entre los investigadores para su empleo como parámetros indicadores de la identidad y pureza de los cítricos. Los perfiles de las antoxantinas son tan característicos y típicos de los vegetales que los contienen, que hasta se ha propuesto su uso para aplicaciones tales como la detección de miel en el turrón de Jijona (Tomás et al., 1992) o la identificación del origen botánico de la miel (Ferrerres et al., 1996). Precisamente Ferrerres et al. (1993) se habían ocupado con anterioridad de buscar un parámetro distintivo para la miel de azahar frente a las de otras procedencias, concluyendo que no podía ser otro que la hesperetina.

Fernández et al. (1992) analizaron zumos comerciales de diversas frutas, identificando las sustancias fenólicas características de cada especie, que proponen como parámetros para detectar mezclas. Mouly et al. (1994) estudiaron 124 muestras de zumos de limón, lima, toronja y naranja dulce, encontrando que en limón y lima predominan eriocitrina y hesperidina, en la

naranja dulce narirutina y hesperidina y en la toronja narirutina y naringina. La aplicación del análisis discriminante a los resultados obtenidos permitieron diferenciar eficazmente los tres grupos entre sí. Ooghe et al. (1994) adicionaron zumos de naranja amarga y de bergamota a un zumo de naranja dulce, concluyendo que era posible detectar la adulteración analizando la fracción flavonoide por HPLC y posteriormente Ooghe y Detavernier (1997, 1999) han extendido el estudio investigando el efecto de la adición de zumos de toronja o mandarina, llegando a la misma conclusión. Pupin et al. (1998) también estudiaron los zumos de naranja de Brasil, llegando a la conclusión de que mediante el análisis de flavonas polimetoxiladas se podía detectar la adición de zumos de cítricos distintos de *Citrus sinensis*, pero no la adición de extracto acuoso de pulpa.

En cuanto a otros productos, García Viguera et al. (1993) aplican el análisis de flavonoides por HPLC a derivados azucarados gelificados de *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. reticulata* y *C. limetta*, concluyendo que los perfiles de flavonoides eran característicos de cada especie y que podían utilizarse para confirmar la autenticidad de confituras, jaleas, mermeladas y marmalades. Como estos derivados se preparan escaldando con agua las cortezas y los centros, se extraen los flavonoides fijados a las partes sólidas, que se distribuyen homogéneamente por toda la masa, resultando fácil su determinación analítica. La influencia de la temperatura de extracción de las muestras ha sido estudiada por Robards et al. (1997), que observan diferencias significativas entre los tratamientos en frío y en caliente. Por este motivo, es de esperar que las condiciones térmicas durante la elaboración de los derivados afecten a su contenido de antoxantinas, como también debe influir el procedimiento seguido para obtener los preparados básicos intermedios. A efectos de estimar a partir de los flavonoides la proporción de fruta en el producto final hay que tener en cuenta que unos fabricantes incorporan a los centros tamizados las cortezas con su agua de cocción, mientras que otros añaden las cortezas, descartando el agua que contiene solubilizados los flavonoides extraídos del albedo, la parte más rica del fruto.

Tipo de Manipulación	Parámetro Analítico	Metodología	Referencias
Adición de Agua	Relación de isótopos $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$	Espectrometría de masas	Brause <i>et al.</i> (1984) Nissenbaum <i>et al.</i> (1974)
Adición de Azúcar	Relación de isótopos $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ $^2\text{H}/^1\text{H}$ Oligosacáridos	Espectrometría de masas SNIF-RMN HPLC-intercambio iónico/ Detector amperométrico de pulso (DAP) CG-FID	Koziet y Bricout (1997) Donor y Bills (1981) Martin (1992) Swallow <i>et al.</i> (1991) Low (1996)
	Anticuerpos	Inmunoensayo	Potter y Mansell (1992)
Adición de extracto acuoso de pulpa	Benzoico Carotenoides, flavonoides, polifenoles, y ácido ascórbico Pectinas: Galacturónico Perfil de minerales Fenoles, flavonoides, Aminoácidos Carotenoides	HPLC-UV/VIS Método Petrus: Espectrofotometría UV/VIS y Fluorimetría Electroforesis Capilar HPLC- DAP Espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma acoplada por inducción -reconocimiento de patrón HPLC-UV/VIS-patrón de reconocimineto HPLC/ UV/VIS	A.O.A.C. (1996) Petrus y Ataway (1980) Cancalon (1999) Balmer y McLellan (1996) Nikdel <i>et al.</i> (1991) Perfetti <i>et al.</i> (1988) Pupin <i>et al.</i> (1999)
Mezclas no declaradas	Glucósidos flavónicos Esteroles	HPLC-fase reversa CG-MS	Rouseff (1988) Lay y Hupe (1998)
Adición no declarada de minoritarios	Aminoácidos Ácidos orgánicos Cítrico/Isocítrico	Índice de formol HPLC-intercambio iónico Enzimático	Ting y Rouseff (1986) Busling y Ting (1977)

TABLA IV – Resumen de las técnicas de detección de fraudes y adulteraciones en derivados de cítricos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

La presente tesis doctoral consta de dos partes bien diferenciadas. En la primera de ellas se investiga la composición mineral de porciones sólidas de las naranjas amargas (cortezas y pulpas) y su finalidad es contribuir a la caracterización de la fruta. En la segunda se analizan derivados de naranjas amargas (preparados básicos, confituras, mermeladas, marmalades) para estudiar la influencia de la formulación y de la elaboración sobre el contenido de flavonoides.

3.1. COMPOSICIÓN MINERAL DE LAS NARANJAS

Dentro de un proyecto encaminado a una más completa caracterización de las naranjas amargas sevillanas, se planteó esta tesis para afrontar el estudio de la composición mineral de las cortezas (epicarpio y mesocarpio) y de los sólidos del endocarpio. Paralelamente, otras investigaciones complementarias habrían de abordar el estudio de la influencia de tratamientos tecnológicos (tamizado, centrifugación, clarificación, concentración) sobre la composición y las características reológicas de los zumos o el estudio de la composición de las semillas, caracterizando su aceite y el residuo de su extracción con disolventes. Por diversas circunstancias, aparte de esta tesis, solamente se completó la caracterización del aceite de semillas (Romero et al., 1988).

3.1.1. Muestras de naranjas y su acondicionamiento

Para tomar las muestras se eligió la zona de recepción de una fábrica destinada a la transformación industrial de cítricos, mayoritariamente naranjas amargas, a donde llegaban procedentes del Valle del Guadalquivir (provincias de Sevilla y Córdoba) y, en menor medida, del Valle del Guadalhorce (provincia de Málaga). Aunque la mayor parte de las naranjas venían directamente de las huertas, a principios de la campaña de industrialización también se recibían los destriós de instalaciones de acondicionamiento para la venta en fresco, por lo

que a fin de utilizar sólo naranjas recién recolectadas se comenzaba a tomar muestras una vez finalizado el mes de Enero.

Para asegurar la representatividad se toman alrededor de 5 kg de naranjas, evitando las que tienen desgarrada la corteza en el polo de unión con el pedúnculo, ya que existe la posibilidad de que su interior esté contaminado. A continuación la muestra se traslada al laboratorio y donde se "desbotonan" (se les quitan los pedúnculos) cuidando de no perforar la corteza. Después se lavan bajo chorro de agua potable, mientras se frotan con un cepillo de nilón, se enjuagan con varios pequeños volúmenes de agua destilada y se dejan estar al aire a la temperatura ambiente, hasta que se observa que están externamente secas. Posteriormente, se cuenta el número de unidades y se pesan. Salvo que se indique otra cosa, todas las pesadas de las frutas y de las fracciones que de ellas resultan se hacen con una precisión de 0,1 g.

La manipulación de las frutas y posteriormente la de sus partes, se debe llevar a cabo con las precauciones necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación, especialmente con los elementos que se investigan. Con carácter general, el material de laboratorio utilizado en contacto con las muestras y los reactivos es de vidrio borosilicato (excepto las cápsulas, de porcelana y las espátulas, de acero inoxidable al Cr-Ni-Mo 18/8/2). El material auxiliar es de plástico de calidad alimentaria (recipientes, exprimidor...) o de acero inoxidable al Cr-Ni 18/8 (cuchillos, cuchillas...). Siempre se trabaja sobre bandejas de plástico alimentario, que también se usan para cubrir las muestras durante las manipulaciones. Todo el material que se usa está adecuadamente lavado y enjuagado con agua destilada (en aparato de vidrio borosilicato). Las manos se protegen con guantes quirúrgicos de látex (lavados y enjuagados) y en aquellos casos en que hay que utilizar la mano desnuda, tras de lavarla bien también se enjuaga con agua destilada.

Una vez pesada la muestra, las naranjas se cortan en mitades por su ecuador y se exprimen, sin dañar el albedo, en un extractor mecánico de piña rotatoria

(Braun Citromatic), obteniéndose las cortezas, el zumo y un residuo. A las cortezas se les quitan manualmente los restos de endocarpio adheridos (membranas...), que se unen al residuo, pesándose las fracciones obtenidas. El zumo se estabiliza por adición conjunta de ácido fórmico (0,4 %) y ácido sórbico (0,03 %), se deja estar 24 h a la temperatura ambiente y se pasa por un tamiz de 1-2 mm de luz, centrifugándose a continuación a 1980xg. Se unen las pulpas procedentes del tamizado y de la centrifugación y se pesan, como también se pesa el zumo.

Las pulpas se introducen en frascos de polietileno con doble cierre (de presión y roscado), que se marcan con el número de muestra, la fecha y el peso al envasar. Se eligen recipientes de tal capacidad que quede el mínimo volumen hueco. Si no van a analizarse inmediatamente, se mantienen a -18°C hasta su análisis.

Para asegurar la representatividad, de la corteza de cada naranja se toma una octava parte para constituir la muestra compuesta del lote, que se pesa, se introduce en un frasco de plástico, de la capacidad apropiada, con doble cierre (presión y rosca), que se marca con el número de muestra, la fecha y el peso al envasar. A una fracción representativa de las cortezas no utilizadas se le determina el contenido de agua y el resto se descarta. Si no van a analizarse inmediatamente, se mantienen a -18°C hasta su análisis.

3.1.2. Preparación de las muestras para análisis

Cortezas. Si las cortezas han permanecido congeladas, se pasa el tarro cerrado a un frigorífico, donde debe permanecer entre 24 y 72 horas, hasta que no se aprecie la presencia de hielo y adquieran al equilibrarse la humedad el aspecto de cortezas frescas. Media hora antes de proceder con la etapa siguiente (secado) se deja atemperar el recipiente fuera del frigorífico (desaparecen así las condensaciones del vapor de agua atmosférico sobre él)

y se pesan para saber si ha habido pérdida de humedad, para tenerlo en cuenta en los cálculos posteriores. A partir de este momento, se procede igual tanto en el caso de cortezas descongeladas como en el de cortezas frescas. Se tara una bandeja perforada de plástico resistente al calor y se extienden las cortezas sobre ella, introduciéndola a continuación en una estufa con convección forzada de aire a 105°-110° C y manteniéndola allí durante 15 h. Se sacan y se dejan atemperar, pasándolas a tarros tarados y se pesan. Después las cortezas se van moliendo finamente en una picadora de cuchillas (Braun) y se pasan a una cápsula de porcelana, tarada, de 20 cm de diámetro, que se introduce en la estufa durante 90 minutos a la misma temperatura anterior, dejando atemperar luego y pesando, guardándose en un recipiente de plástico con doble tapa, que se marca con sus datos identificativos.

Pulpas. Las pulpas congeladas también se transfieren al frigorífico y se dejan estar entre 24 y 48 horas para que se descongelen, manteniéndose a temperatura ambiente durante media hora para que se atemperen, antes de proceder a posteriores tratamientos.

Previamente a la determinación analítica de los diferentes elementos, las muestras de corteza seca y molida o de pulpa, fresca o descongelada, han de mineralizarse por vía húmeda, utilizándose un procedimiento cuando se va a determinar nitrógeno y otro cuando se trata de los demás elementos. Para que los resultados obtenidos se puedan comparar con los de trabajos anteriores (Royo y Romero, 1973; Borrero y Romero, 1986), los métodos utilizados para las digestiones son los mismos utilizados en aquéllos. Los arrastres y diluciones, salvo que se especifique lo contrario, se hacen con agua bidestilada, obtenida hirviendo en aparato de vidrio borosilicato el agua destilada, acidulada con ácido sulfúrico (para análisis, Panreac), con permanganato potásico (para análisis, Panreac), almacenándose hasta su uso en recipiente de polietileno.

3.1.2.1. Mineralización para nitrógeno según Kjeldahl (A.O.A.C., 1970). En un matraz piriforme de digestión, de 250-300 mL de capacidad, se introduce 1 g de polvo de corteza o 5 g de pulpa (pesados con precisión de 0,1 mg) y alrededor de 0,1 g de selenio en polvo, que se arrastran con un poco de agua bidestilada, debiendo quedar un sólido viscoso. Se añaden 25 mL de ácido sulfúrico para análisis (Merck), se coloca un embudito de rama larga en la boca del matraz y se calienta en vitrina de gases, aumentando progresivamente la temperatura hasta que quede un residuo incoloro. Se deja enfriar y se trasvasa cuantitativamente (sucesivas pequeñas porciones de agua bidestilada) a un recipiente de vidrio con cierre esmerilado.

3.1.2.2. Mineralización según Safina (1960). En un matraz piriforme de digestión, de 250-300 mL de capacidad, se introducen 5 g de polvo de corteza seca o 20 g de pulpa (precisión de 0,1 mg), arrastrando con un poco de agua bidestilada, debiendo quedar una pasta húmeda. A continuación, en vitrina de gases, se añaden 20 mL de ácido nítrico y se calienta suavemente durante media hora. En este punto, se le añaden, previamente mezclados, 20 mL de ácido nítrico (para análisis, Merck), 8 mL de ácido perclórico (para análisis, Merck) y 2 mL de ácido sulfúrico (para análisis, Merck). Se pone en la boca un embudito con rama larga y se aumenta la calefacción, prolongándola hasta que los humos blancos predominen sobre los rojos y el líquido esté incoloro. Tras dejar que se enfríe, se arrastra cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL usando disolución 0,5 N de ácido clorhídrico (reactivo para análisis, Erba), enrasando con la misma disolución. Después se trasvasa a un frasco de plástico con doble cierre (presión y rosca).

De estos líquidos se parte para analizar: en el caso de la determinación de nitrógeno según Kjeldahl no se diluye y se utiliza todo el volumen; en el resto de los casos, se parte de diluciones conocidas de la disolución de digestión; en el caso del fosfato hay que efectuar previamente una evaporación a sequedad.

3.1.3. Determinaciones analíticas

3.1.3.1. Humedad de las cortezas. Un peso conocido de cortezas (precisión 0,1 g) se hierve con tolueno y se mide el volumen de agua recogido al condensar los vapores, según la norma UNE 55001 (IRANOR, 1973). El resultado se expresa como mL de agua por g de corteza fresca.

3.1.3.2. Nitrógeno según Kjeldahl. A la muestra resultante de la digestión sulfúrica (3.1.2.1.) se le añaden unas gotas de disolución de fenolftaleína y, en un aparato de destilación por arrastre con vapor (Selecta, Dosigen) se alcaliniza con disolución 10 N de NaOH (para análisis, Panreac) hasta coloración roja, destilándose y recogiendo el destilado sobre 30 mL de disolución 0,1 N de ácido bórico (para análisis, Merck). El contenido del matraz colector se trasvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL, arrastrando con sucesivas pequeñas porciones de agua bidestilada, hasta enrasar. Del contenido homogeneizado de este matraz se toman 5 mL y se diluyen con agua bidestilada hasta 100 mL en un matraz aforado. Al contenido de este matraz se le añaden 2 mL de disolución de tartrato sódico-potásico y 4 mL de Reactivo Nessler, se uniforma el contenido y se transfiere a una cubeta de vidrio óptico, de 10 mm de paso de luz, midiendo la absorbancia a 425 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, Spectronic 70, frente a un blanco constituido añadiendo las mismas cantidades de reactivos a la disolución resultante de diluir 30 mL de disolución 0,1 N de ácido bórico hasta 100 mL, con agua bidestilada (APHA-AWWA-WPCF, 1980). El resultado se expresa como N.

3.1.3.3. Fosfatos. Se determinan espectrofotométricamente a partir de la formación de un complejo de ácido fosfomolibdico (Murphy y Riley, 1962). Para ello, 2 mL de la disolución de digestión según Safina (3.1.2.2.) se transfieren a un vasito de precipitados de 100 mL, forma alta y se evaporan hasta casi sequedad en vitrina de gases (se considera finalizada la operación cuando no se desprenden más humos blancos). El residuo se recoge con sucesivas

pequeñas porciones de agua bidestilada y se pasa a un matraz aforado de 100 mL, homogeneizando el contenido. En un vaso de precipitados de 100 mL se ponen 50 mL de esta disolución y se le añaden 8 mL de un reactivo mixto, previamente preparado con 50 mL de disolución 5 N de ácido sulfúrico (para análisis, Merck), 5 mL de disolución de tartrato antimónico potásico (0,2743 g de reactivo para análisis, Erba, disueltos en 100 mL de agua destilada) y 30 mL de disolución 0,01 M de ácido ascórbico (para análisis, Erba). Muestra y reactivo se llevan a 50 mL (matraz aforado) con agua destilada, se guarda en la oscuridad 10 minutos (no más de 30), para que se desarrolle el color azul y se trasvasa a una cubeta de vidrio óptico, con 10 mm de paso de luz, midiendo la absorbancia a 880 nm frente a un blanco (que no debe desarrollar color azul) preparado, de igual manera, con agua destilada y reactivo. El resultado se expresa como fósforo. A fin de evitar la contaminación por fosfatos de los detergentes, todo el material utilizado en esta determinación se lava con mezcla crómica y se enjuaga finalmente con agua bidestilada.

3.1.3.4 Calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y sodio. Se determinan por espectrofotometría de absorción atómica sobre las muestras procedentes de la digestión según Safina (3.1.2.2.), utilizando un aparato Perkin Elmer 2380 y llama aire-acetileno. Las condiciones operativas para los distintos elementos se indican en la tabla V. Para la determinación del calcio el líquido de digestión se diluye 20 veces para la pulpa y 250 veces para las cortezas, añadiéndose SrCl_2 hasta 325 ppm, para evitar las interferencias por ionización (a los patrones, también). El cinc, el cobre, el hierro y el manganeso se determinan en el líquido de digestión, sin diluir. El magnesio en la pulpa se determina diluyendo 20 veces y en la corteza 50 veces, incorporando tanto a las muestras como a los patrones SrCl_2 , hasta 325 ppm, para eliminar interferencias. La determinación del potasio también requiere la previa dilución del líquido de digestión, 50 veces el de la pulpa y 200 veces el de las cortezas. Para determinar el sodio en la pulpa no hay que diluir, pero en el caso de las cortezas se diluye 5 veces.

Elemento	λ (nm)	Rendija (nm)	Intensidad (mA)	Sensibilidad para 1% abs. (ppm)	Intervalo lineal (ppm)	Corrección interferencias
CALCIO (Ca)	422,7	0,7	15	0,08	0 – 5	+ 325 ppm SrCl ₂
CINC (Zn)	213,9	0,7	15	0,018	0 – 1	
COBRE (Cu)	324,8	0,7	12	0,09	0 – 5	
HIERRO (Fe)	248,3	0,2	25	0,12	0 – 5	
MAGNESIO (Mg)	285,2	0,7	15	0,007	0 – 0,5	+ 325 ppm SrCl ₂
MANGANESO (Mn)	279,5	0,2	12	0,055	0 – 3	
POTASIO (K)	766,5	2,0	15	0,04	0 – 2	
SODIO (Na)	589,0	0,7	12	0,015	0 - 1	

TABLA V. Determinaciones por absorción atómica: condiciones operativas.

3.2. CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN DERIVADOS.

3.2.1. Muestras. Dentro de este capítulo cabe distinguir entre muestras adquiridas en el comercio durante 1997 y muestras preparadas en el laboratorio en 1998. Las comerciales correspondían a derivados azucarados de diversos cítricos (confitura, mermelada, marmalade), mientras que en el laboratorio se elaboraron derivados azucarados y preparados básicos únicamente de naranjas amargas.

3.2.1.1. Muestras comerciales. A continuación se presentan los datos que constan en las etiquetas de los derivados comerciales:

DC01 “Mermelada de naranja gusto inglés Extra”

Marca: Bebé

Ingredientes: naranja con corteza en tiras, azúcar, jarabe de glucosa, espesante E-410.

Contenido de fruta: 40 g por 100 g

Contenido de azúcar: 60 g por 100 g

- DC02 "Mermelada de naranja"
Marca: El Corte Inglés
Ingredientes: naranjas amargas, azúcar, corteza en tiras.
Contenido de fruta: 30 g por 100 g
Contenido de azúcar: 68 g por 100 g
- DC03 "Traditional orange marmalade, thick cut"
Marca: Nelson`s
Ingredientes: jarabe de azúcar, naranjas
Contenido de fruta: 30 g por 100 g
Contenido de azúcar: 63 g por 100 g
- DC04 "Confitura de naranja Extra"
Marca: Pryca
Ingredientes: azúcar, jarabe de glucosa, gelificante: pectina, acidulante: ácido cítrico.
Contenido de fruta: 45 g por 100 g
Contenido de azúcar: 60 g por 100 g
- DC05 "Auténtica mermelada de naranja amarga (Diet)"
Marca: La Vieja Fábrica
Ingredientes: naranjas amargas de Sevilla, fructosa, acidulante: ácido cítrico, gelificante: pectina, conservador: E-202.
Contenido de fruta: 48 g por 100 g
Contenido de fructosa: 52 g por 100 g
- DC06 "Marmalade de pomelo Rubi"
Marca: St Michael
Ingredientes: pomelo Rubi, concentrado de zumo de pomelo, ácido ascórbico, ácido cítrico, gelificante: pectina.
Contenido de fruta: 50 g por 100 g
Contenido de azúcar: 66 g por 100 g

- DC07 "Confitura Extra de naranja amarga"
Marca: Hero
Ingredientes: azúcar, naranja amarga, agua, jarabe de glucosa, gelificante: pectina.
Contenido de fruta: 30 g por 100 g
Contenido de azúcares: 63 g por 100 g
- DC08 "Mermelada de naranja amarga"
Marca: Bonne Maman
Ingredientes: Azúcar, naranjas amargas, azúcar de caña, eventualmente gelificante natural: pectina de frutas y ácido cítrico.
Contenido de fruta: 28 g por 100 g
Contenido de azúcares: 60 g por 100 g
- DC09 "Organic breakfast Seville Orange"
Marca: Meridian
Ingredientes: naranjas de cultivo biológico, zumo de manzana de cultivo biológico, gelificante: pectina de lima.
Contenido de fruta: 100 g por 100 g
- DC10 "Mermelada Extra de naranja con fructosa"
Marca: Santiveri
Ingredientes: Pulpa de naranja, fructosa, espesantes: pectina y goma de garrofín, zumo de limón.
Contenido de fruta: 60 g por 100 g
Contenido de azúcares: 39,8 g por 100 g
- DC11 "Confitura Extra de naranja dulce"
Marca: Hero
Ingredientes: azúcar, naranja, jarabe de glucosa, gelificante: pectina, acidulante: ácido cítrico.
Contenido de fruta: 30 g por 100 g

Contenido de azúcares: 63 g por 100 g

- DC12 "Auténtica mermelada de naranja dulce"
Marca: La Vieja Fábrica
Ingredientes: naranjas, azúcar, acidulante: ácido cítrico, gelificante: pectina, conservador: E-202.
Contenido de fruta: 45 g por 100 g
Contenido de azúcares: 53 g por 100 g
- DC13 "Auténtica mermelada de naranja amarga"
Marca: La Vieja Fábrica
Ingredientes: naranja, azúcar, acidulante: ácido cítrico
Contenido de fruta: 40 g por 100 g
Contenido de azúcares: 65 g por 100 g
- DC14 "Marmalade de naranja (trozos medianos)"
Marca: St Michael
Ingredientes: azúcar, naranja, agua, ácido cítrico, pectina.
Contenido de fruta: 27 g por 100 g
Contenido de azúcar: 66 g por 100 g
- DC15 "Marmalade de naranja (trozos finos)"
Marca: St Michael
Ingredientes: azúcar, zumo de naranja, agua, corteza de naranja, pectina, ácido cítrico, aceite de naranja.
Contenido de fruta: 27 g por 100 g
Contenido de azúcar: 66 g por 100 g
- DC16 "Jam orange conserve (Confiture d'orange)"
Marca: St Michael
Ingredientes: azúcar, naranja, zumo de naranja, pectina, antioxidante, ácido cítrico, aceite de naranja, citrato sódico.

Contenido de fruta: 35 g por 100 g

Contenido de azúcar: 66 g por 100 g

DC17 "Marmalade de limón y lima"

Marca: St Michael

Ingredientes: zumo de limón, agua, limón, lima, pectina, ácido cítrico, aceite de limón, aceite de lima.

Contenido de fruta: 27 g por 100 g

Contenido de azúcar: 66 g por 100 g

3.2.1.2. Preparados básicos con cortezas. Con el fin de no estar sujetos a limitaciones geográficas (lugar de producción de la fruta) ni temporales (temporada de recolección) y poder así confeccionar los derivados azucarados (mermeladas, confituras, jaleas y marmalades) en cualquier localización y durante todo el año, los fabricantes de productos finales parten de zumos o productos semielaborados, denominados genéricamente "preparados básicos". Éstos se elaboran durante las campañas citrícolas en factorías próximas a los huertos, de acuerdo con el esquema general que se muestra en la figura 4. Aunque el procedimiento descrito se refiere a la naranja amarga, en líneas generales es semejante para cualquier especie o variedad de cítricos. Los frutos, una vez realizadas las operaciones previas y preliminares, se parten en mitades o cuartos (según la maquinaria utilizada) y se separan las cortezas de los centros (endocarpio). Como los derivados azucarados llevan normalmente una cierta proporción de corteza, los cuartos o mitades se cortan en trozos de forma y tamaño prefijados. Con el fin de ablandarlas, inactivar los enzimas pécticos y de solubilizar las pectinas, se cuecen con agua por separado cortezas y centros. Posteriormente, los centros con su agua de cocción se tamizan, siendo el grado de separación función del tipo de producto a que se destine. Así, para confituras, mermeladas y marmalades se rechazan solamente semillas y partes duras, mientras que para jaleas se beneficia únicamente el extracto acuoso, que luego se filtra. Por último, se le añaden las cortezas escaldadas, con o sin su agua de cocción.

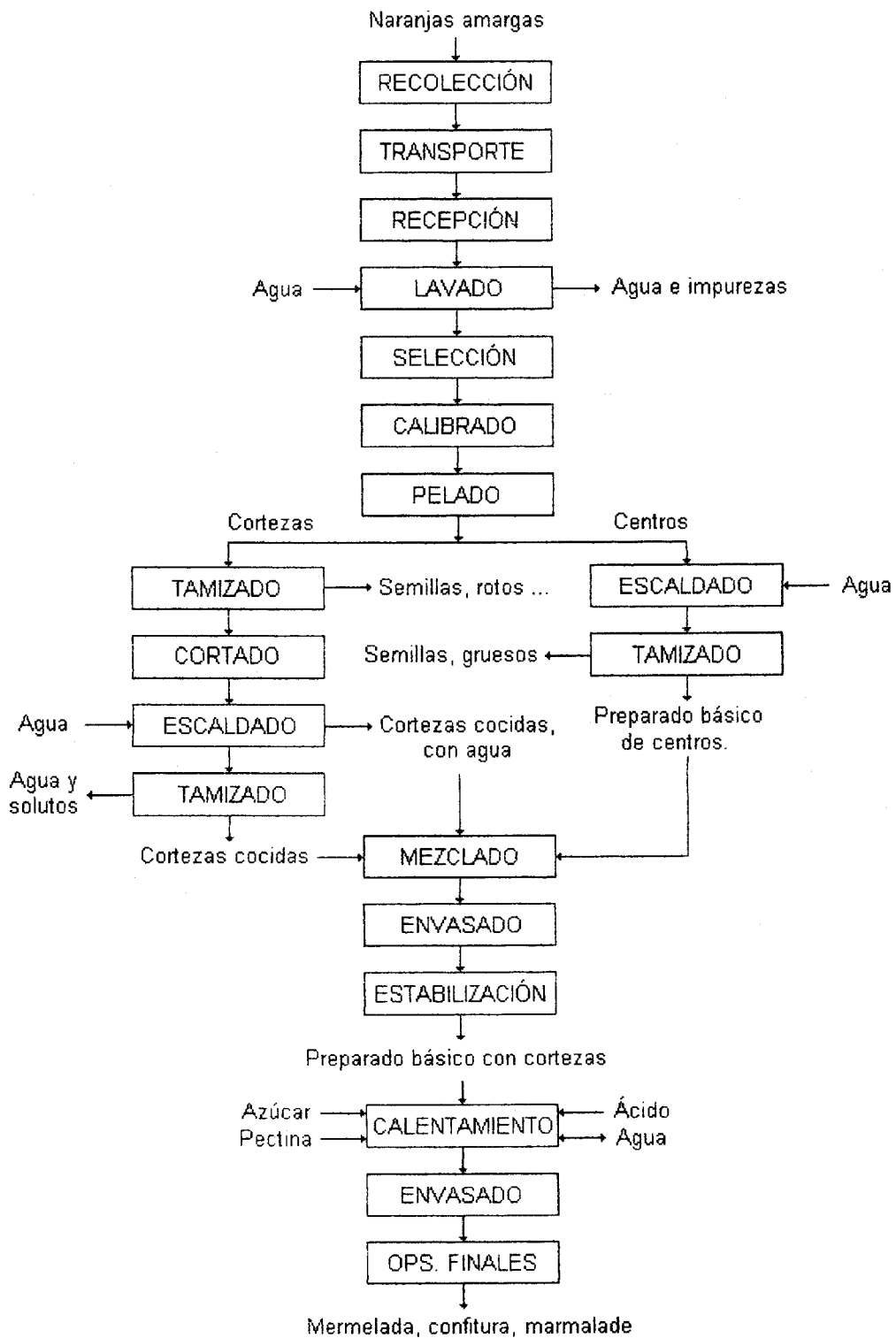


FIGURA 4- Esquema de elaboración de derivados de naranjas amargas.

A partir de un mismo lote de naranjas, recolectadas en el mes de Marzo de 1998 en una plantación comercial de la comarca de Los Alcores, término municipal de Carmona (Sevilla) y antes de que hubiesen transcurrido 24 h desde su recolección, se elaboraron dos preparados básicos, controlando las cantidades de materia prima, de producto final y de residuos. La razón fue que algunos fabricantes incorporan el agua de cocer las cortezas y otros no y que la mayor concentración de glucósidos flavonoides se da en el albedo.

- PB-A. Se partió de 1335,5 g de naranjas amargas, que dieron 751,5 g de centros y 584,0 g de cortezas. A los centros se le añadieron 190 g de agua y se cocieron durante 30 minutos, tamizándose a continuación por un pasapurés de 1 mm de luz y obteniéndose 107 g de residuo. 256 g de cortezas se cortaron en tiras de 1,5-2,0 mm de ancho y se cocieron con 570 g de agua durante 30 minutos. La mezcla de las cortezas con su agua y de los centros tamizados dio 1351,1 g de un preparado básico con 8,0° Brix y un pH de 3,25.
- PB-B. Se partió de 1320,5 g de naranjas amargas, que dieron 791 g de centros y 529,5 g de cortezas. A los centros se le añadieron 460 g de agua y se cocieron durante 30 minutos, tamizándose a continuación por un pasapurés de 1 mm de luz y obteniéndose 107,6 g de residuo. 256 g de cortezas se cortaron en tiras de 1,5-2,0 mm de ancho y se cocieron durante 30 minutos con 570 g de agua, tamizándose a continuación. Las cortezas cocidas escurridas se mezclaron a los centros tamizados, resultando 1224,0 g de un preparado básico con 8,5° Brix y pH 3,06. El agua de cocción de las cortezas tenía 8,0° Brix y pH 4,69.

Cada preparado básico se envasó en caliente (a más de 80° C) en frascos de vidrio con cierre "Twist-Off", se invirtieron los tarros durante 15 minutos para esterilizar las tapas y se dejaron enfriar a la temperatura ambiente. El contenido de fruta de cada uno de los preparados básicos (PB) elaborados (la fruta que

realmente queda incorporada al producto) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de fruta (\%)} = 100 \cdot (\text{g de corteza} + \text{g de centros} - \text{g de residuo}) / \text{g PB}$$

resultando que el PB-A tiene 66,65 % de fruta y el PB-B 76,75 % de fruta. A pesar de que en el PB-A todos los constituyentes solubles de la fruta quedan en el preparado, el agua de cocer las cortezas que se incorpora contabiliza negativamente para la fruta, mientras que en el PB-B, que ha perdido con ese agua parte de los constituyentes solubles de la corteza, su no adición contribuye positivamente a la proporción de fruta. En todo caso, a efectos de los cálculos de contenidos de fruta en los derivados azucarados, cuya preparación se expone a continuación, se tomarán los porcentajes de fruta estimados de acuerdo con la fórmula de más arriba.

3.2.1.3. Elaboración de derivados azucarados en laboratorio. Con cada preparado básico se elaboran diversos derivados azucarados de modo que se cubra una amplia gama de contenidos de fruta y de azúcares, para que resulten valores que queden tanto dentro de los intervalos fijados por las Normas vigentes para confituras, confituras extra, mermeladas, mermeladas extra y marmalades (R.D. 670/1990), como fuera de ellos (tabla VI). No se ha pretendido que los productos resultantes tengan la textura que dicen las Normas, por lo que ni se ha añadido pectina ni se ha controlado el pH, para no introducir otras fuentes de variabilidad. Los únicos ingredientes utilizados han sido preparado básico, azúcar y agua, recogándose todas las formulaciones elaboradas en la tabla VII. Para su elaboración se ponen en una olla cantidades conocidas de preparado básico y de agua, se mezclan bien mientras se lleva a ebullición y se añade poco a poco el azúcar hasta completa disolución. Una vez añadido el azúcar se mantiene en ebullición suave durante unos 15 minutos y se envasa en caliente (a no menos de 80°C) en tarros de vidrio con cierre "Twist-Off", que se cierran e invierten durante 5 minutos, dejando enfriar posteriormente a la temperatura ambiente.

CONSISTENCIA	SÓLIDOS SOLUBLES	DENOMINACIÓN	MATERIA PRIMA	g DE FRUTA POR 100 g
Gelificada	≥ 55° Brix	CONFITURA EXTRA	Frutas troceadas	≥ 45
		CONFITURA		≥ 35
		JALEA EXTRA	Zum o extracto acuoso	≥ 45
		JALEA		≥ 35
		MARMALADE	Al menos el 75 % del endocarpio	≥ 20
Semilíquida o espesa	40° a 60° Brix	MERMELADA EXTRA	Trozos de frutas	≥ 40
		MERMELADA	Frutas trituradas o tamizadas	≥ 20

TABLA VI – Derivados azucarados de cítricos: características (RD 670/1990)

Preparado básico		Azúcar (g)	Agua (g)	Peso neto final (g)	g de fruta por 100 g de producto
Tipo	g				
PB-A	41,0	130,0	155,0	247,2	11,05
	82,0	126,0	115,0	247,1	22,12
	163,0	118,0	45,0	250,0	43,46
	102,0	151,0	70,0	241,0	28,21
	143,0	147,0	35,0	252,8	37,70
	184,0	143,0	0,0	247,7	49,51
	41,0	157,0	125,0	253,7	10,77
	82,0	153,0	90,0	243,2	22,47
	123,0	149,0	55,0	245,0	33,46
PB-B	41,0	130,0	155,0	214,6	12,73
	82,0	126,0	115,0	224,5	24,34
	163,0	118,0	45,0	228,0	47,65
	204,0	114,0	10,0	216,0	62,95
	102,0	151,0	70,0	248,8	27,32
	143,0	147,0	35,0	250,3	38,08
	184,0	143,0	0,0	250,3	49,00
	41,0	157,0	125,0	244,1	11,20
	82,0	153,0	90,0	248,8	22,02
123,0	149,0	55,0	255,6	32,07	

TABLA VII – Derivados azucarados preparados en el laboratorio.

3.2. 2. Preparación de las muestras para análisis.

Antes de proceder a la determinación analítica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), hay que extraer los flavonoides de las muestras. Dada la diversidad de técnicas descritas en la literatura científica (tabla VIII), se han realizado unas experiencias previas para elegir el disolvente más adecuado y determinar las condiciones de extracción. En los párrafos que siguen, cuando se mencione el uso de agua o agua ultrapura, se refiere a la purificada en aparato Milli-Q (Millipore).

3.2.2.1. Disolvente. Se realiza un ensayo de extracción utilizando por una parte dimetilsulfóxido (DMSO) (Castillo et al., 1991) y por otra mezclas metanol-agua (MeOH:H₂O) (Tomás-Lorente et al., 1992; García-Vigueras et al., 1993). En general, el procedimiento consiste en homogeneizar 10 g (precisión de 0,1 mg) de derivados comerciales de naranja amarga y dulce, con 20 mL de disolvente y después extraer durante media hora en baño de ultrasonidos; el extracto se lleva a un volumen constante de 25 mL, tras de filtrar. La eficacia de la extracción se determina mediante la aplicación a los extractos del método de Folin-Ciocalteu para fenoles totales. Como se observa en la figura 5, el porcentaje de extracción es superior cuando se utiliza MeOH:H₂O, lo que unido a la menor toxicidad de este disolvente frente al DMSO, lo convierten en el disolvente de elección.

3.2.2.2. Tiempo de extracción. Para investigar el efecto del tiempo de contacto sobre la extracción, se toman 5 g de derivado de fruta (precisión 0,1 mg) y se homogeneizan durante 60 minutos con 20 mL de MeOH: H₂O (4:1), en baño de ultrasonidos. Se trabaja con una sola muestra y a los 15 min, 30 min, 45 min y 60 min se toma 1 mL de la mezcla, se lleva a 10 mL con agua ultrapura, se filtra y se analiza por HPLC. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos, observándose que la máxima eficacia de recuperación se da después de 30-45 minutos, por lo que se eligió un tiempo de extracción de 30 minutos.

Columna	Fase móvil	Flujo	Detector	Glicosido de flavanona*	Preparación de la muestra	Referencia
ODS-Hypersil	H ₂ O (pH 2.5 con H ₂ SO ₄) : Acetonitrilo	0.5 mL/min	UV-280 nm PDA	Nar, He		Schuster, 1986
Zorbax (ODS) C ₁₈ (25 cm x 4.6 mm)	H ₂ O: Acetonitrilo:Ácido acético glacial (79,5%; 20%; 0.5%)	1 mL/min	UV-vis	Nr, Nar, He, Nh	Sep-Pak C ₁₈ . MeOH : H ₂ O Filtro 1.2 μm	Rouseff et al., 1987
C ₁₈ Merck 10 μm	H ₂ O: Acetonitrilo (80:20, V/V)	2 mL/min	280 nm IR	Nar	Cartucho C ₁₈ Filtro 0.45 μm Nylon	Yusof et al., 1990
Nucleosil C ₁₈ , 5 μm (250 x 10 mm)	H ₂ O: MeOH : Acetonitrilo : HO acetyl (15:2:2:1)	3 mL/min	280 nm PDA	Nc, Nar, Nh	DMSO Filtro 0.45 μm Nylon	Casillo et al., 1991
LiCrochart 100 RP-18 (12.5x0.4 cm) 5 μm	H ₂ O:Ácido fórmico (disolvente A) MeOH (disolvente B)	1 mL/min	280 nm PDA	Nc, Nar, Nh	MeOH : H ₂ O (4:1) ResiNar Amberlite XAD-2	Tomás-Lorente et al., 1992
C ₁₈ Bondapak	Ácido fosfórico : MeOH en gradiente	1 mL/min	UV-280 nm PDA	Ec, Nc, Nr, Nar, He, Nh	MeOH : H ₂ O (4:1) Baño de ultrasonidos	García-Vigueras et al. 1993
LiChrospher 100 RP-18 250x4 mm, 5 μm	Metafosfórico: MeOH en gradiente	0.6 mL/min	UV-280 nm PDA	Nar, He, Nh, Ec, Nc Etc.	MeOH : DMSO (1:1)	Nogata et al., 1994
RP18 Novopak 4 μm (3.9x150 mm)	KH ₂ PO ₄ y H ₃ PO ₄	1.2 mL/min	UV-280 nm PDA	Ec, He, Nar, Nr, Nh,	Calentar, Centrifugar Filtro 0.2 μm	Ooghe et al., 1994
C ₁₈ Nucleosil 5 μm (250 x 4.6 mm)	Agua:acetonitrilo:tetrahidrofuran o:acético (80 : 16 : 3 : 1, V/V/V/V)	1 mL/min	UV-280 nm	Nr , He	DMF y C ₂ H ₈ N ₂ O ₄ .H ₂ O Centrifugar Acrodisc 0.45 μm Nylon	Pupin et al., 1998

(*) Nar: naringina; Nr: narirutina; He: hesperidina; Nh: neohesperidina; Nc: neoeriocitrina; Ec: eriocitrina

TABLA VIII - Cromatografía aplicada a la determinación de glicósidos de flavanonas en derivados de cítricos.

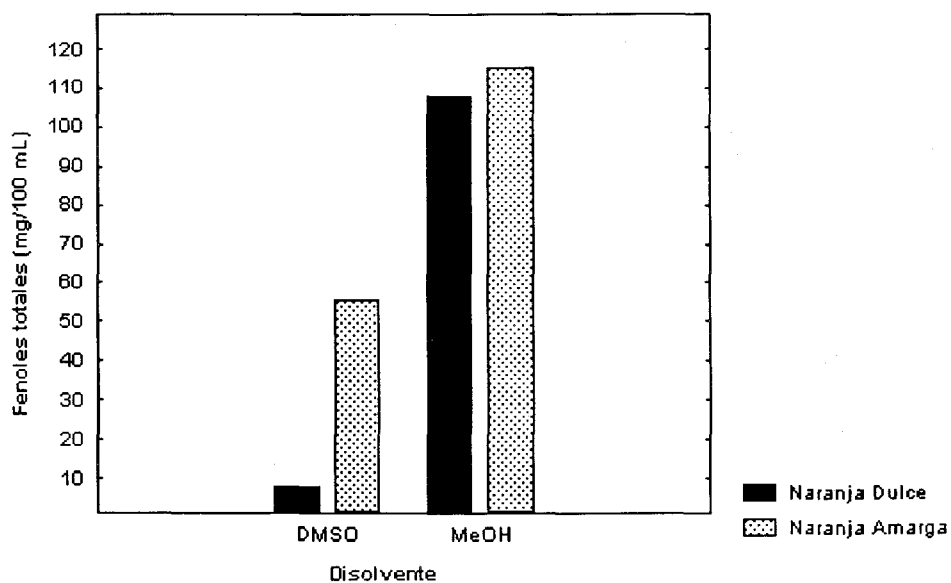


FIGURA 5 – Compuestos fenólicos extraídos

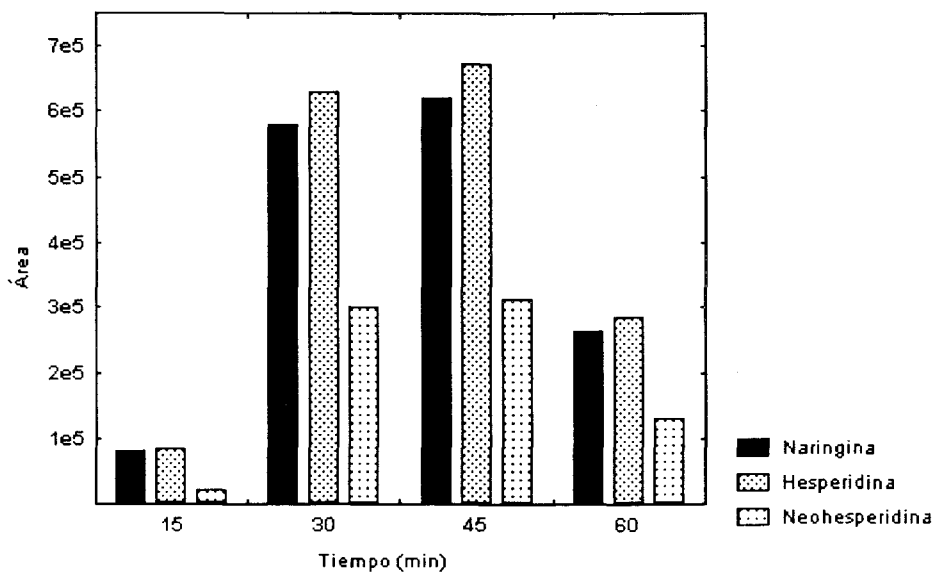


FIGURA 6 – Influencia del tiempo de extracción

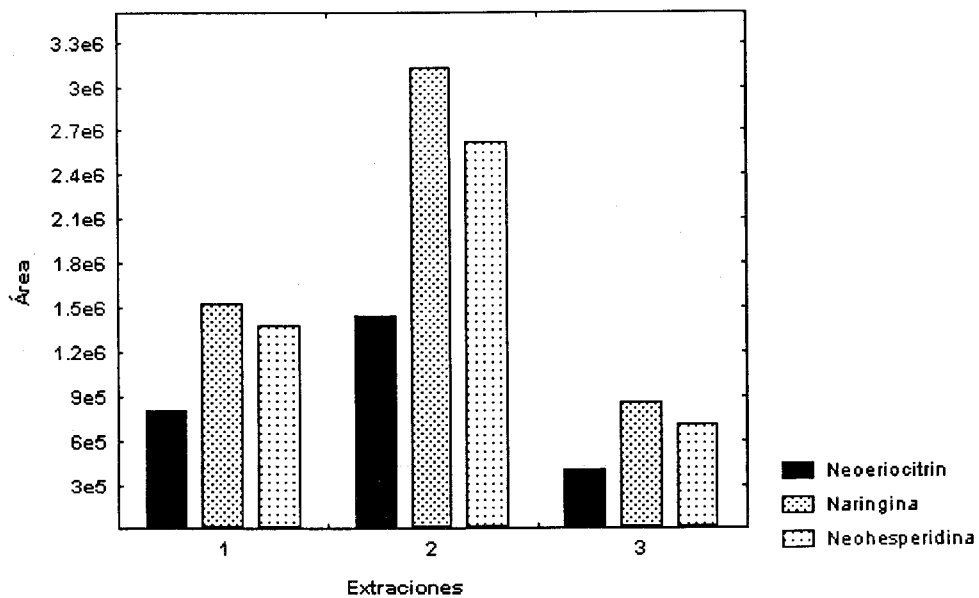


FIGURA 7 – Efecto de extracciones sucesivas

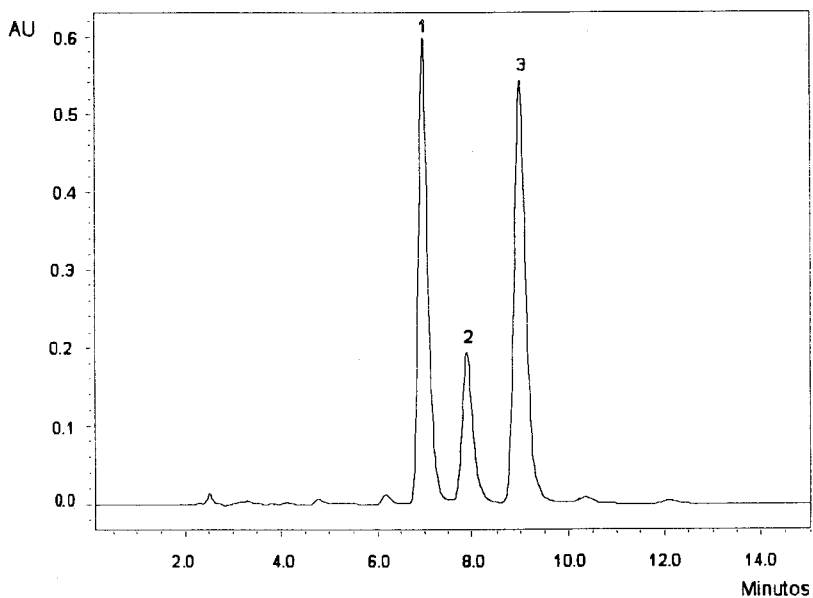


FIGURA 8 – Cromatograma de la mezcla de patrones: naringina (1), hesperidina (2) y neohesperidina (3).

3.2.2.3. Número de etapas de extracción. 5 g (precisión 0,1 mg) de derivado de fruta se mezclan con 20 mL de mezcla MeOH-H₂O (4:1) y se homogeneizan en baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Se filtra, se toman 5 mL de filtrado, se diluyen hasta 10 mL con agua y se analizan. El residuo se vuelve a extraer con 20 mL de disolvente, manteniendo el contacto durante 30 minutos y se procede como se ha descrito anteriormente. Puesto que en el residuo aún existen cantidades significativas de flavonoides (figura 7), se decide realizar una nueva extracción, observándose una mejora en la recuperación de los compuestos bajo estudio.

3.2.2.4. Filtración del extracto. La presencia de materias en suspensión daña a la columna cromatográfica y en el caso de las muestras investigadas, más aún, debido a la presencia de sustancias tales como azúcares, pectinas, etc. Vista la conveniencia de realizar una filtración, se ensayan varios filtros de membrana con igual tamaño de poro (0,45 µm), de la firma Gelman (Acrodisc 13 CR PTFE, Acrodisc LC 13 PVDF, Acrodisc 13 Nylon y Acrodisc13 GHP). Todos retienen antoxantinas, siendo la naringina la más afectada y la hesperidina la menos y la membrana de nilón es la que menos flavonoides retiene.

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos previos, se decide proceder de acuerdo con la secuencia operativa que se expone a continuación:

A 2,5 g de derivado de fruta (precisión 0,1 mg) se le añaden 10 mL de mezcla de MeOH: H₂O (4:1) (metanol Merck, art. 106007 y agua ultrapura) y se homogeneizan en baño de ultrasonidos (Selecta, P) durante 30 minutos. Se filtra a vacío a través de papel de filtro (Albet 205) en un embudo Büchner, obteniendo el filtrado A. El residuo se reextrae con 10 mL de mezcla MeOH:H₂O (4:1), tratándose en baño ultrasonidos durante 30 minutos. Tras de una nueva filtración se obtiene el filtrado B. Se mezclan A y B y se llevan a 25 ml con agua ultrapura (Milli-Q). Antes de inyectar las muestras se pasan por membranas filtrantes de nilón de 0, 45 µm de poro (Gelman Sciences Acrodisc®).

3.2.3. Determinaciones analíticas. Se utiliza un cromatógrafo Waters (Millipore), con inyector manual (Rheodyne 7125), bucle de inyección de 50 μ L, bomba cuaternaria (Waters 600 E), detector de haz de fotodiodos (Waters 996), columna de fase reversa de 250 x 4 mm (Merck LiChrospher 100 RP-18), y tamaño de partícula 5 μ m. De las condiciones reseñadas en la bibliografía (tabla VIII), se eligen las siguientes:

- Método isocrático.
- Fase móvil: 5 volúmenes de ácido acético glacial (Erba, 401392), 20 volúmenes de acetonitrilo (Erba, 412412) y 75 de agua ultrapura.
- Temperatura de la columna: 25°C.
- Caudal: 1 mL/min.
- Longitud de onda del detector: 280 nm.
- Tiempo: 15 minutos

Los patrones se preparan disolviendo en la fase móvil la cantidad apropiada de naringina (Sigma, N5893) o de neohesperidina (Sigma, N1887), pero la hesperidina (Sigma, H4125) es más insoluble y hay que disolverla previamente en N,N-dimetilformamida (Sigma, D4254) (Rouseff et al., 1987). Se conservan sin problemas (refrigerados) hasta un mes y hay que filtrar antes de inyectar. Para evitar las burbujas, los eluyentes se tratan previamente en baño de ultrasonidos y se mantienen con agitación suave durante el período de análisis. Al cromatografiar en las condiciones descritas una mezcla de los patrones, sus picos se resuelven perfectamente (figura 8).

En la tabla IX se dan los valores relativos a la reproducibilidad y repetitividad del método. La precisión del instrumento o repetitividad, se expresa como desviación estándar relativa o coeficiente de variación (RSD). Se realizan cinco inyecciones sucesivas de un derivado comercial, obteniéndose valores de coeficientes de variación que oscilan entre 1,3 % y 2,4 % para las áreas de los picos e inferiores al 0,1 % para los tiempos de retención. La precisión entre ensayos o reproducibilidad se calcula a partir de las inyecciones realizadas con una mezcla de patrones a lo largo de diez días de trabajo. La disolución de

trabajo se inyecta tres veces cada día. En este caso los valores de la desviación estándar no superan el 2,7 % para las áreas de los picos y el 5,2 % para los tiempos de retención.

Compuesto	Reproducibilidad				Repetitividad			
	T _R (min)				T _R (min)			
	Media	Máximo	Mínimo	% RSD	Media	Máximo	Mínimo	% RSD
Neerociotrin	-	-	-	-	4,852	4,860	4,852	0,071
Naringina	7,171	7,920	6,895	4,24	7,162	7,170	7,158	0,080
Hesperidina	8,162	9,061	7,784	4,99	-	-	-	-
Neohesperidina	9,299	1,437	8,867	5,14	9,256	9,260	9,252	0,037

TABLA IX- Tiempos de retención y precisión de la separación cromatográfica.

Además, se ha llevado a cabo un estudio de la linealidad, selectividad y de los límites de detección y cuantificación como características para probar la bondad del método. La linealidad se determina midiendo el área de los picos para cada uno de los compuestos estudiados, a cuatro niveles de concentraciones (20, 40, 100, y 200 ppm). Los ensayos se realizan por triplicado. En la tabla X se presenta el intervalo lineal, las ecuaciones de regresión lineal de la concentración frente a la respuesta del detector y los coeficientes de regresión de cada compuesto. Las rectas de calibrado que se construyen a partir de los datos área-concentración presentan en todos los casos buenos ajustes. Aunque los términos especificidad o selectividad suelen utilizarse con frecuencia indistintamente, corresponden a conceptos diferentes. Para los métodos cromatográficos, la especificidad es la capacidad del método para medir con exactitud la respuesta de un analito en presencia de todos los posibles componentes de la muestra, mientras que el término selectividad se refiere a un método que proporciona respuestas para un número de entidades químicas que pueden o no ser distinguidas de otras. Si la respuesta se distingue de todas las demás, se dice que el método es selectivo. Por tanto, el término adecuado en nuestro caso es selectividad (Huber, 1998). La selectividad se determina empleando una disolución constituida por los tres patrones comerciales y una muestra de un derivado

azucarado comercial, tomándose como criterio que la resolución entre los picos consecutivos tenga como mínimo un valor de al menos 1,5 respecto a los restantes (analitos y no analitos).

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\omega_2 + \omega_1} \times 0.5$$

t: tiempo de retención

ω : ancho de pico en la base

Tanto para la mezcla de patrones como para las muestras de derivados de naranja amarga los picos peor resueltos presentan valores de resolución superiores a 1,6.

Límite de detección y de cuantificación. El límite de detección (L.D.D) de un método es la concentración de analito más baja que produce una respuesta detectable por encima del nivel de ruido del sistema. Típicamente se toma como dicho valor tres veces la línea base del nivel de ruido. De acuerdo con el procedimiento de Miller y Miller (1983) se establece como tres veces el valor de la relación entre la desviación estándar de la regresión (Φ) y la pendiente de las rectas de calibrado (b) Por su parte, el límite de cuantificación (L.D.C.) es el nivel de analito más bajo que se puede medir con exactitud, y se evalúa frecuentemente como diez veces el nivel de ruido.

	Intervalo (ppm)	Ecuación	r	L.D.D. (ppm)	L.D.C. (ppm)
Naringina	20 - 200	$y = 77738,0 x + 4272 \cdot 10^2$	0,99984	10,845	36,151
Hesperidina	10 - 100	$y = 58326,0 x + 1485 \cdot 10^2$	0,99979	3,045	10,150
Neohesperidina	20 - 200	$y = 72398,0 x + 1133 \cdot 10^3$	0,99817	10,163	33,875

TABLA X- Linealidad, límite de detección (L.D.D.) y límite de cuantificación (L.D.C.) del método cromatográfico

Los compuestos de los que se dispone de patrones comerciales (naringina, hesperidina y neohesperidina) se han identificado por superposición de los espectros UV con los de los patrones correspondientes (figuras 9 a 11) y por igualdad de los tiempos de retención (figura 8). Los datos proporcionados por el detector de fotodiodos se procesan mediante la estación de datos (software: Millennium 2010 Chromatography Manager, Millipore). Cada espectro se transforma mediante un algoritmo matemático en un vector multidimensional. Los vectores correspondientes a los patrones y a los picos desconocidos son superpuestos y la diferencia se traduce en un ángulo. Entre dos espectros de la misma sustancia no existe diferencia alguna; por tanto, el ángulo entre los dos vectores resultantes es cero. Cuando, por tratarse de diferentes compuestos, los vectores resultantes guarden entre sí un cierto ángulo, éste será mayor cuanto mayores sean las diferencias espectrales. Este procedimiento es de gran utilidad para diferenciar espectros de compuestos con estructuras químicas muy relacionadas entre sí, como en este caso, y en las que la identificación sólo por el tiempo de retención relativo puede inducir a error.

Para comprobar la pureza del pico, el espectro tomado en el máximo de absorción se toma como referencia y los obtenidos a lo largo de todo el pico se comparan con él. Si el pico es puro todos los espectros serán iguales y no existirán ángulos entre ellos. Si por el contrario hay alguna contaminación, no se encontrará homogeneidad espectral a lo largo de todo el pico.

En las figuras 12 y 13 se comparan los resultados obtenidos con muestras comerciales de derivados de naranjas amargas y de naranjas dulces, con las correspondientes mezclas de patrones de flavonoides.

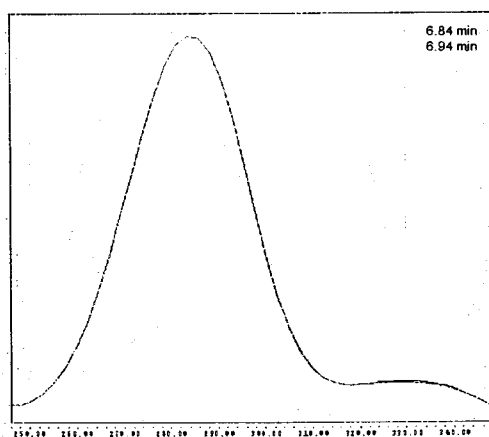


Figura 9. Espectro de absorción de naringina de una disolución patrón y de una muestra de derivado de naranja amarga

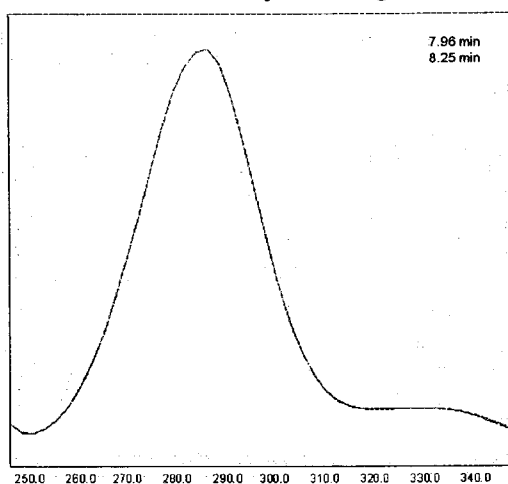


Figura 10. Espectro de absorción de hesperidina de una disolución patrón y de una muestra de derivado de naranja amarga

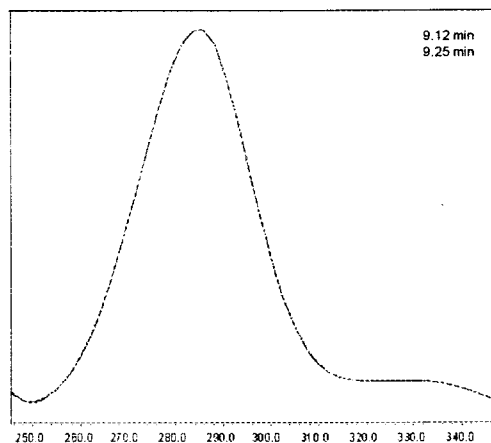


Figura 11. Espectro de absorción de neohesperidina de una disolución patrón y de una muestra de derivado de naranja amarga

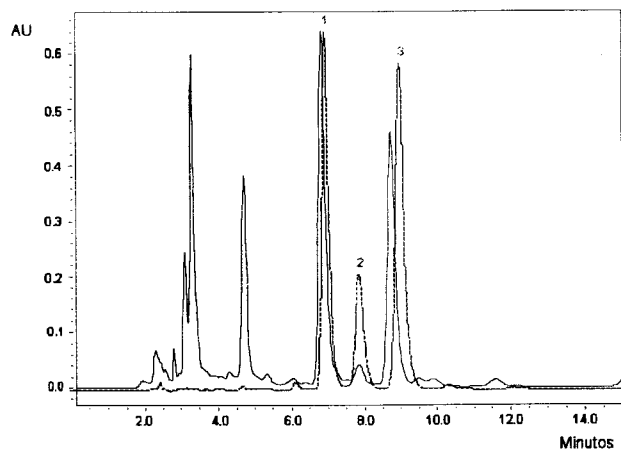


Figura 12. Cromatograma de una muestra de derivado comercial de Naranja Amarga (--) y de la mezcla de patrones (...)

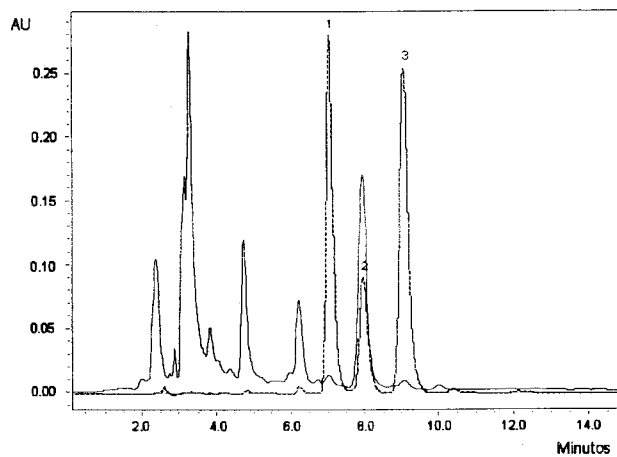


Figura 13. Cromatograma de una muestra de un derivado comercial de Naranja Dulce (-) y de la mezcla de patrones (...)

4. RESULTADOS

En las páginas siguientes se presentan los resultados experimentales obtenidos, comenzando por las muestras correspondientes al estudio de la fracción mineral y continuando por las de los estudios de la fracción flavonoide.

En primer lugar, en la Tabla XI se dan los caracteres generales de las muestras de naranjas utilizadas para la caracterización de la fracción mineral y que corresponden a las campañas citrícolas 1982-83, 1984-85 y 1987-88: tamaño de las frutas (expresado como número de naranjas por kilogramo), proporción de corteza y proporción de zumo. En la Tabla XII se presentan los resultados del contenido de agua de las cortezas y en la Tabla XIII el contenido de nitrógeno de las mismas, expresado en base seca. Las Tablas XIV a XXI contienen los resultados de las determinaciones en las cortezas de los elementos Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu y Mn, expresados alternadamente en base húmeda y en base seca. Las Tablas XXII a XXV contienen los resultados de los análisis de Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu y Mn, efectuados en el transcurso de la presente Tesis sobre las pulpas de las campañas 1984-85 y 1987-88. Junto a ellos, se presentan, en columnas sombreadas, los datos correspondientes a la campaña 1982-83, determinados por Borrero y Romero (1986), a efectos comparativos y de facilitar el seguimiento de la discusión posterior. Los datos se han ordenado por mes y día para todos los años, a fin de facilitar las comparaciones entre campañas, incluyéndose en las tablas el ordinal del día correspondiente a cada fecha, contado correlativamente desde el día 1 de Enero de cada año, al que corresponde el ordinal 1.

En la Tabla XXVI se recogen las concentraciones de naringina, hesperidina y neohesperidina encontradas en muestras comerciales de derivados azucarados. Los códigos de las muestras se corresponden con los asignados en el apartado 3.2.1.1. y comienzan por las letras DC ("derivado comercial"). En la Tabla XXVII se recogen los contenidos de naringina y hesperidina de los derivados de naranjas amargas elaborados en el laboratorio a partir de los preparados básicos PB-A (muestras LA) y PB-B (muestras LB).

FECHA	DIA	AÑO 1983			AÑO 1985			AÑO 1988		
		Frutos por kg	Corteza (%)	Zumo (%)	Frutos por kg	Corteza (%)	Zumo (%)	Frutos por kg	Corteza (%)	Zumo (%)
FEB 04	035	8,8	47,1	31,1						
FEB 05	036								42,4	41,7
FEB 08	039							5,8	44,2	37,1
FEB 10	041	5,9	43,3	34,3						
FEB 11	042	7,8	43,2	31,7						
FEB 12	043				8,4	51,4	26,1			
FEB 13	044				8,1	44,2	34,9			
FEB 14	045				8,7	50,2	29,3			
FEB 16	047	8,9	43,6	32,4						
FEB 17	048	8,0	50,2	24,2				4,9	39,2	35,4
FEB 19	050				8,8	47,5	32,3			
FEB 20	051				5,3	45,5	32,6			
FEB 21	052				7,5	49,1	28,5			
FEB 22	053	7,9	48,8	26,2				7,3	41,6	31,0
FEB 23	054	6,3	47,6	29,7						
FEB 25	056				8,5	55,3	25,0			
FEB 26	057				8,2	46,6	33,7			
MAR 01	060	7,6	51,1	25,8				6,2	37,9	33,9
MAR 02	061	7,9	51,6	20,4				7,5	40,2	44,6
MAR 03	062	6,2	44,4	29,8						
MAR 05	064				8,3	47,7	29,6			
MAR 06	065				8,8	50,1	28,2			
MAR 07	066				7,2	48,4	30,2			
MAR 08	067	7,2	47,9	25,0						
MAR 09	068	5,9	47,9	27,0				6,3	49,6	28,5
MAR 10	069	6,5	47,4	27,9				5,6	46,4	28,4
MAR 14	073	5,5	46,8	27,0						
MAR 15	074	6,7	51,5	23,5						
MAR 16	075	7,7	49,2	23,5						
MAR 17	076	6,2	51,4	24,9				6,1	44,2	30,1
MAR 21	080				7,5	51,0	24,9			
MAR 22	081							7,2	46,3	30,9
MAR 23	082	5,1	54,8	22,2						
MAR 24	083							5,4	46,6	23,4
MAR 25	084				7,6	53,3	22,2			
MAR 26	085				6,4	55,6	19,2			
MAR 28	087				6,5	52,9	21,9			
ABR 05	095	5,5	46,2	25,1						
ABR 06	096	6,5	47,0	25,8				5,9	47,6	23,7
ABR 07	097	6,1	45,7	26,3				6,1	42,8	34,7
ABR 10	100				6,6	48,1	22,7			
ABR 11	101	7,0	49,9	23,7	5,4	52,0	19,4			
ABR 17	107				6,3	51,5	18,3			
ABR 24	114				6,1	54,0	17,7			
ABR 25	115				6,3	60,6	12,3			
ABR 28	118							4,9	43,5	32,5
MAY 03	123							6,6	47,5	26,6
MAY 11	131							6,3	41,8	17,4

TABLA XI- Características generales de las muestras de naranjas amargas.

FECHA	DIA	CONTENIDO DE AGUA DE LAS CORTEZAS (mL/100 g)		
		AÑO 1983	AÑO 1985	AÑO 1988
FEB 04	035	67,3		
FEB 05	036			79,2
FEB 08	039			75,8
FEB 10	041			
FEB 11	042	69,0		
FEB 12	043			
FEB 13	044		75,0	
FEB 14	045		77,0	
FEB 16	047	73,2		
FEB 17	048	74,1		79,8
FEB 19	050		75,0	
FEB 20	051		75,5	
FEB 21	052		76,5	
FEB 22	053	73,6		80,0
FEB 23	054	74,2		
FEB 25	056		75,5	
FEB 26	057		75,0	
MAR 01	060	77,8		79,6
MAR 02	061	76,5		78,6
MAR 03	062	77,0		
MAR 05	064		76,5	
MAR 06	065		77,5	
MAR 07	066		75,0	
MAR 08	067	77,6		
MAR 09	068	75,8		78,7
MAR 10	069	76,4		78,2
MAR 14	073	76,1		
MAR 15	074	78,2		
MAR 16	075	74,8		
MAR 17	076	76,8		81,6
MAR 21	080		77,2	
MAR 22	081			78,6
MAR 23	082	80,0		
MAR 24	083			79,1
MAR 25	084		78,0	
MAR 26	085		78,0	
MAR 28	087		77,5	
ABR 05	095	77,0		
ABR 06	096	77,8		79,4
ABR 07	097	78,5		78,4
ABR 10	100		76,0	
ABR 11	101	78,9	78,5	
ABR 17	107		77,5	
ABR 24	114		75,0	
ABR 25	115		78,0	
ABR 28	118			74,6
MAY 03	123			80,8
MAY 11	131			83,2

TABLA XII- Contenido de agua de las cortezas.

FECHA	DIA	N (mg/100 g base seca)	
		1985	1988
FEB 05	036		833,32
FEB 12	043	835,20	
FEB 13	044	636,16	
FEB 14	045	752,00	
FEB 19	050	682,56	
FEB 20	051	668,64	
FEB 21	052	488,32	
FEB 22	053		827,44
FEB 25	056	702,88	
FEB 26	057	724,16	
MAR 01	060		446,31
MAR 02	061		416,36
MAR 05	064	779,68	
MAR 06	065	599,52	
MAR 07	066	658,88	
MAR 09	068		524,47
MAR 10	069		614,04
MAR 17	076		552,06
MAR 21	080	556,32	
MAR 22	081		779,17
MAR 24	083		559,28
MAR 25	084	347,52	
MAR 26	085	544,48	
MAR 28	087	720,48	
ABR 06	096		740,79
ABR 07	097		723,15
ABR 10	100	743,04	
ABR 11	101	720,64	
ABR 17	107	653,28	
ABR 24	114	614,88	
ABR 25	115	614,88	
ABR 28	118		438,42
MAY 03	123		436,12
MAY 11	131		656,97

TABLA XIII– Composición mineral de las cortezas secas: Nitrógeno.

FECHA	DIA	Na (mg/100 g)			K (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	3,21			139,1		
FEB 05	036			2,24			160,3
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	2,21			264,3		
FEB 12	043		3,19			126,9	
FEB 13	044						
FEB 14	045		2,71			235,1	
FEB 16	047	2,06			186,2		
FEB 17	048	3,56			180,2		
FEB 19	050		2,06			211,0	
FEB 20	051		3,20			186,8	
FEB 21	052		1,72			245,3	
FEB 22	053	1,95		1,97	237,6		142,4
FEB 23	054	2,18			199,5		
FEB 25	056		1,97			215,2	
FEB 26	057		2,18			239,6	
MAR 01	060	2,42		1,57	193,8		139,5
MAR 02	061	2,08		1,88	202,9		183,7
MAR 03	062	2,51			199,1		
MAR 05	064		2,16			239,7	
MAR 06	065		1,56			213,4	
MAR 07	066		1,30			203,0	
MAR 08	067	2,08			160,2		
MAR 09	068	3,49		1,46	273,9		167,3
MAR 10	069	2,33		1,14	272,6		165,4
MAR 14	073	2,63			151,0		
MAR 15	074	3,05			205,2		
MAR 16	075	2,65			213,2		
MAR 17	076	3,05		1,64	191,6		171,7
MAR 21	080		1,23			293,7	
MAR 22	081			1,48			174,9
MAR 23	082	1,51			135,7		
MAR 24	083			1,00			156,2
MAR 25	084		1,12			295,5	
MAR 26	085		1,37			172,1	
MAR 28	087		2,60			237,5	
ABR 05	095	3,20			234,0		
ABR 06	096	2,46		1,20	176,3		146,9
ABR 07	097	2,24		1,91	206,8		152,5
ABR 10	100		3,50			219,5	
ABR 11	101	2,40	2,34		187,5	194,8	
ABR 17	107		1,10			190,0	
ABR 24	114		1,54			241,2	
ABR 25	115		2,00			249,8	
ABR 28	118			2,43			167,4
MAY 03	123			1,19			159,6
MAY 11	131			2,02			136,7

TABLA XIV- Composición mineral de las cortezas: Sodio y Potasio.

FECHA	DIA	Na (mg/100 g peso seco)			K (mg/100 g peso seco)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	9,81			425,3		
FEB 05	036			10,70			767,0
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	7,14			852,7		
FEB 12	043		15,21			604,3	
FEB 13	044						
FEB 14	045		11,79			1022,0	
FEB 16	047	7,67			694,6		
FEB 17	048	13,73			695,9		
FEB 19	050		8,25			843,9	
FEB 20	051		13,08			762,5	
FEB 21	052		7,33			1043,8	
FEB 22	053	7,38		9,83	899,9		711,8
FEB 23	054	8,47			773,4		
FEB 25	056		8,04			878,4	
FEB 26	057		8,71			958,4	
MAR 01	060	10,88		7,70	872,9		684,0
MAR 02	061	9,02		8,77	882,1		858,6
MAR 03	062	10,92			865,5		
MAR 05	064		9,20			1020,0	
MAR 06	065		6,93			906,9	
MAR 07	066		5,20			812,0	
MAR 08	067	9,27			715,1		
MAR 09	068	14,44		6,84	1131,7		785,5
MAR 10	069	9,87		5,24	1155,1		758,8
MAR 14	073	11,00			631,9		
MAR 15	074	14,00			941,4		
MAR 16	075	10,52			845,9		
MAR 17	076	13,13		8,93	825,7		933,1
MAR 21	080		5,40			1288,0	
MAR 22	081			6,94			817,3
MAR 23	082	7,54			678,4		
MAR 24	083			4,78			747,4
MAR 25	084		5,10			1343,1	
MAR 26	085		6,22			782,2	
MAR 28	087		11,56			1055,6	
ABR 05	095	13,92			1017,6		
ABR 06	096	11,10		5,84	794,2		713,1
ABR 07	097	10,42		8,86	961,9		704,6
ABR 10	100		14,58			914,6	
ABR 11	101	11,37	10,87		888,7	906,2	
ABR 17	107		4,89			844,4	
ABR 24	114		6,15			964,8	
ABR 25	115		9,11			1135,6	
ABR 28	118			9,56			658,9
MAY 03	123			6,20			831,4
MAY 11	131			12,04			813,6

TABLA XV- Composición mineral de las cortezas secas: Sodio y Potasio.

FECHA	DIA	Ca (mg/100 g)			Mg (mg/100 g)			P (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	295,7			25,3			15,2		
FEB 05	036			241,9						8,9
FEB 08	039							21,6		
FEB 10	041									
FEB 11	042	282,2			31,6			16,5		
FEB 12	043		220,9			15,1			10,8	
FEB 13	044								12,7	
FEB 14	045		246,1			21,1			12,5	
FEB 16	047	268,4			24,4			14,2		
FEB 17	048	234,5			24,0			11,5		
FEB 19	050		289,5			21,0			14,6	
FEB 20	051		259,9			21,1			14,9	
FEB 21	052		253,4			19,2			12,8	
FEB 22	053	232,5		185,0	23,5		18,7	15,3		11,6
FEB 23	054	214,7			26,5			12,5		
FEB 25	056		238,3			23,0			12,0	
FEB 26	057		225,2			10,4			13,9	
MAR 01	060	175,6		198,1	21,5		16,7	10,3		8,4
MAR 02	061	192,2		256,5	24,4		18,0	12,0		12,8
MAR 03	062	191,3			27,6			10,3		
MAR 05	064		241,0			22,1			13,4	
MAR 06	065		213,4			22,7			10,1	
MAR 07	066		269,8			25,0			6,8	
MAR 08	067	217,5			26,8			9,3		
MAR 09	068	226,8		192,1	28,2		17,5	16,6		6,8
MAR 10	069	231,8		205,4	28,4		16,7	16,6		13,0
MAR 14	073	191,2			22,2			13,1		
MAR 15	074	181,2			24,0			14,1		
MAR 16	075	201,2			23,1			10,2		
MAR 17	076	232,0		205,6	27,9		19,0	9,2		7,4
MAR 21	080		265,5			23,2			6,9	
MAR 22	081			210,6			15,6			10,0
MAR 23	082	176,7			21,5			8,3		
MAR 24	083			154,2			14,2			3,6
MAR 25	084		249,8			23,3			10,0	
MAR 26	085		198,5			18,6			16,9	
MAR 28	087		217,5			22,0			16,0	
ABR 05	095	183,2			23,3			12,4		
ABR 06	096	246,0		179,2	27,5		15,5	11,4		6,2
ABR 07	097	304,0		149,8	26,9		16,4	11,6		8,1
ABR 10	100		222,5			19,0			8,3	
ABR 11	101	168,3	223,0		22,8	22,0		12,1	5,3	
ABR 17	107		221,0			22,0			4,9	
ABR 24	114		311,0			26,9			14,6	
ABR 25	115		183,8			18,6			8,1	
ABR 28	118			165,9			17,6			7,3
MAY 03	123			169,9			20,0			9,2
MAY 11	131			144,7			16,2			7,6

TABLA XVI- Composición mineral de las cortezas: Calcio, Magnesio y Fósforo.

FECHA	DIA	Ca (mg/100 g peso seco)			Mg (mg/100 g peso seco)			P (mg/100 g peso seco)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	904,3			77,4			46,4		
FEB 05	036			1157,4			103,2			42,4
FEB 08	039									
FEB 10	041									
FEB 11	042	910,4			102,1			53,3		
FEB 12	043		1052,1			72,1			51,4	
FEB 13	044								50,9	
FEB 14	045		1070,0			91,9			54,3	
FEB 16	047	1001,6			90,9			53,0		
FEB 17	048	905,5			92,6			44,5		
FEB 19	050		1157,9			84,1			58,4	
FEB 20	051		1060,9			86,3			60,7	
FEB 21	052		1078,3			81,8			54,6	
FEB 22	053	880,6		924,9	89,0		93,4	58,1		57,8
FEB 23	054	832,2			102,7			48,6		
FEB 25	056		972,6			94,1			49,1	
FEB 26	057		901,0			41,6			55,6	
MAR 01	060	791,0		971,0	96,9		81,9	46,2		41,3
MAR 02	061	835,5		1198,5	106,0		84,1	52,0		59,7
MAR 03	062	831,7			120,1			44,7		
MAR 05	064		1025,3			94,1			56,9	
MAR 06	065		948,5			101,0			45,0	
MAR 07	066		1079,1			99,9			27,1	
MAR 08	067	970,9			119,8			41,5		
MAR 09	068	937,4		902,0	116,6		82,0	68,5		31,8
MAR 10	069	982,3		942,2	120,4		76,7	70,3		59,4
MAR 14	073	799,9			93,0			55,0		
MAR 15	074	831,1			110,2			64,5		
MAR 16	075	798,6			91,6			40,3		
MAR 17	076	999,8		1117,6	120,4		103,2	39,8		40,2
MAR 21	080		1164,6			102,0			30,2	
MAR 22	081			984,2			72,8			46,8
MAR 23	082	883,7			107,7			41,5		
MAR 24	083			737,9			67,9			17,0
MAR 25	084		1135,3			105,9			45,3	
MAR 26	085		902,2			84,4			76,8	
MAR 28	087		966,7			98,0			70,9	
ABR 05	095	796,3			101,2			53,8		
ABR 06	096	1108,3		869,8	124,0		75,2	51,3		29,9
ABR 07	097	1413,8		693,4	125,2		75,8	53,9		37,6
ABR 10	100		927,1			79,2			34,6	
ABR 11	101	797,8	1037,0		107,8	102,2		57,4	24,5	
ABR 17	107		982,2			97,8			21,7	
ABR 24	114		1244,0			107,7			58,4	
ABR 25	115		835,6			84,4			36,9	
ABR 28	118			653,1			69,5			28,8
MAY 03	123			884,7			104,1			48,1
MAY 11	131			861,3			96,2			45,1

TABLA XVII- Composición mineral de las cortezas secas: Calcio, Magnesio y Fósforo.

FECHA	DIA	Fe (mg/100 g)			Zn (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	0,58			0,15		
FEB 05	036			0,32			0,22
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	0,68			0,24		
FEB 12	043		0,40			0,18	
FEB 13	044						
FEB 14	045		0,40			0,20	
FEB 16	047	0,74			0,16		
FEB 17	048	0,57			0,10		
FEB 19	050		0,65			0,22	
FEB 20	051		0,58			0,15	
FEB 21	052		0,40			0,16	
FEB 22	053	0,37		0,30			0,12
FEB 23	054	0,31			0,16		
FEB 25	056		0,33			0,19	
FEB 26	057		0,38			0,25	
MAR 01	060	0,41		0,29	0,29		0,14
MAR 02	061	0,33		0,36	0,16		0,15
MAR 03	062	0,29			0,15		
MAR 05	064		0,32			0,30	
MAR 06	065		0,37			0,26	
MAR 07	066		0,54			0,22	
MAR 08	067	0,39			0,18		
MAR 09	068	0,34		0,28	0,14		0,10
MAR 10	069	0,26		0,28	0,11		0,11
MAR 14	073	0,30			0,13		
MAR 15	074	0,26			0,15		
MAR 16	075	0,32			0,17		
MAR 17	076	0,24		0,27	0,15		0,13
MAR 21	080		0,34			0,16	
MAR 22	081			0,39			0,13
MAR 23	082	0,28			0,13		
MAR 24	083			0,25			0,15
MAR 25	084		0,24			0,11	
MAR 26	085		0,33			0,20	
MAR 28	087		0,30			0,30	
ABR 05	095	0,30			0,14		
ABR 06	096	0,28		0,30	0,14		0,10
ABR 07	097	0,30		0,28	0,15		0,20
ABR 10	100		0,24			0,24	
ABR 11	101	0,37	0,29		0,14	0,28	
ABR 17	107		0,34			0,20	
ABR 24	114		0,34			0,21	
ABR 25	115		0,36			0,14	
ABR 28	118			0,33			0,26
MAY 03	123			0,29			0,15
MAY 11	131			0,32			0,14

TABLA XVIII- Composición mineral de las cortezas: Hierro y Cinc.

FECHA	DIA	Fe (mg/100 g peso seco)			Zn (mg/100 g peso seco)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	1,78			0,46		
FEB 05	036			1,52			1,04
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	2,18			0,76		
FEB 12	043		1,92			0,88	
FEB 13	044						
FEB 14	045		1,74			0,86	
FEB 16	047	2,75			0,58		
FEB 17	048	2,20			0,39		
FEB 19	050		2,60			0,86	
FEB 20	051		2,36			0,62	
FEB 21	052		1,70			0,66	
FEB 22	053	1,41		1,48			0,62
FEB 23	054	1,20			0,61		
FEB 25	056		1,35			0,78	
FEB 26	057		1,54			0,99	
MAR 01	060	1,84		1,42	1,31		0,70
MAR 02	061	1,43		1,70	0,71		0,70
MAR 03	062	1,25			0,64		
MAR 05	064		1,36			1,28	
MAR 06	065		1,64			1,15	
MAR 07	066		2,14			0,88	
MAR 08	067	1,75			0,79		
MAR 09	068	1,41		1,31	0,57		0,48
MAR 10	069	1,09		1,28	0,46		0,52
MAR 14	073	1,26			0,53		
MAR 15	074	1,19			0,69		
MAR 16	075	1,27			0,69		
MAR 17	076	1,05		1,48	0,66		0,70
MAR 21	080		1,48			0,70	
MAR 22	081			1,81			0,60
MAR 23	082	1,39			0,64		
MAR 24	083			1,18			0,70
MAR 25	084		1,10			0,51	
MAR 26	085		1,51			0,90	
MAR 28	087		1,33			1,35	
ABR 05	095	1,30			0,62		
ABR 06	096	1,26		1,44	0,64		0,51
ABR 07	097	1,38		1,31	0,68		0,92
ABR 10	100		1,02			0,98	
ABR 11	101	1,76	1,37		0,64	1,32	
ABR 17	107		1,49			0,91	
ABR 24	114		1,38			0,84	
ABR 25	115		1,62			0,64	
ABR 28	118			1,30			1,04
MAY 03	123			1,52			0,77
MAY 11	131			1,88			0,83

TABLA XIX– Composición mineral de las cortezas secas: Hierro y Cinc.

FECHA	DIA	Cu (mg/100 g)			Mn (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	0,088			0,085		
FEB 05	036			0,067			0,100
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	0,105			0,099		
FEB 12	043		0,092			0,086	
FEB 13	044						
FEB 14	045		0,106			0,044	
FEB 16	047	0,091			0,091		
FEB 17	048	0,065			0,080		
FEB 19	050		0,120			0,090	
FEB 20	051		0,093			0,157	
FEB 21	052		0,075			0,113	
FEB 22	053			0,064	0,106		0,080
FEB 23	054	0,072			0,103		
FEB 25	056		0,081			0,096	
FEB 26	057		0,080			0,100	
MAR 01	060	0,071		0,059	0,084		0,094
MAR 02	061	0,064		0,064	0,108		0,107
MAR 03	062	0,060			0,117		
MAR 05	064		0,075			0,099	
MAR 06	065		0,068			0,112	
MAR 07	066		0,075			0,135	
MAR 08	067	0,072			0,099		
MAR 09	068	0,128		0,047	0,082		0,083
MAR 10	069	0,118		0,048	0,076		0,083
MAR 14	073	0,067			0,105		
MAR 15	074	0,070			0,098		
MAR 16	075	0,076			0,086		
MAR 17	076	0,079		0,059	0,118		0,074
MAR 21	080		0,114			0,073	
MAR 22	081			0,071			0,077
MAR 23	082	0,098			0,102		
MAR 24	083			0,054			0,067
MAR 25	084		0,103			0,073	
MAR 26	085		0,068			0,103	
MAR 28	087		0,074			0,106	
ABR 05	095	0,069			0,083		
ABR 06	096	0,058		0,056	0,062		0,066
ABR 07	097	0,054		0,056	0,105		0,067
ABR 10	100		0,074			0,101	
ABR 11	101	0,063	0,075		0,076	0,092	
ABR 17	107		0,106			0,110	
ABR 24	114		0,082			0,110	
ABR 25	115		0,068			0,108	
ABR 28	118			0,066			0,071
MAY 03	123			0,069			0,069
MAY 11	131			0,064			0,070

TABLA XX– Composición mineral de las cortezas: Cobre y Manganeso.

FECHA	DIA	Cu (mg/100 g peso seco)			Mn (mg/100 g peso seco)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	0,27			0,26		
FEB 05	036			0,32			0,48
FEB 08	039						
FEB 10	041						
FEB 11	042	0,34			0,32		
FEB 12	043		0,44			0,41	
FEB 13	044						
FEB 14	045		0,46			0,19	
FEB 16	047	0,34			0,34		
FEB 17	048	0,25			0,31		
FEB 19	050		0,48			0,36	
FEB 20	051		0,38			0,64	
FEB 21	052		0,32			0,48	
FEB 22	053			0,32	0,40		0,40
FEB 23	054	0,28			0,40		
FEB 25	056		0,33			0,39	
FEB 26	057		0,32			0,40	
MAR 01	060	0,32		0,29	0,38		0,46
MAR 02	061	0,28		0,30	0,47		0,50
MAR 03	062	0,26			0,51		
MAR 05	064		0,32			0,42	
MAR 06	065		0,30			0,50	
MAR 07	066		0,30			0,54	
MAR 08	067	0,32			0,44		
MAR 09	068	0,53		0,22	0,34		0,39
MAR 10	069	0,50		0,22	0,32		0,38
MAR 14	073	0,28			0,44		
MAR 15	074	0,32			0,45		
MAR 16	075	0,30			0,34		
MAR 17	076	0,34		0,32	0,51		0,40
MAR 21	080		0,50			0,32	
MAR 22	081			0,33			0,36
MAR 23	082	0,49			0,51		
MAR 24	083			0,26			0,32
MAR 25	084		0,47			0,33	
MAR 26	085		0,31			0,47	
MAR 28	087		0,33			0,47	
ABR 05	095	0,30			0,36		
ABR 06	096	0,26		0,27	0,28		0,32
ABR 07	097	0,25		0,26	0,49		0,31
ABR 10	100		0,31			0,42	
ABR 11	101	0,30	0,35		0,36	0,43	
ABR 17	107		0,47			0,49	
ABR 24	114		0,33			0,44	
ABR 25	115		0,31			0,49	
ABR 28	118			0,26			0,28
MAY 03	123			0,36			0,36
MAY 11	131			0,38			0,42

TABLA XXI- Composición mineral de las cortezas secas: Cobre y Manganeso.

FECHA	DIA	Na (mg/100 g)			K (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	1,68			130,1		
FEB 05	036						
FEB 08	039						
FEB 10	041	1,11			157,6		
FEB 11	042	1,04			191,4		
FEB 12	043		1,24			211,0	
FEB 13	044		1,24			203,5	
FEB 14	045		0,96			209,0	
FEB 16	047	0,68			182,4		
FEB 17	048	1,01		0,76	165,1		136,4
FEB 19	050		1,84			189,5	
FEB 20	051		0,66			228,5	
FEB 21	052		0,76			213,5	
FEB 22	053	0,82		0,70	174,0		119,9
FEB 23	054	1,21			190,9		
FEB 25	056		1,19			171,4	
FEB 26	057		0,84			190,2	
MAR 01	060	0,53		0,49	172,9		126,2
MAR 02	061	0,58		0,42	183,7		129,2
MAR 03	062	0,49			176,1		
MAR 05	064		0,45			211,9	
MAR 06	065		1,48			207,9	
MAR 07	066		0,48			160,9	
MAR 08	067	0,53			177,3		
MAR 09	068	0,41		0,56	202,9		132,5
MAR 10	069	0,43		0,45	201,0		142,9
MAR 14	073	0,46			155,6		
MAR 15	074	0,56			169,4		
MAR 16	075	2,23			192,9		
MAR 17	076	0,66			197,9		
MAR 21	080		0,96			217,4	
MAR 22	081						
MAR 23	082	0,44			163,5		
MAR 24	083			0,46			137,7
MAR 25	084		0,48			202,0	
MAR 26	085		0,64			206,4	
MAR 28	087		0,56			204,0	
ABR 05	095	0,48			173,9		
ABR 06	096	0,61		0,64	182,8		131,6
ABR 07	097	0,63		1,43	179,3		144,3
ABR 10	100		0,85			182,8	
ABR 11	101	0,56	0,75		179,0	182,6	
ABR 17	107		0,39			202,0	
ABR 24	114		0,55			214,6	
ABR 25	115						
ABR 28	118			0,90			153,0
MAY 03	123			0,72			143,3
MAY 11	131			1,28			141,1

TABLA XXII- Composición mineral de la pulpa: Sodio y Potasio.

FECHA	DIA	Ca (mg/100 g)			Mg (mg/100 g)			P (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	23,25			8,95			23,2		
FEB 05	036									
FEB 08	039									
FEB 10	041	18,76			9,67			25,5		
FEB 11	042	23,96			10,52			25,3		
FEB 12	043		34,50			8,50			16,8	
FEB 13	044		26,00			8,50			15,9	
FEB 14	045		20,00			8,50			19,0	
FEB 16	047	22,19			9,42			23,8		
FEB 17	048	23,14		21,97	9,98		7,80	24,8		14,2
FEB 19	050		19,50			8,00			16,9	
FEB 20	051		17,50			7,99			14,0	
FEB 21	052		18,00			8,01			16,4	
FEB 22	053	21,81		22,48	9,81		7,28	22,4		6,7
FEB 23	054	20,30			10,15			15,3		
FEB 25	056		15,90			7,95			8,3	
FEB 26	057		20,15			7,86			14,4	
MAR 01	060	17,86		19,02	9,87		7,65	18,1		13,4
MAR 02	061	23,50		26,04	10,26		7,81	21,0		7,7
MAR 03	062	17,01			10,24			22,6		
MAR 05	064		23,38			7,96			18,3	
MAR 06	065		17,69			8,35			17,2	
MAR 07	066		19,31			7,43			13,9	
MAR 08	067	23,50			10,36			21,1		
MAR 09	068	21,23		18,92	9,75		8,06	21,2		12,5
MAR 10	069	24,74		21,50	10,28		7,55	22,9		14,6
MAR 14	073	21,75			9,92			22,0		
MAR 15	074	22,12			9,66			22,7		
MAR 16	075	24,00			9,82			12,3		
MAR 17	076	22,08			10,49			20,7		
MAR 21	080		18,91			8,46			16,1	
MAR 22	081									
MAR 23	082	19,79			9,95			21,8		
MAR 24	083			24,29			7,85			12,6
MAR 25	084		17,50			8,50			11,8	
MAR 26	085		19,56			7,82			8,5	
MAR 28	087		28,28			8,08			10,6	
ABR 05	095	23,31			10,12			20,3		
ABR 06	096	16,01		24,65	9,29		8,62	12,6		16,5
ABR 07	097	20,38		28,85	10,09		8,40	24,2		15,4
ABR 10	100		22,22			8,58			21,1	
ABR 11	101	15,74	23,02		9,76	7,89		15,4	12,4	
ABR 17	107		23,23			8,08			13,8	
ABR 24	114		19,39			8,67			17,8	
ABR 25	115									
ABR 28	118			29,28			8,53			15,0
MAY 03	123			30,49			8,73			9,6
MAY 11	131			23,94			8,78			10,9

TABLA XXIII- Composición mineral de la pulpa: Calcio, Magnesio y Fósforo.

FECHA	DIA	Fe (mg/100 g)			Zn (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	0,31			0,073		
FEB 05	036						
FEB 08	039						
FEB 10	041	0,34			0,092		
FEB 11	042	0,26			0,078		
FEB 12	043		0,37			0,110	
FEB 13	044		0,18			0,135	
FEB 14	045		0,28			0,095	
FEB 16	047	0,17			0,059		
FEB 17	048	0,23		0,17	0,054		0,076
FEB 19	050		0,26			0,105	
FEB 20	051		0,26			0,105	
FEB 21	052		0,16			0,100	
FEB 22	053	0,16		0,16	0,040		0,075
FEB 23	054	0,16			0,064		
FEB 25	056		0,20			0,065	
FEB 26	057		0,14			0,260	
MAR 01	060	0,24		0,17	0,064		0,062
MAR 02	061	0,21		0,16	0,070		0,057
MAR 03	062	0,24			0,080		
MAR 05	064		0,19			0,090	
MAR 06	065		0,35			0,336	
MAR 07	066		0,35			0,228	
MAR 08	067	0,19			0,119		
MAR 09	068	0,19		0,24	0,076		0,088
MAR 10	069	0,20		0,16	0,080		0,070
MAR 14	073	0,22			0,065		
MAR 15	074	0,21			0,100		
MAR 16	075	0,25			0,084		
MAR 17	076	0,20			0,081		
MAR 21	080		0,19			0,229	
MAR 22	081						
MAR 23	082	0,21			0,100		
MAR 24	083			0,19			0,076
MAR 25	084		0,20			0,080	
MAR 26	085		0,27			0,108	
MAR 28	087		0,17			0,081	
ABR 05	095	0,16			0,064		
ABR 06	096	0,22		0,25	0,124		0,116
ABR 07	097	0,20		0,22	0,079		0,086
ABR 10	100		0,18			0,116	
ABR 11	101	0,31	0,20		0,095	0,158	
ABR 17	107		0,19			0,252	
ABR 24	114		0,20			0,138	
ABR 25	115						
ABR 28	118			0,31			0,239
MAY 03	123			0,18			0,105
MAY 11	131			0,18			0,074

TABLA XXIV– Composición mineral de la pulpa: Hierro y Cinc.

FECHA	DIA	Cu (mg/100 g)			Mn (mg/100 g)		
		1983	1985	1988	1983	1985	1988
FEB 04	035	0,063			0,030		
FEB 05	036						
FEB 08	039						
FEB 10	041	0,092			0,035		
FEB 11	042	0,083			0,040		
FEB 12	043		0,096			0,050	
FEB 13	044		0,080			0,050	
FEB 14	045		0,070			0,045	
FEB 16	047	0,064			0,035		
FEB 17	048	0,054		0,066	0,025		0,025
FEB 19	050		0,065			0,000	
FEB 20	051		0,070			0,065	
FEB 21	052		0,065			0,050	
FEB 22	053	0,045		0,055	0,020		0,022
FEB 23	054	0,069			0,020		
FEB 25	056		0,080			0,070	
FEB 26	057		0,079			0,039	
MAR 01	060	0,074		0,056	0,030		0,032
MAR 02	061	0,055		0,047	0,000		0,021
MAR 03	062	0,060			0,000		
MAR 05	064		0,065			0,050	
MAR 06	065		0,084			0,029	
MAR 07	066		0,074			0,035	
MAR 08	067	0,065			0,025		
MAR 09	068	0,061		0,060	0,000		0,048
MAR 10	069	0,055		0,050	0,000		0,018
MAR 14	073	0,055			0,035		
MAR 15	074	0,060			0,030		
MAR 16	075	0,055			0,035		
MAR 17	076	0,071			0,030		
MAR 21	080		0,080			0,040	
MAR 22	081						
MAR 23	082	0,080			0,020		
MAR 24	083			0,046			0,046
MAR 25	084		0,070			0,030	
MAR 26	085		0,073			0,064	
MAR 28	087		0,071			0,025	
ABR 05	095	0,060			0,000		
ABR 06	096	0,064		0,062	0,020		0,056
ABR 07	097	0,059		0,052	0,020		0,040
ABR 10	100		0,066			0,000	
ABR 11	101	0,065	0,058		0,025	0,000	
ABR 17	107		0,076			0,000	
ABR 24	114		0,066			0,026	
ABR 25	115						
ABR 28	118			0,052			0,035
MAY 03	123			0,046			0,028
MAY 11	131			0,040			0,024

TABLA XXV– Composición mineral de la pulpa: Cobre y Manganeso.

Muestra	Concentraciones (mg/ 100 g de producto)		
	Hesperidina	Naringina	Neohesperidina
DC01		29,77	24,92
DC02		52,08	43,07
DC03		55,06	43,18
DC04	61,84	39,58	33,85
DC05		36,52	29,71
DC06		99,70	
DC07		51,12	43,10
DC08		39,61	33,20
DC09		30,56	25,14
DC10		36,46	30,38
DC11	50,35		
DC12	14,43		
DC13		25,49	21,08
DC14		23,36	22,04
DC15		1,38	1,37
DC16			
DC17	36,03		

TABLA XXV- Contenido en flavanonas de muestras comerciales de derivados.

Muestra	g de naranja por 100 g	Grados Brix	pH	Concentraciones (mg/100 g)	
				Naringina	Neohesperidina
LA01	11,05	51,6	3,41	13,33	8,78
LA02	22,12	54,4	3,22	31,35	18,09
LA03	43,46	50,5	3,30	60,45	36,76
LA05	28,21	56,0	3,27	31,42	18,52
LA06	37,70	60,2	3,25	79,19	46,30
LA07	49,51	60,5	3,25	70,83	43,09
LA08	10,77	59,0	3,35	17,11	9,94
LA09	22,47	63,0	3,30	37,89	22,36
LA10	33,46	62,5	3,32	56,46	32,77
LB01	12,73	54,5	3,12	11,02	10,09
LB02	24,34	57,3	3,03	25,12	22,48
LB03	47,65	55,0	3,00	44,55	46,83
LB04	62,95	52,0	3,01	56,72	54,32
LB05	27,32	60,5	3,14	26,99	25,16
LB06	38,08	62,5	3,03	34,72	30,24
LB07	49,00	59,4	3,02	50,69	44,96
LB08	11,20	63,8	3,10	11,30	12,37
LB09	22,02	64,0	3,06	18,27	18,41
LB10	32,07	59,1	3,07	28,65	25,34

TABLA XXVII- Derivados de naranja amarga elaborados en laboratorio: características y contenido de flavanonas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Características generales de las frutas

En la Tabla XXVIII, se han reproducido, para cada campaña estudiada, los valores medios de las características de las frutas (tabla XI), junto con los de la cosecha (Asociafruit, 1999) y los de las precipitaciones entre los meses en los que tiene lugar la formación y cuajado de los frutos (Abril a Julio del año inmediatamente anterior a la toma de las muestras).

Campaña	Frutos por kg	% de zumo	% de corteza	Cosecha (kt/a)	Lluvias Abril a Julio (L/m ²)
1982-1983	6,87	26,7	48,03	17,0	36,8
1984-1985	7,32	25,4	50,75	23,2	172,7
1987-1988	6,14	31,2	43,86	16,0	91,9

TABLA XXVIII – Características generales, cosechas y precipitaciones.

Para las tres campañas estudiadas se observa que el tamaño de las naranjas guarda una relación inversa con la magnitud de la cosecha (figura 14), lo que afecta a la calidad tecnológica de los frutos, pues menor tamaño significa mayor proporción de corteza (figura 15) y menor de zumo. De acuerdo con Romero y Nebot (1995), la calidad tecnológica de las naranjas amargas se ve condicionada por el régimen pluviométrico, pero no por las precipitaciones anuales, sino por lluvias abundantes en los períodos Abril-Julio y Diciembre-Marzo y escasas entre Agosto y Noviembre. Lo primero es razonable, si se piensa que en Sevilla se produce normalmente la floración del azahar en vísperas de la Semana Santa, en Marzo-Abril, por lo que las naranjas amargas empiezan a cuajar en Abril, a partir de las flores que quedan en los árboles. Por ello, las precipitaciones entre Abril y Julio deben tener alguna influencia sobre la magnitud de la cosecha y, en consecuencia, sobre las características de las naranjas que quedan hasta la recolección y puede verse (figura 16) que existe una cierta correlación entre estas lluvias y la cantidad de fruta recolectada.

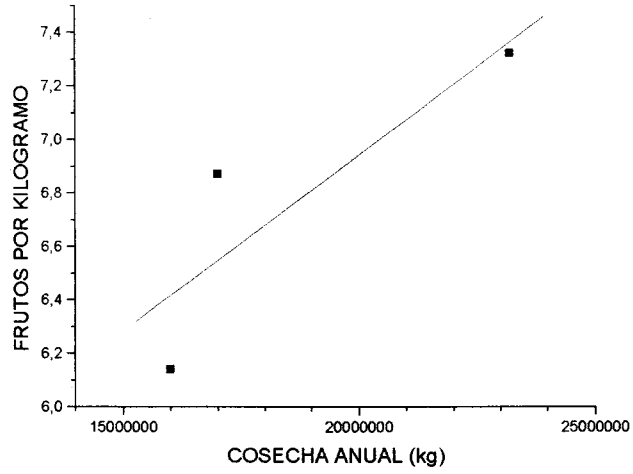


FIGURA 14 - Relación entre magnitud de la cosecha y tamaño de los frutos.

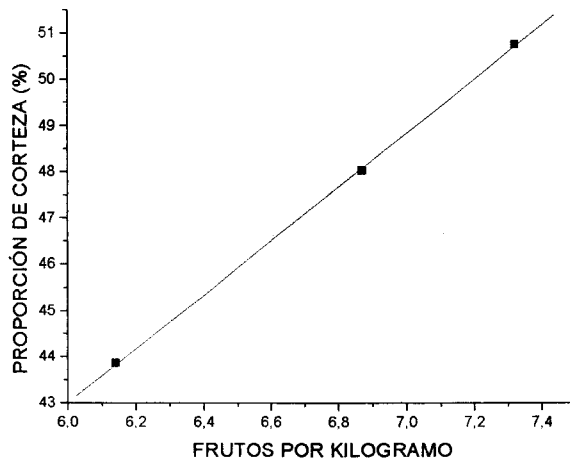


FIGURA 15 - Influencia del tamaño de la fruta sobre la proporción de corteza.

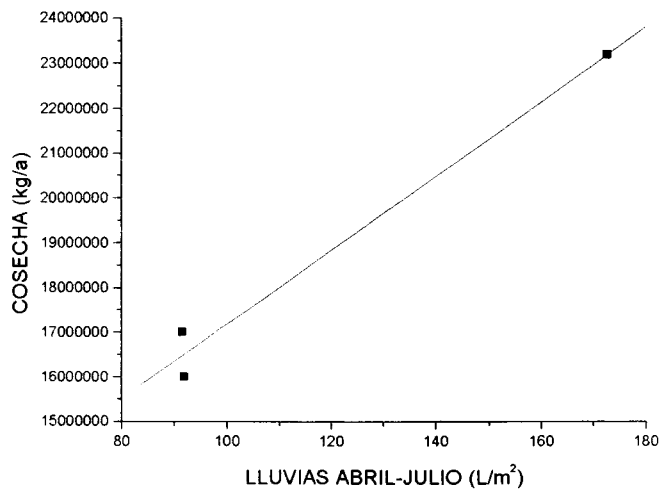


FIGURA 16 - Influencia de las lluvias de primavera sobre la cosecha.

FECHA	COCIENTE DE CONCENTRACIONES ENTRE CORTEZA Y PULPA								
	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Mn	Zn
4.02.1983	1,91	1,07	12,72	2,83	0,66	1,87	1,40	2,83	2,05
11.02.1983	2,12	1,38	11,78	3,00	0,65	2,62	1,26	2,48	3,08
16.02.1983	3,03	1,02	12,10	2,59	0,60	4,35	1,42	2,60	2,71
17.02.1983	3,52	1,09	10,13	2,40	0,46	2,48	1,20	3,20	1,85
22.03.1983	2,38	1,37	10,66	2,40	0,68	2,31	-	5,30	-
23.03.1983	1,80	1,04	10,58	2,61	0,82	1,94	1,04	5,15	2,50
1.03.1983	4,57	1,12	9,83	2,18	0,57	1,71	0,96	2,80	4,53
2.03.1983	3,59	1,10	8,18	2,38	0,57	1,57	1,16	-	2,29
3.03.1983	5,12	1,13	11,25	2,70	0,46	1,21	1,00	-	1,88
8.03.1983	3,92	0,90	9,25	2,59	0,44	2,05	1,11	3,96	1,51
9.03.1983	8,51	1,35	10,68	2,89	0,78	1,79	2,10	-	1,84
10.03.1983	5,42	1,36	9,37	2,76	0,72	1,30	2,14	-	1,38
14.03.1983	5,72	0,97	8,79	2,24	0,60	1,36	1,22	3,00	2,00
15.03.1983	5,45	1,21	8,19	2,48	0,62	1,24	1,17	3,27	1,50
16.03.1983	1,19	1,10	8,38	2,35	0,83	1,28	1,38	2,46	2,02
17.03.1983	4,62	0,97	10,51	2,66	0,44	1,20	1,11	3,93	1,85
23.03.1983	3,43	0,83	8,93	2,16	0,38	1,33	1,22	5,10	1,30
5.04.1983	6,67	1,35	7,86	2,30	0,61	1,88	1,15	-	2,19
6.04.1983	4,03	0,96	15,36	2,96	0,90	1,27	0,91	3,10	1,13
7.04.1983	3,56	1,15	14,92	2,67	0,48	1,50	0,92	5,25	1,90
11.04.1983	4,29	1,05	10,69	2,34	0,79	1,19	0,97	3,04	1,47
12.02.1985	2,57	0,60	6,40	1,78	0,64	1,08	0,96	1,72	1,64
14.02.1985	2,82	1,12	12,30	2,48	0,66	1,43	1,51	0,98	2,10
19.02.1985	1,12	1,11	14,85	2,62	0,86	2,50	1,85	-	2,10
20.02.1985	4,85	0,82	14,85	2,64	1,06	2,23	1,33	2,18	1,43
21.02.1985	2,26	1,15	14,08	2,40	0,78	2,50	1,15	2,26	1,60
25.02.1985	1,66	1,26	14,99	2,89	1,45	1,65	1,01	1,37	2,92
26.02.1985	2,60	1,26	11,18	1,32	0,96	2,71	1,01	2,56	0,96
5.03.1985	4,80	1,13	10,31	2,78	0,73	1,68	1,15	1,98	3,33
6.03.1985	1,05	0,98	12,06	2,72	0,59	1,06	0,81	3,86	0,77
7.03.1985	2,71	1,26	13,97	3,36	0,49	1,54	1,01	3,86	0,96
21.03.1985	1,28	1,35	14,04	2,74	0,43	1,79	1,42	1,82	0,70
25.03.1985	2,33	1,46	14,27	2,74	0,85	1,20	1,47	2,43	1,38
26.03.1985	2,14	0,83	10,15	2,38	1,99	1,22	0,93	1,61	1,85
28.03.1985	4,64	1,16	7,69	2,72	1,51	1,76	1,04	4,24	3,70
10.04.1985	4,12	1,20	10,01	2,21	0,39	1,33	1,12	-	2,07
11.04.1985	3,12	1,07	9,69	2,79	0,43	1,45	1,29	-	1,77
17.04.1985	2,82	0,94	9,51	2,72	0,36	1,79	1,40	-	0,79
24.04.1985	2,80	1,12	16,04	3,10	0,82	1,70	1,24	4,23	1,52
22.02.1988	2,81	1,19	8,23	2,57	1,73	1,88	1,16	3,64	1,60
1.03.1988	3,20	1,10	10,42	2,18	0,63	1,71	1,05	2,94	2,26
2.03.1988	4,48	1,42	9,85	2,30	1,66	2,25	1,36	5,09	2,63
9.03.1988	2,61	1,26	10,15	2,17	0,54	1,17	0,78	1,73	1,14
10.03.1988	2,53	1,16	9,55	2,21	0,89	1,75	0,96	4,61	1,57
24.03.1988	2,17	1,13	6,35	1,81	0,29	1,32	1,17	1,46	1,97
6.04.1988	1,88	1,12	7,27	1,80	0,38	1,20	0,90	1,18	0,86
7.04.1988	1,34	1,05	5,19	1,95	0,53	1,27	1,08	1,68	2,33
28.04.1988	2,70	1,09	5,67	2,06	0,49	1,06	1,27	2,03	1,09
3.05.1988	1,65	1,11	5,57	2,29	0,96	1,61	1,50	2,46	1,43
11.05.1988	1,58	0,97	6,04	1,84	0,70	1,78	1,60	2,92	1,89

TABLA XXIX - Distribución de elementos inorgánicos entre corteza y pulpa.

5.2. Composición mineral de las naranjas amargas.

5.2.1. Distribución de los elementos entre corteza y pulpa

En la tabla XXIX se presentan los cocientes entre las concentraciones de los elementos investigados en la corteza y en la pulpa. Con carácter general, salvo en el caso del fósforo, todos tienden a concentrarse en la corteza, como se aprecia por los valores medios (tabla XXX).

	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Mn	Zn
Valor medio	3,23	1,12	10,42	2,46	0,74	1,70	1,21	2,98	1,86
Valor mínimo	1,05	0,60	5,19	1,32	0,29	1,06	0,78	0,98	0,70
Valor máximo	8,51	1,46	16,04	3,36	1,99	4,35	2,14	5,30	4,53
Desviación típica (s)	1,55	0,17	2,81	0,38	0,36	0,58	0,29	1,21	0,76
100 . s / media	48,0	15,2	27,0	15,6	49,3	34,1	23,7	40,6	40,9

TABLA XXX - Distribuciones de los elementos entre corteza y pulpa: resumen.

El calcio es el que da un cociente más elevado, posiblemente debido a su relación con las pectinas del albedo, como se desprende de los datos de Nickdel et al. (1991) y de Xu et al. (1994). La mayor concentración de calcio en las cortezas que en el zumo también había sido puesta de manifiesto por Attaway y Carter (1971) y por Attaway et al. (1972), ya que advertían que aquéllos obtenidos por exprimido enérgico contenían el doble de calcio que los extraídos suavemente. Pero incluso en los zumos, el calcio se fija preferentemente en su fracción sólida, como se deduce de los datos aportados por Borrero y Romero (1986) para los de naranjas amargas de Sevilla, si bien la diferencia de concentraciones no es tan acusada. Por otro lado, los cocientes entre corteza y pulpa no se mantienen invariables entre campañas ni siquiera a lo largo de una misma campaña, como se puede ver en la columna correspondiente de la tabla XXIX, sino que va descendiendo a lo largo de cada una de ellas, para subir ligeramente hacia el final, lo que puede estar

relacionado con un comportamiento análogo de la textura de las cortezas observado por Nebot et al. (1993), debido a la asociación calcio-pectinas.

El cociente de concentraciones para el magnesio muestra una pequeña variabilidad, al igual que encontraron Borrero y Romero (1986) para las dos fracciones del zumo de estas mismas naranjas. En los zumos las medias de concentraciones entre ambas fases son casi idénticas, en lo que se basan algunos investigadores para adoptarlo como referencia a fin de normalizar la composición mineral, al encontrarlo prácticamente invariable y no dependiente del origen geográfico de las frutas (Martin et al., 1997). Ahora bien, el magnesio también se localiza preferentemente en las cortezas y las condiciones de extracción del zumo, como una presión excesiva, pueden hacer subir su concentración en el jugo, si bien no de forma tan acusada como sucede con el calcio. Pero además la distribución entre corteza y pulpa no es tan invariable como podría deducirse del valor del coeficiente de variación (figura 17), percibiéndose una cierta tendencia decreciente, parecida a la del calcio. Esta semejanza de comportamientos no es de extrañar, puesto que la química de ambos elementos tiene mucho en común y de hecho, si se representan los cocientes de calcio en cortezas y pulpas frente a los correspondientes del magnesio en ambas partes de los frutos (figura 18) se ve que existe una correlación estadísticamente significativa entre ellos. Así, pues, en los derivados en que haya incorporación de cortezas no sería aplicable su utilización como elemento de referencia.

Un elemento cuyo cociente de concentraciones también tiene un coeficiente de variación bajo es el potasio, que además se distribuye prácticamente por igual entre corteza y pulpa, al igual que entre pulpa y suero (Borrero y Romero, 1986). Más aún, observando su tendencia a lo largo de las tres campañas (figura 19), no se aprecia ninguna tendencia creciente ni decreciente, lo que permitiría su utilización como elemento de referencia en los derivados, si no fuera por la facilidad con que se puede incorporar, tanto intencionada como accidentalmente o a través de los ingredientes.

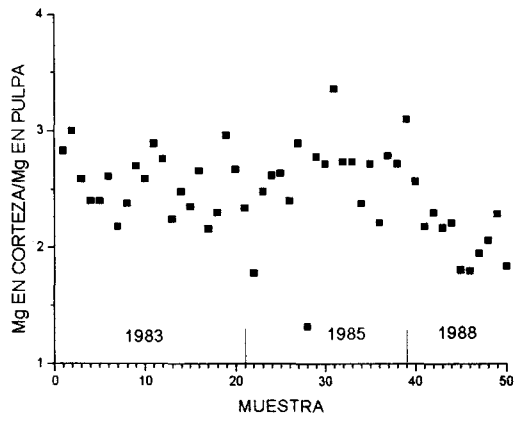


FIGURA 17 – Distribución del magnesio entre corteza y pulpa.

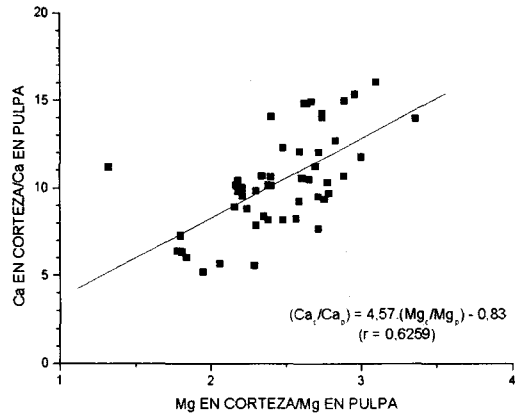


FIGURA 18 – Distribuciones comparadas de Ca y Mg entre corteza y pulpa.

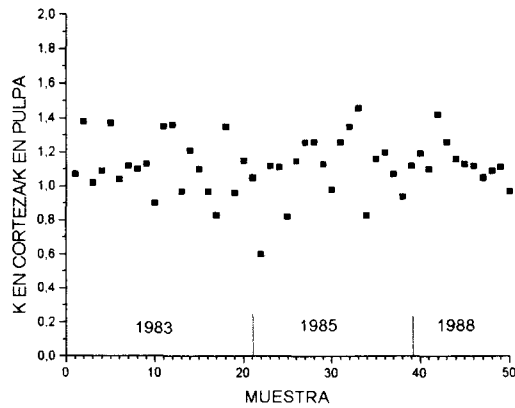


FIGURA 19 - Distribución del potasio entre corteza y pulpa.

El cobre, de acuerdo con Nickdel et al. (1991), es uno de los elementos que más grado de asociación presenta con las pectinas, por lo que debía esperarse una mayor diferencia de concentraciones entre cortezas y pulpa. Sin embargo, los cocientes de las concentraciones del cobre entre ambas partes son del mismo orden de magnitud que los encontrados para el potasio, aunque sus cocientes son ligeramente mayores y su variabilidad es mayor que la de aquél. Su uso tal vez podría tener una cierta utilidad en el control industrial, como indicador de la contaminación de las materias primas, habida cuenta de que compuestos de cobre se emplean en tratamientos fitosanitarios, por lo que valores elevados podrían ser indicativos de dichos tratamientos y de un lavado deficiente de los frutos.

Mayor aún es la variabilidad hallada para el hierro, también en mayor proporción en las cortezas que en el zumo. Pero tampoco sería de utilidad como índice, puesto que aparatos e instalaciones industriales se construyen con materiales que contienen hierro, el cual, en mayor o menor medida, se puede incorporar a los zumos y las pulpas. Existen estudios sobre la contaminación por hierro en zumos enlatados, que lo confirman este extremo (Berkovic et al., 1995).

El resto de los elementos analizados tiene coeficientes de variación superiores al 40 % y de todos ellos, únicamente el fósforo se concentra con preferencia en la pulpa sobre las cortezas. El fósforo tiene por lo general una mayor concentración en la pulpa que en el resto de las partes del fruto, pues en el suero la media de concentraciones es la mitad que la de las pulpas (Borrero y Romero, 1986). Este comportamiento no se corresponde con el que presenta en otros materiales biológicos en los que el fósforo está asociado al calcio y con frecuencia al magnesio. Si bien en ocasiones se ha utilizado el ácido fosfórico para regular en pH de los derivados y su determinación podría ponerlo de manifiesto, su utilización tampoco parece viable, puesto que el fósforo, en forma de derivados, es de uso general en la industria para el lavado de las instalaciones.

Sodio y manganeso tienen concentraciones en las cortezas del orden del triple que en las pulpas, mientras que en el caso del cinc, el cociente es próximo a 2. Una característica de los zumos cítricos es su bajo contenido de sodio, con unas concentraciones semejantes en las fracciones sólida y líquida (Borrero y Romero, 1986; Royo y Giménez, 1974), por lo que un contenido más elevado de lo normal en un zumo no sólo podría atribuirse a una presión excesiva durante el exprimido o a la adición de extractos de corteza, sino que al ser un elemento ubicuo altos valores del sodio son esperables en cualquier producto derivado. En el caso del cinc, su concentración preferente en las cortezas era previsible, puesto que es, junto con el cobre, el elemento más fuertemente unido a las pectinas (Nickdel et al., 1991).

5.2.2. Composición mineral de las cortezas.

En la tabla XII se presentan los resultados de los contenidos de agua de las cortezas, los cuales se han utilizado para poder expresar, excepto en el caso del nitrógeno, las concentraciones elementales obtenidas en base seca, a base húmeda (tablas XIV a XXI).

Para poder apreciar mejor las tendencias, se representan en la figura 20 las medias de las muestras móviles (N = 5) de las humedades de las cortezas, para cada campaña, observándose valores sistemáticamente más altos en el año 1988 que en los otros dos. Con el fin de ver si la humedad de las cortezas guarda algún tipo de relación con el régimen pluviométrico durante el crecimiento de los frutos ya formados, se han representado en la figura 21 los valores medios de las humedades de las cortezas frente a las lluvias de los períodos Agosto-Noviembre que preceden a la recolección. Como puede observarse, las altas precipitaciones parecen favorecer la absorción de agua por las cortezas, aunque no aumentan el porcentaje de corteza en los frutos (tabla XVIII), indicando que desarrollan una menor proporción de albedo.

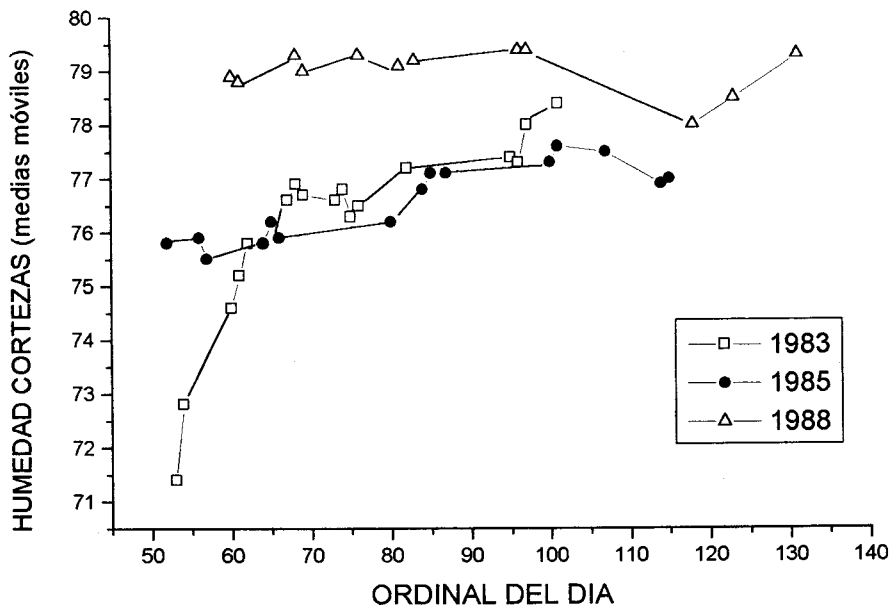


FIGURA 20 - Evolución de la humedad de las cortezas (medias móviles).

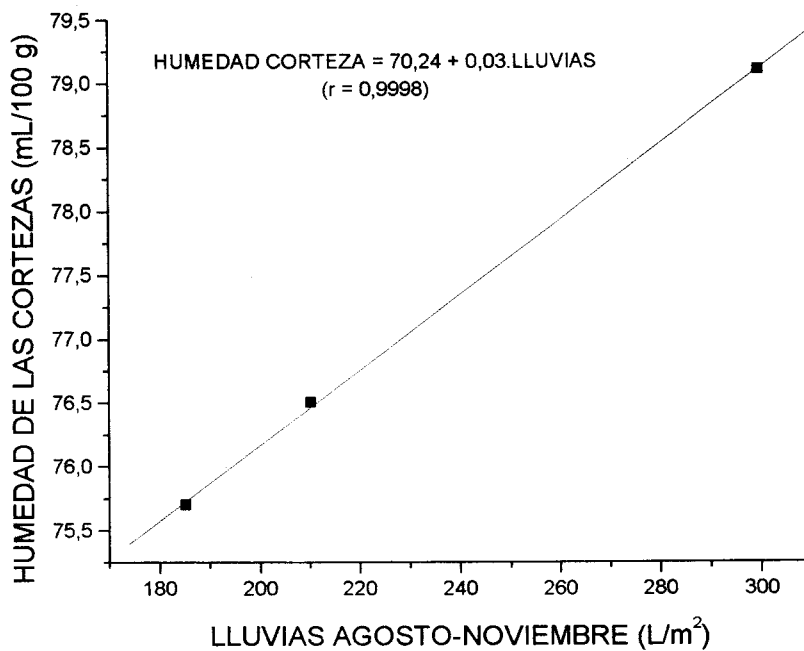


FIGURA 21 – Influencia de las lluvias sobre la humedad de las cortezas.

En la tabla XXXI se presentan para todos los elementos estudiados y obtenidos a partir de las concentraciones en base seca, los valores medios, las desviaciones típicas y los coeficientes de variación.

Campaña 82-83	N	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Mn	Zn
Valor medio	-	10,55	835,7	914,9	105,5	51,6	1,53	0,33	0,39	0,65
Desviación típica (s)	-	2,29	166,7	142,9	13,5	8,8	0,43	0,08	0,08	0,18
100. s / media	-	21,7	19,9	15,6	12,8	17,0	28,1	24,2	20,51	27,69
Campaña 84-85										
Valor medio	652,18	8,82	951,9	1028,4	89,9	48,2	1,61	0,37	0,43	0,90
Desviación típica (s)	110,64	3,23	177,6	104,6	15,3	15,0	0,40	0,07	0,10	0,24
100. s / media	17,0	36,6	18,7	10,2	17,0	31,1	24,8	18,9	23,3	26,7
Campaña 87-88										
Valor medio	610,56	8,02	770,4	921,3	84,7	41,8	1,47	0,29	0,38	0,72
Desviación típica (s)	150,67	2,15	77,4	162,5	12,9	12,4	0,20	0,05	0,07	0,18
100. s / media	24,7	26,8	10,0	17,6	15,2	29,7	13,6	17,2	18,4	25,0

TABLA XXXI – Valores medios y variabilidad de minerales en las cortezas.

De los elementos considerados, los más abundantes, con diferencia sobre el resto, son calcio, potasio y nitrógeno, siguiéndoles magnesio y fósforo y a continuación el sodio. En proporciones menores a 1,6 mg/100 g se encuentran, por orden decreciente, hierro, cinc, manganeso y cobre. Por lo que se refiere a la dispersión de resultados, considerando globalmente los valores de las tres campañas, tienen coeficientes de variación entre el 15 y el 20 % calcio, magnesio y potasio y de entre el 20 y el 25 %, manganeso, cobre e hierro. El resto de los elementos presenta coeficientes de variación superiores al 25 %. Entre campañas, los valores medios son del mismo orden, observándose las mayores discrepancias en el caso del cinc.

El contenido de nitrógeno en las cortezas es elevado, lo que justifica la utilización tradicional como pienso para el ganado vacuno del residuo de las industrias de zumos, de los que las cortezas constituyen la fracción mayoritaria. Sin embargo, esta utilización en el caso de las naranjas amargas no sería tan factible, porque en la industria derivada se suelen aprovechar las cortezas en la

elaboración de preparados básicos y derivados azucarados y, además, el contenido de antoxantinas amargas podría hacerlo rechazable. Un aspecto a tener en cuenta es que en la confección de derivados las cortezas se cuecen con agua, con lo que se produce la extracción de componentes, presumiblemente con la consecuencia de la disminución de la fracción nitrogenada. La presencia de compuestos solubles de nitrógeno se pone de manifiesto tanto en preparados básicos como en confituras, jaleas, mermeladas y marmalades, debido a las reacciones de Maillard con compuestos carbonílicos, siendo el resultado un oscurecimiento progresivo, acompañado del desarrollo de sabores anómalos. La no incorporación al producto del agua de cocción de las cortezas reduce este riesgo, pues son las cortezas las partes de los cítricos más ricos en ambos tipos de sustancias, pero por otro lado reduce el valor nutritivo del producto resultante, al perderse el nitrógeno por lixiviación.

Con el fin de ver si existen relaciones entre elementos y puesto que en ocasiones se han propuesto como parámetros de caracterización las relaciones entre pares de elementos, en la tabla XXXII se muestran los valores medios, desviaciones típicas, y coeficientes de variación para estos cocientes, considerando globalmente las tres campañas estudiadas.

Cocientes	Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo	Desviación típica (s)	100. s / media
Ca/K	1,1	0,7	2,1	0,2	18,2
K/Cu	2648,8	1373,4	3857,6	548,6	20,7
Ca/Cu	2978,5	1768,7	5655,2	680,8	22,9
Ca/Mg	10,4	6,9	21,6	2,4	23,1
Fe/Cu	4,8	2,2	8,8	1,3	27,1
K/Mg	9,3	5,5	23,0	2,6	28,0
Zn/Cu	2,4	0,9	4,1	0,8	33,3
Fe/Mn	4,0	2,1	9,2	1,4	35,0
Ca/P	21,7	11,7	45,3	7,7	35,5

TABLA XXXII – Cocientes entre pares de elementos en la corteza.

Se puede observar que los coeficientes de variación pueden agruparse en dos grupos, el primero de cuatro relaciones con valores en torno al 20 % y el segundo con cinco cocientes con valores de alrededor del 30 %. Las que menos variabilidad exhiben son la de calcio a potasio y la de potasio a cobre, seguidas de la de calcio a magnesio y la de calcio a cobre. En tres relaciones del primer grupo aparece el calcio y en dos el potasio y el cobre y el magnesio, al que curiosamente toman muchos como referencia, participa sólo en una de ellas. Como se verá más adelante, la distribución que exhibe el cociente (K/Cu) en las cortezas es semejante al de las pulpas, por lo que en todo caso sería el único que podría tener alguna utilidad.

5.2.3. Composición mineral de las pulpas

En la tabla XXXIII se resumen los valores de las concentraciones en la pulpa, globalmente considerados, para las tres campañas. Debe recordarse que en la campaña 1982-83 el sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo e hierro se incluyeron en las tablas a efectos comparativos, pero no fueron objeto de esta tesis. Sin embargo, el cobre, manganeso y cinc sí se determinaron dentro de ella. Los valores de esta tabla incluyen a todos, propios y no.

Elemento	Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo	Desviación típica (s)	100. s / media
K	176,4	119,9	228,5	28,4	16,1
Ca	21,92	15,74	34,50	3,82	17,4
P	16,8	6,7	25,5	5,0	29,8
Mg	8,88	7,28	10,52	0,97	10,9
Na	0,80	0,39	2,23	0,40	50,0
Fe	0,22	0,14	0,37	0,056	25,4
Zn	0,11	0,040	0,336	0,060	54,5
Cu	0,065	0,040	0,096	0,012	18,5
Mn	0,029	0,000 (n.d.)	0,070	0,018	62,1

TABLA XXXIII – Resumen de las concentraciones en las pulpas.

En general los resultados están bastante de acuerdo con los publicados para la naranja amarga, campaña 1982-83 (Borrero y Romero, 1986), siendo el fósforo el que exhibe una mayor diferencia. Dado que el cinc, el cobre y el manganeso se han determinado por vez primera, no se pueden establecer comparaciones con zumos de la misma especie. Debe advertirse que en el caso del manganeso, algunas muestras han quedado por debajo del límite de detección de la técnica empleada y a efectos de cálculo aparecen como 0,000 mg/100 g, razón por la que posiblemente su coeficiente de variación sea tan elevado. Como se puede apreciar, el potasio es el elemento mayoritario y su valor medio es del mismo orden que los comunicados anteriormente para el suero, por lo que en lo referente al potasio, la composición de un zumo no debería verse afectada por su contenido de pulpa. Lo mismo sucede en el caso del sodio y del magnesio, razón por la que algunos investigadores lo eligen como referencia.

Con el fin de apreciar si la concentración de algún constituyente aumenta o desciende sistemáticamente a lo largo de la campaña, se ha aplicado la técnica de la muestra móvil (N = 5) a todos los elementos analizados. Únicamente se ha podido detectar una clara evolución en las concentraciones de calcio y fósforo en la pulpa, y en menor medida en el magnesio. En ellos las concentraciones decrecen a lo largo de la campaña, siendo las evoluciones de calcio y fósforo más parecidas entre sí que con la del magnesio. Por tanto, parte de la variabilidad inherente a sus distribuciones es achacable a esta circunstancia. En las figuras 22 y 23 se puede ver cómo el calcio y el fósforo, respectivamente, van reduciendo su presencia en la pulpa a medida que avanza la campaña.

Para tratar de ver si entre los diferentes elementos existen también algunas interacciones se han calculado los cocientes entre pares de ellos, al igual que se hizo para las cortezas, obteniéndose como resumen los datos que se recogen en la tabla XXXIV.

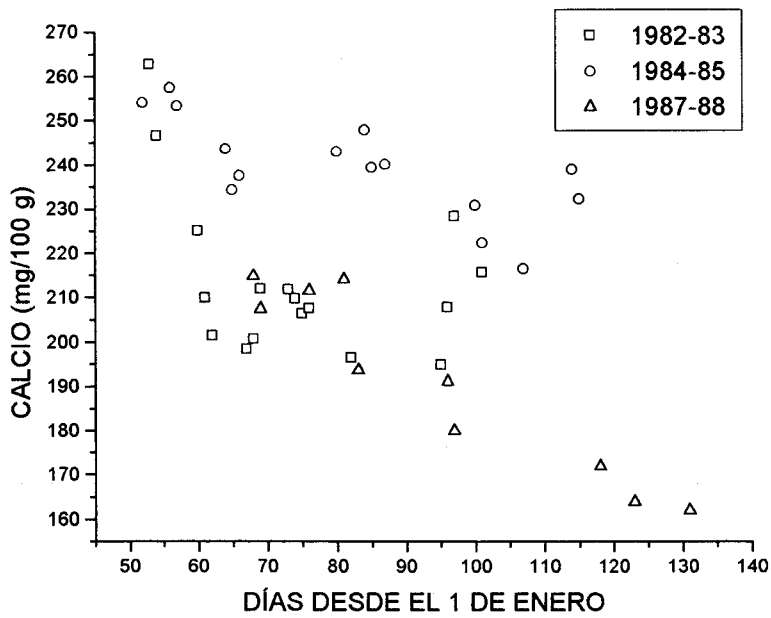


FIGURA 22 – Evolución de las concentraciones de Ca en pulpas (medias móviles, N = 5).

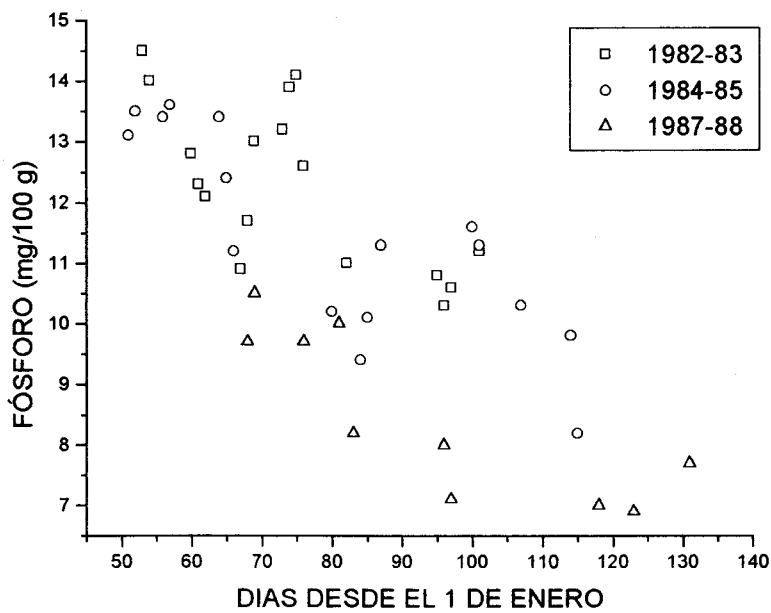


FIGURA 23 – Evolución de la concentración de P en las pulpas (muestras móviles, N = 5).

Cocientes	Valor medio	Valor mínimo	Valor máximo	Desviación típica (s)	100. s / media
K/Cu	2774,6	1713,0	3866,7	462,7	16,7
Ca/Mg	2,50	1,61	4,06	0,52	20,8
P/Mg	1,9	0,9	2,6	0,4	21,0
Fe/Cu	3,44	1,77	5,96	0,82	23,8
K/Ca	8,3	4,7	13,0	2,1	25,3
P/Ca	0,8	0,3	1,4	0,3	37,5
K/Na	264,6	77,4	518,0	108,0	40,8
Zn/Cu	1,64	0,81	4,60	0,80	48,8

TABLA XXXII – Cocientes entre pares de elementos en la pulpa.

Se puede apreciar que la menor variabilidad la presenta el cociente entre potasio y cobre, dándose la circunstancia de que el 42 % de las muestras individuales están comprendidas en un estrecho intervalo de 2700 a 3000. Los valores medios para cada campaña individual son 2840,1 (1982-83), 2778,0 (1984-85) y 2649,3 (1987-88), prácticamente idénticos. Si no fuera porque el potasio es un elemento que se puede incorporar con mucha facilidad a los derivados (incluso acompañando a ingredientes), sería un buen parámetro para detectar adiciones de cobre o impurificación por este metal. Como era de esperar, las relaciones entre calcio y magnesio y entre fósforo y magnesio presentan variabilidades moderadas, pero no la relación entre fósforo y calcio, a pesar de que las tendencias evolutivas a lo largo de la campaña, de estos tres elementos, como se ha puesto de manifiesto anteriormente, es parecida.

Aunque el interés por el estudio de la fracción mineral de los cítricos ha ido decayendo, podría interesar plantearse el análisis de elementos inorgánicos en las cortezas, a fin de evaluar el alcance de la contaminación por factores ambientales, pues el naranjo amargo es un árbol ornamental de nuestras ciudades. Esta información permitiría acometer el estudio del aprovechamiento industrial de sus frutas, con el consiguiente beneficio social.

5.2.4. Aplicación de técnicas estadísticas multivariantes

Las técnicas estadísticas multivariantes se vienen utilizando para resolver problemas como caracterización y diferenciación de zumos de diferentes especies o variedades de cítricos, detección de adulteraciones, determinación de la autenticidad o distinción entre zumos sometidos a diversos tratamientos (Aries y col., 1986; Shaw y col., 1993).

El análisis en componentes principales, como técnica de reducción de variables, ha sido aplicado para separar adecuadamente muestras de zumos de diferentes especies o bien determinar la composición de posibles mezclas, mediante la determinación de compuestos flavonoides por HPLC (Mouly y col., 1991; Gamache y col., 1993). Ha permitido también reducir el número de componentes aromáticos que es necesario identificar para diferenciar entre zumos de variedades de naranjas dulces como Valencia late, Sanguinello y Moro (Maccarone y col., 1998) o entre variedades de mandarinas y otras naranjas (Moshonas y col., 1997). El tratamiento de resultados mediante el análisis de componentes principales ha sido muy utilizado para distinguir grupos de muestras de zumos de naranja adulteradas de otras que no lo son, utilizando diferentes técnicas analíticas como la cromatografía líquida (Perfetti y col., 1988) o la espectroscopía NIR (Twomey y col., 1995) y para determinar la autenticidad de derivados de cítricos (Vogels y col., 1996).

Utilizando el análisis discriminante Rapisarda y col. (1998) determinan la distribución de compuestos que se han de utilizar como marcadores de zumos de diferentes variedades de cítricos. Usando el análisis discriminante y el análisis en componentes principales Marini y Balestriri (1995) consiguen separar zumos de naranja dulce de zumos adulterados con naranja amarga o pomelo.

Con objeto de extraer las conclusiones más relevantes a partir de la información mineral obtenida para las muestras estudiadas, se ha llevado a cabo el análisis estadístico de los resultados aplicando técnicas multivariantes.

El estudio realizado en esta memoria persigue la identificación de los constituyentes minerales de la naranja amarga que permiten diferenciar entre zonas de la misma, así como las diferencias entre campañas, ya que factores climatológicos como la pluviometría pueden influir en la concentración mineral. El régimen de lluvias determina un mayor o menor rendimiento de zumo (parece ser que precipitaciones abundantes en primavera y en invierno lo aumentan) y como consecuencia una concentración o dilución de sus constituyentes.

Para comprobar si existen diferencias cuando las muestras se agrupan en clases preestablecidas, se han seguido dos criterios de agrupación, la zona de la naranja, donde se consideran dos grupos: corteza y pulpa; y la campaña, considerando tres (1982-83, 1984-85 y 1987-88).

Con el fin de evitar el error que podría suponer las grandes diferencias de valores para los minerales estudiados (desde 0,1 ppm de algunos de los elementos traza hasta más de 200 ppm para el potasio) se ha procedido a la estandarización de los datos $((x - \bar{x})/s)$ que proporciona distribuciones con media 0 y desviación típica 1.

Los diferentes tratamientos estadísticos multivariantes se han realizado utilizando el paquete estadístico *STATISTICA*® (Stasoft, 1999).

5.2.4.1. Análisis en componentes principales. El análisis en componentes principales (ACP) permite establecer la relación entre las distintas variables medidas y proponer modelos de reducción de parámetros con la mínima pérdida de información.

El objeto del análisis es tomar p variables $v_1, v_2, v_3, \dots, v_p$ y encontrar combinaciones de ellas o índices $z_1, z_2, z_3, \dots, z_p$, no correlacionados entre sí, lo que significa que representan distintas "dimensiones" en los datos. Además, los índices se calculan en orden decreciente de varianza, de esta manera la variación que representa z_1 es mayor que la que corresponde a z_2 , y así sucesivamente. Los distintos z_i forman las componentes principales de la serie de datos en cuestión. Cuando se realiza un ACP se espera que la mayoría de los índices presenten varianzas despreciables y por tanto, que la variación en la serie de datos esté representada por sólo las primeras componentes z .

Los mejores resultados se obtienen cuando las variables originales están fuertemente correlacionadas. Así, si se dan coeficientes de correlación altos (positivos o negativos) es posible que hasta 20 ó 30 variables originales puedan quedar adecuadamente representadas por sólo dos o tres componentes principales, que serán de interés como medida de las dimensiones de los datos. Como la 1ª componente principal es la que representa la mayor parte de la varianza, se puede concluir que z_1 es un *promedio estandarizado* de las medidas que representa. Es la combinación lineal de las variables observadas que maximizan la separación entre los casos. La segunda componente se extrae a partir de la variación restante en los datos, después de eliminar la varianza asociada a la primera componente; y es una combinación lineal de las variables observadas, que extrae la máxima variabilidad, no correlacionada con la primera componente. Las siguientes componentes extraen sucesivamente la máxima variabilidad residual y son ortogonales con las anteriores.

No se puede dar una regla empírica para interpretar los factores, pero algunos autores consideran que los pesos por encima de 0,30 son interpretables. Tabachnick y Fidell (1983) sugieren como *excelente* los pesos por encima de 0,71, *muy bueno* por encima de 0,63, *bueno* por encima de 0,55, *regular* por encima de 0,45 y *malo* cuando los pesos están por encima de 0,32.

En esta memoria se han realizado diversos análisis en componentes principales con las 50 muestras de las que se tenían datos de todos los minerales determinados.

La tabla XXXIII muestra los resultados para el ACP realizado sobre todos los minerales determinados en la corteza. El primer componente está fuertemente correlacionado con el calcio; la correlación con el fósforo, magnesio y potasio es muy buena; con el hierro y cobre, es buena y el resto de los casos están mal correlacionados. El segundo factor se encuentra altamente correlacionado con el zinc y presenta una buena correlación para el cobre.

Variables	Factor 1	Factor 2
Na	- 0,401935	- 0,329338
K	- 0,634057	0,257552
Ca	- 0,805982	0,022761
Mg	- 0,678339	- 0,242902
P	- 0,673800	- 0,379188
Fe	- 0,591149	- 0,033255
Cu	- 0,589415	0,546479
Mn	- 0,393731	- 0,232461
Zn	- 0,225406	0,710161

TABLA XXXIII - Composición de los primeros componentes (*Loading*).
Minerales de la corteza. Todas las variables.

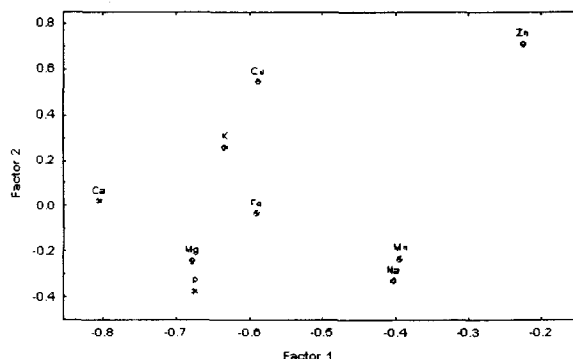


FIGURA 24 – Corteza: representación de todas las variables originales en el plano de los nuevos componentes.

En el caso de la pulpa (tabla XXXIV) el primer componente presenta una excelente correlación para el cobre, para el cinc una muy buena correlación y en el caso del hierro y manganeso se puede decir que la correlación es buena.

Variabes	Factor 1	Factor 2
Sodio	0,314586	- 0,046751
Potasio	0,437359	- 0,619595
Calcio	- 0,186260	0,226041
Magnesio	- 0,511299	- 0,746206
Fósforo	- 0,356308	- 0,804904
Hierro	0,589535	- 0,251557
Cobre	0,724859	- 0,472481
Manganeso	0,551136	0,264872
Zinc	0,653544	0,006533

TABLA XXXIV - Composición de los primeros componentes (*Loading*),
Minerales de la pulpa, Todas las variables

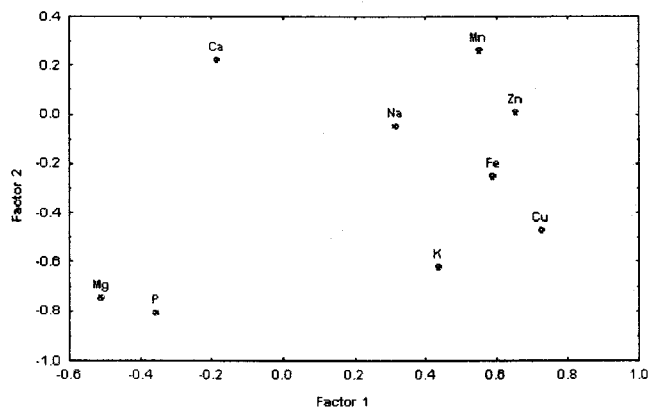


FIGURA 25 – Pulpa: representación de todas las variables originales en el plano de los nuevos componentes,

En la tabla XXXV se muestran los valores (*scores*) obtenidos para las muestras de pulpa y corteza según ambos factores, La representación gráfica de los mismos para la corteza (figura 26) indica una buena diferenciación de las muestras de la campaña de 1988, situándose hacia valores elevados del primer componente,

Muestra	CORTEZA		PULPA	
	Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2
83-01	-1,24160	-1,10534	0,02432	-0,23282
83-02	-2,50879	0,52809	-0,09724	-1,83881
83-03	-1,30582	-0,25825	-0,68447	-0,66868
83-04	-0,48263	-1,56419	-1,01160	-0,77061
83-05	0,18509	-3,45764	-1,57319	-0,32852
83-06	-0,23740	-0,59661	-0,39683	-0,62450
83-07	0,20757	1,08807	-0,07913	-0,79374
83-08	0,05712	-0,62238	-1,30692	-0,89342
83-09	0,00249	-1,04748	-0,97814	-1,28822
83-10	0,02100	-0,25904	-0,66752	-0,84045
83-11	-1,66852	-0,06102	-0,98380	-1,05946
83-12	-1,18790	-0,04758	-1,33300	-1,17602
83-13	0,33708	-1,28198	-0,96935	-0,34953
83-14	-0,04274	-1,02469	-0,63548	-0,56781
83-15	0,06876	-0,01520	0,37238	-0,03739
83-16	-0,36039	-0,80383	-0,36814	-1,24343
83-17	0,85337	0,18253	-0,29220	-1,08494
83-18	-0,02469	-0,73674	-1,47205	-0,66386
83-19	0,10674	-0,82586	0,12424	-0,11337
83-20	-0,65302	-0,95153	-0,95105	-1,04687
83-21	0,48040	-0,68683	0,27745	-0,67484
85-22	0,35188	0,07086	2,08247	-0,74015
85-23	-0,55066	1,23733	0,95279	-0,60229
85-24	-1,58907	1,17908	,50445	-0,23003
85-25	-1,51476	-1,25045	1,51747	-0,07965
85-26	-0,51126	0,06912	0,54241	0,11371
85-27	-0,31846	0,30644	1,41346	0,91280
85-28	-0,04255	1,25028	1,31950	0,33303
85-29	-0,62678	1,18683	0,36321	0,10205
85-30	-0,02769	0,84093	2,82500	-1,03746
85-31	-0,68515	0,65263	1,77844	0,44274
85-32	-0,53355	2,02381	1,51408	-0,50354
85-33	-0,30416	1,10034	0,38503	0,08637
85-34	0,22588	-0,17043	1,65723	0,64276
85-35	-0,71673	0,68411	0,15890	0,64436
85-36	0,04096	0,57522	-0,45789	-0,46071
85-37	0,33887	1,51295	-0,02229	0,65873
85-38	0,26426	1,65903	0,75626	-0,05374
85-39	-1,35379	0,29468	0,32623	-0,49572
88-40	1,02710	-0,70051	-0,48028	2,33621
88-41	1,29091	-0,21040	-0,58031	1,52297
88-42	0,01858	-0,48802	-1,04649	2,22816
88-43	1,52201	-0,44502	0,18242	1,23957
88-44	1,11558	-0,73918	-0,90605	1,39988
88-45	2,32310	0,88113	-0,57603	1,80416
88-46	1,89766	0,02895	0,16465	0,87128
88-47	1,65779	0,51976	-0,24404	1,13800
88-48	1,09839	1,15257	0,64407	0,83345
88-49	1,28674	0,32943	-0,83879	1,71131
88-50	1,70876	-0,00398	-0,93420	1,47905

TABLA XXXV - Factores scores, Todas las variables,

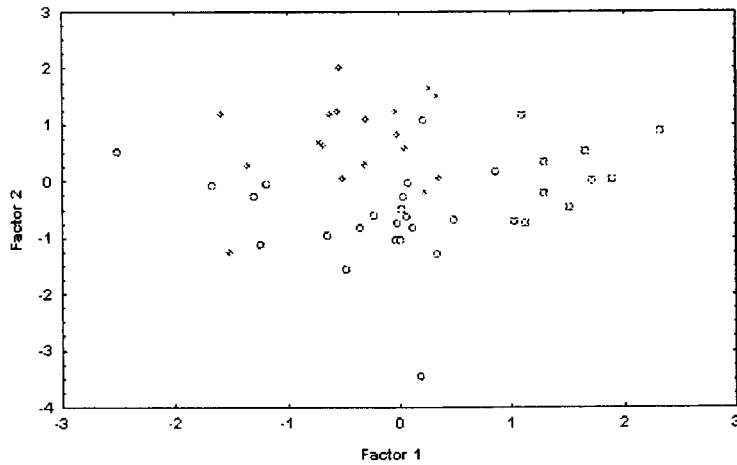


FIGURA 26 – Representación de las muestras de corteza por campañas, según los dos primeros componentes principales.

El contenido mineral de la pulpa diferencia mejor por campañas que en el caso de la corteza, como puede verse en la representación gráfica de los factores (figura 27). Las tres campañas se separan muy bien según los dos primeros componentes,

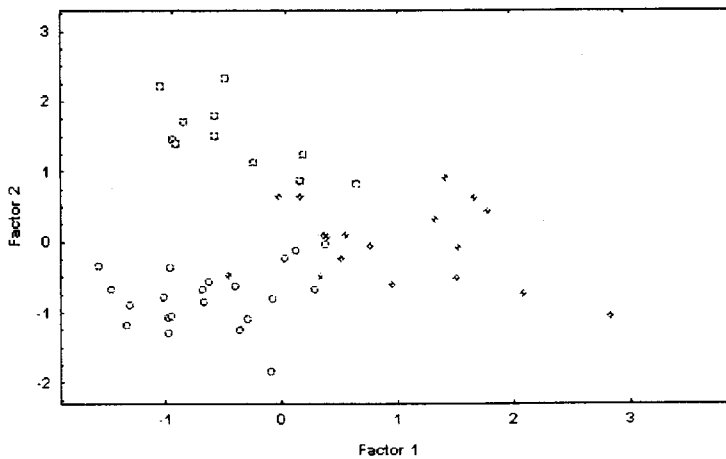


FIGURA 27 – Representación de las muestras de pulpa por campañas, según los dos primeros componentes principales. Todas las variables.

5.2.4.2. Análisis de agrupaciones jerarquizadas. El análisis de agrupaciones jerarquizadas (análisis de grupos o *análisis cluster*) está diseñado para un tipo de problema muy específico (Manly, 1986): dada una muestra con n casos para los que se determinan p variables, se proyecta un esquema para agrupar los objetos (casos o variables) en clases, de tal manera que los "similares" se encuentren agrupados en la misma clase. El número de clases no se conoce previamente, lo que hace que el problema sea bastante más difícil que otros análisis como el de funciones discriminantes, donde los grupos son previamente conocidos.

Hay muchas razones por las que el análisis de grupos debe tenerse en cuenta: puede ser útil para la reducción de datos, o para encontrar los grupos verdaderos; en ocasiones, el *análisis cluster* produce agrupaciones inesperadas, y puede resultar de interés estudiar las relaciones que existan dentro de ellas.

Uno de los procedimientos para realizar un *análisis cluster* es el método jerarquizado, que parte de la matriz de distancias entre individuos y establece los grupos mediante un determinado algoritmo. Así, los objetos individuales son agrupados gradualmente hasta llegar a un conjunto único; o viceversa, el conjunto de todos los objetos es dividido paulatinamente hasta que cada uno se encuentre incluido en un grupo unitario, diferenciado del resto. En otro tipo de procedimientos los objetos se mueven entre grupos por semejanza.

La medida de la distancia euclídea entre objetos es la más utilizada en el caso de variables cuantitativas. Así entre dos individuos i, j de los que se conocen los valores de p variables x_p , la distancia $d_{i,j}$ es:

$$d_{i,j} = (\sum (x_{i,k} - x_{j,k})^2)^{1/2}$$

Es una medida promediada de todas las p posibles distancias entre individuos (en el espacio p -dimensional considerado). Obtenida la matriz completa de distancias, se establecen las agrupaciones en orden creciente incluyendo, de manera individual, cada objeto en el grupo más cercano.

El método de “vecinos más cercanos” produce el amalgamamiento cuando se alcanza la menor distancia entre individuos de cada grupo. Si el amalgamamiento no se produce hasta alcanzar la máxima distancia entre los objetos de cada grupo el algoritmo se denomina de “vecinos más alejados”. Y se denomina “amalgamamiento promediado de grupos” cuando éste se produce al alcanzarse la distancia media entre los objetos de ambos grupos.

El método de análisis de agrupaciones jerarquizadas ha sido aplicado también a los datos estandarizados, usando los métodos de amalgamamiento simple y complejo, y tomando como índices de separación las distancias euclídeas entre los casos estudiados. La Figura 28 corresponde al dendograma, de casos, para todos los minerales y todas las muestras, mediante un amalgamiento completo. Se observa que aparecen dos *cluster* perfectamente diferenciados, uno de los cuales corresponde a todas las muestras de pulpa y algunas de las de corteza, que a su vez se incluyen en otro *cluster* que agrupa a la mayoría de las muestras de corteza de la campaña de 1988 y tan sólo una de 1985. Se puede deducir que, de manera natural, las muestras de corteza y las de pulpa se agrupan entre sí con distancias de algo más del 60%.

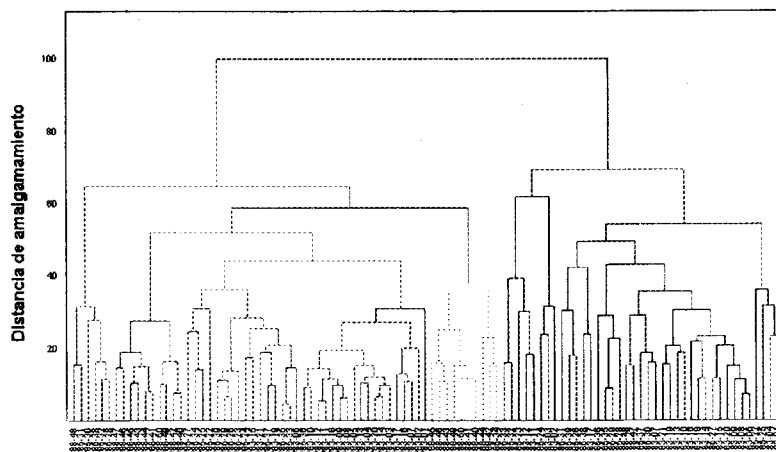


FIGURA 28 – Árbol de agrupaciones por muestras, todos los minerales (P: pulpa).

La información mineral para las muestras de la corteza proporciona una clasificación natural buena para la campaña 1988, lo que indica una diferenciación natural para este grupo con respecto al resto. Otras observaciones permiten establecer una cierta tendencia al agrupamiento en la campaña de 1985 (en dos *cluster* diferentes) y una mayor dispersión para las muestras de la campaña de 1983. Para las muestras de pulpa la clasificación natural por cosechas parece más evidente. Estas conclusiones corroboran, por tanto, las obtenidas con el análisis de componentes principales. Aplicando el método de agrupaciones jerarquizadas a las variables se obtienen los dendogramas de las figuras 29 y 30 en los que se observa que, en el caso de la corteza, las agrupaciones con distancias de amalgamamiento más bajas se dan entre el hierro y el calcio y para la pulpa entre el fósforo y el magnesio.

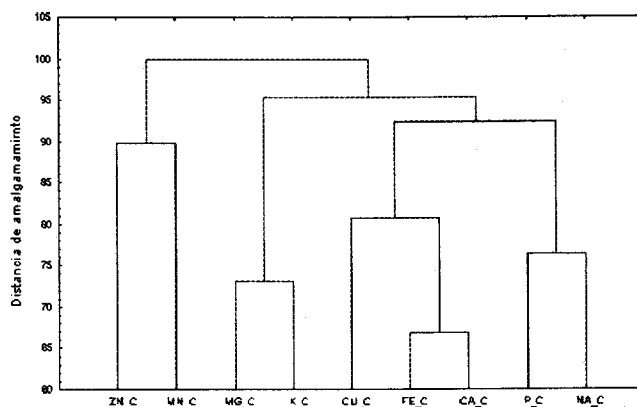


FIGURA 29 – Árbol de agrupaciones por minerales, todas las muestras (corteza).

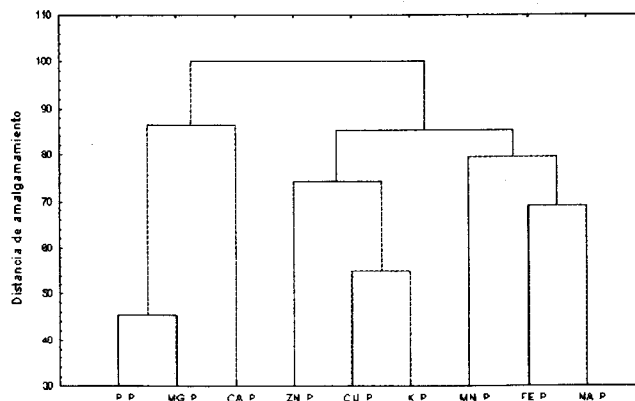


FIGURA 30 – Árbol de agrupaciones por minerales, todas las muestras (pulpa).

5.2.4.3. Análisis discriminante. El objeto del Análisis por Funciones Discriminantes (*Stepwise Discriminant Analysis*, SDA) es estudiar hasta qué punto es posible separar dos o más grupos de muestras. Mediante la aplicación del SDA es posible establecer, a partir de las variables originales, sendas funciones que discriminan entre grupos previamente establecidos, con el fin de aplicarlas después a casos no clasificados originalmente. Uno de los métodos más utilizados dentro del SDA es el procedimiento iterativo, en el que las variables son añadidas una a una a las funciones discriminantes, realizando un estudio de discriminación después de cada paso. El proceso concluye cuando no se obtiene una discriminación significativamente mejor que la anterior.

Los objetivos del Análisis Discriminante pueden dividirse en dos grandes grupos. Los objetivos descriptivos persiguen, entre otros, la representación de las observaciones en dimensión reducida, lo que permite verificar si constituyen grupos diferenciados y determinar qué variables discriminan mejor los grupos preestablecidos de casos. Los objetivos de decisión se refieren a cómo reclasificar las observaciones del conjunto inicial y clasificar nuevas observaciones en cada grupo, basándose en las variables observadas. Las funciones de clasificación son del tipo:

$$Z_I = a_1 \cdot V_1 + a_2 \cdot V_2 + a_3 \cdot V_3 + \dots + a_n \cdot V_n$$

$$Z_{II} = b_1 \cdot V_1 + b_2 \cdot V_2 + b_3 \cdot V_3 + \dots + b_n \cdot V_n$$

$$Z_{III} = c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2 + c_3 \cdot V_3 + \dots + c_n \cdot V_n$$

Siendo:

- I, II y III los grupos preestablecidos, de manera que cualquier nuevo caso quedará clasificado en el grupo cuyo valor de Z sea superior al de los otros dos.
- V_1 a V_n las variables incluidas en el modelo
- a, b, c la serie de coeficientes obtenidos que ajusta la mejor discriminación.

Atendiendo a las diferentes campañas analizada se buscan las correspondientes funciones que permitan discriminar entre ellas, así como un método fiable de predicción para cada nuevo caso.

Se realiza un primer análisis discriminante en el que se incluyen todas las variables. En la tabla XXVI se recogen las funciones que permiten clasificar las muestras según la campaña, y cuya validez se comprueba según los porcentajes de acierto de los casos en su grupo correspondiente. En la tabla XXXVII se observa cómo la mayoría de las muestras se clasifican correctamente en su grupo En la tabla XXXVIII se recogen las funciones que permiten clasificar las muestras según la campaña.

Con la aplicación de estas funciones a las muestras se comprueba su validez según los porcentajes de acierto de los casos en su grupo correspondiente. En la tabla XIX se muestran las clasificaciones observadas. Con una significación de más del 90% la mayoría de las muestras se clasifican correctamente en su grupo. La discriminación de los casos agrupados por cosechas según las dos primeras variables canónicas o raíces para cada uno.

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	0,69333	- 0,36374	- 0,67195
Potasio	- 0,58258	1,50146	- 1,61078
Calcio	- 3,89120	2,46342	3,29756
Magnesio	5,83063	- 5,22642	- 2,46313
Fósforo	1,47571	- 0,75973	- 1,57617
Hierro	0,43681	- 0,33019	-0,43386
Cobre	- 0,31430	1,11607	- 0,72609
Manganeso	- 0,94795	1,29324	- 0,38742
Zinc	- 1,01700	1,22590	- 0,17236
Constante	- 2,45980	- 2,71497	- 3,65672

TABLA XXXVI – Coeficientes para las variables seleccionadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas.

Grupo	% Correcto	Campaña 82-83	Campaña 84-85	Campaña 87-88
		p=0,41414	p=0,36364	p=0,22222
Campaña 82-83	92,68	38	2	1
Campaña 84-85	91,67	2	33	1
Campaña 87-88	90,91	0	2	20
TOTAL	91,92	40	37	22

TABLA XXXVII - Matriz de clasificación.

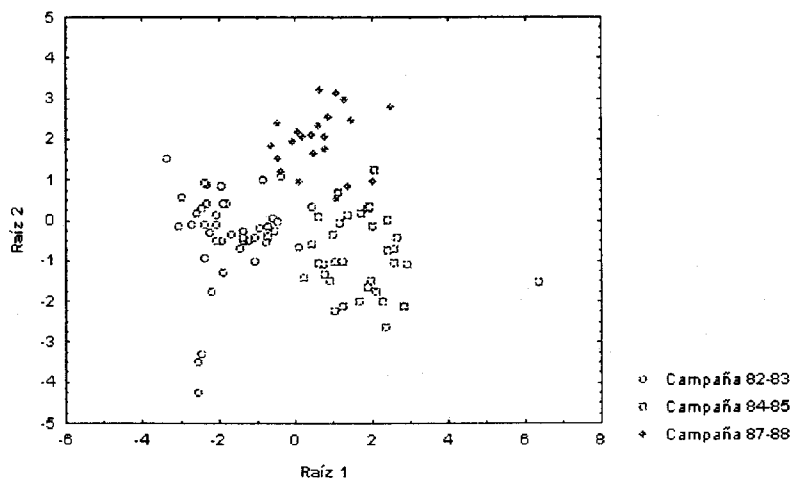


FIGURA 31 – Representación gráfica para las primeras raíces.

Cuando se aplica el análisis discriminante sólo a las muestras de corteza se obtiene la tabla XXXVIII que permite clasificar según las campañas. Al aplicar estas funciones a las muestras se comprueba su validez por los porcentajes de acierto de los casos en su grupo correspondiente superior al 90% (tabla XXXIX). En la figura 32, se representa la discriminación de los casos agrupados por campañas para las dos primeras variables canónicas o raíces. Las tablas XL y XLI muestran las funciones de clasificación de las muestras por campañas y las clasificaciones observadas, poniéndose de manifiesto, como se aprecia en la figura 32, que todas las muestras de pulpa se clasifican correctamente con una elevada significación de la función discriminante (100%). En la representación gráfica de las primeras raíces (figura 33) se observan perfectamente diferenciadas las tres campañas.

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	4,3490	2,4086	1,25501
Potasio	- 0,5211	0,4798	- 0,86336
Calcio	7,0846	16,5477	11,06641
Magnesio	7,2884	- 2,7401	- 1,44272
Fósforo	- 3,4118	- 4,7990	- 4,24176
Hierro	- 0,5935	- 2,2217	- 1,28166
Cobre	0,4273	2,2108	- 0,03139
Manganeso	2,8176	5,2207	1,32374
Zinc	0,5175	3,6844	0,92396
Constante	-13,5942	- 16,7428	-7,60600

TABLA XXXVIII. Coeficientes para las variables seleccionadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas. Corteza

Grupo	% Correcto	Campaña 82-83	Campaña 84-85	Campaña 87-88
		p=0,4200	p=0,3600	p=0,2200
Campaña 82-83	95.24	20	0	1
Campaña 84-85	94.44	0	17	1
Campaña 87-88	90.91	0	1	10
Total	94.00	20	18	12

TABLA XXXIX. Matriz de clasificación. Corteza

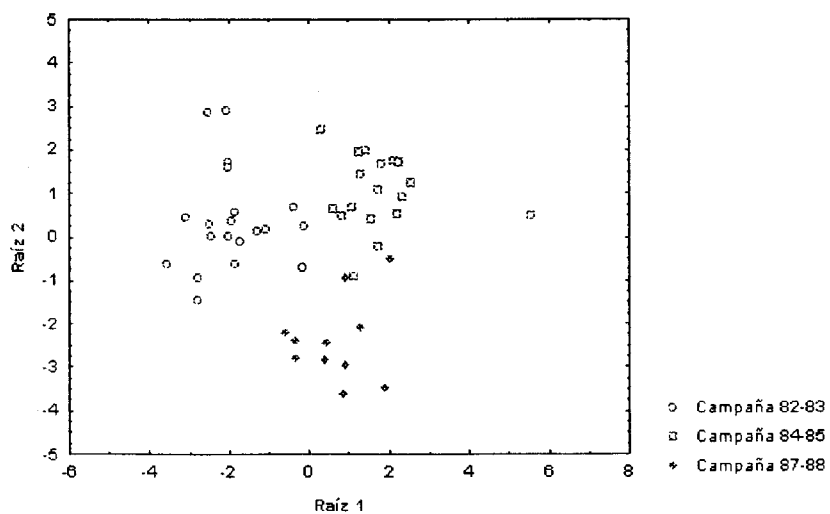


FIGURA 32 - Representación gráfica para las primeras raíces. Corteza

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	14,160	15,876	12,819
Potasio	30,831	42,307	27,662
Calcio	-831,280	-794,139	-744,874
Magnesio	-286,456	-422,190	-358,987
Fósforo	17,143	17,713	15,023
Hierro	6,708	5,883	5,364
Cobre	9,251	12,792	5,361
Manganeso	-22,910	-23,670	-18,770
Zinc	-7,940	-6,521	-5,876
Constante	-522,624	-605,992	-506,091

TABLA XL. Coeficientes para las variables seleccionadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas. Pulpa

Grupo	% Correcto	Campaña 82-83	Campaña 84-85	Campaña 87-88
		p=0,4200	p=0,3600	p=0,2200
Campaña 82-83	100	21	0	0
Campaña 84-85	100	0	18	0
Campaña 87-88	100	0	0	11
Total	100	21	18	11

TABLA XLI - Matriz de clasificación. Pulpa

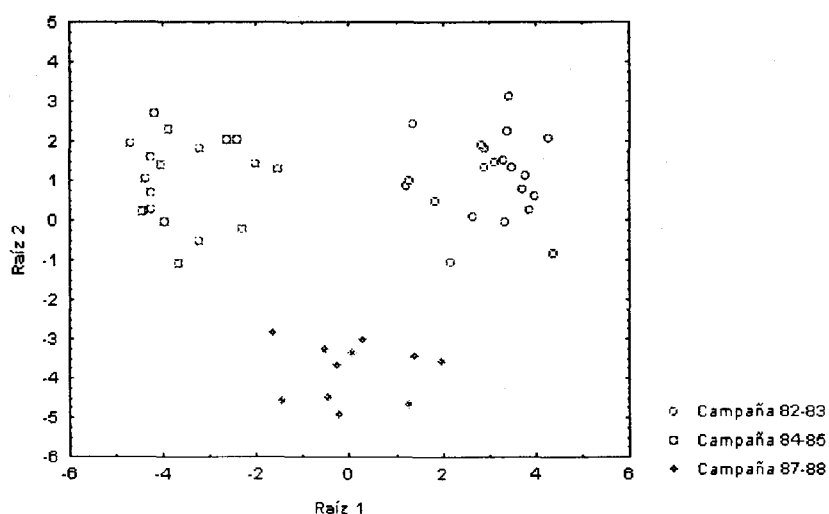


FIGURA 33 – Representación gráfica para las primeras raíces. Pulpa.

Se utiliza también el análisis discriminante para encontrar funciones que permitan discriminar entre partes de la naranja. Se realiza un primer análisis con todas las muestras y todos los minerales obteniéndose unas funciones de clasificación (tabla XLII) que tras ser aplicadas permiten clasificar correctamente con un porcentaje de acierto del 100% todas las muestras (tabla XLIII).

Variable	Zona de la naranja	
	Corteza	Pulpa
Sodio	4,9793	- 3,0456
Potasio	- 4,5422	0,7179
Calcio	-1,7441	- 16,1718
Magnesio	28,9989	- 3,1650
Fósforo	- 1,5810	3,3776
Hierro	- 0,2778	2,3143
Cobre	- 0,0490	- 0,7943
Manganeso	2,2236	- 6,0084
Zinc	2,2238	- 4,9591
Constante	- 23,5330	- 17,9963

TABLA XLII. Coeficientes para las variables seleccionadas en las funciones de clasificación de las muestras por zonas.

Grupo	% Correcto	Corteza	Pulpa
		P=0,5000	P=0,5000
Corteza	100	50	0
Pulpa	100	0	50
Total	100	50	50

TABLA XLIII. Matriz de clasificación.

Los datos para la única raíz obtenida se presentan en la tabla XLIV y su representación gráfica en la figura 34.

Como ya se ha explicado al principio del capítulo todo el tratamiento estadístico multivariante ha sido realizado sobre la matriz de datos estandarizados. Con fines prácticos se ha aplicado el análisis discriminante también sobre el

conjunto de datos originales que proporcionan nuevas ecuaciones de clasificación (tablas XLV, XLVI y XLVII) utilizables directamente con los valores analíticos obtenidos para cualquier nueva muestra.

	Raíz 1
Sodio	0,24973
Potasio	-0,32574
Calcio	0,98062
Magnesio	0,27915
Fósforo	-0,30863
Hierro	-0,34706
Cobre	-0,09976
Manganeso	0,14219
Zinc	0,19100
Constante	19,20116

TABLA XLIV. Coeficiente de la variable canónica

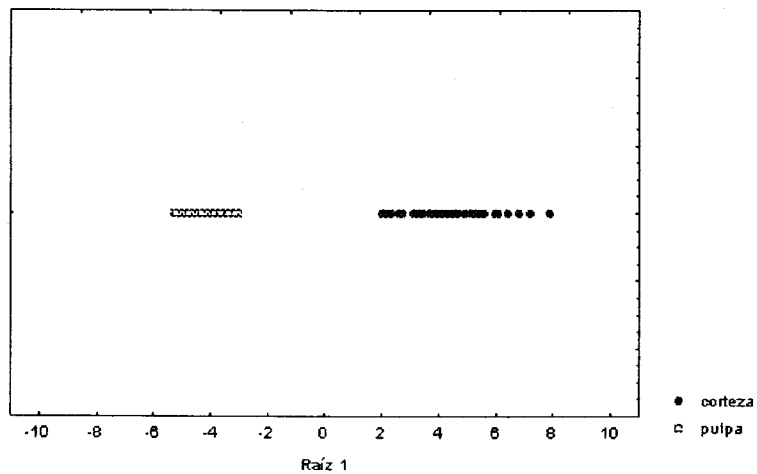


FIGURA 34. Representación gráfica de las muestras según la primera variable canónica primera raíz del análisis discriminante.

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	1,139	2,995	-0,790
Potasio	-0,015	0,284	-0,107
Calcio	-0,501	-0,151	0,314
Magnesio	64,860	46,542	54,719
Fósforo	-0,274	-0,167	-0,774
Hierro	46,654	39,660	35,305
Cobre	925,295	1108,296	636,264
Manganeso	-1,504	-21,313	109,882
Zinc	-60,961	-39,994	-23,117
Constante	-344,305	-258,990	-235,662

TABLA XLV. Coeficientes para las variables analizadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	1,139	2,995	-0,790
Potasio	-0,015	0,284	-0,107
Calcio	-0,501	-0,151	0,314
Magnesio	64,860	46,542	54,719
Fósforo	-0,274	-0,167	-0,774
Hierro	46,654	39,660	35,305
Cobre	925,295	1108,296	636,264
Manganeso	-1,504	-21,313	109,882
Zinc	-60,961	-39,994	-23,117
Constante	-344,305	-258,990	-235,662

TABLA XLVI. Coeficientes para las variables analizadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas. Corteza

Variable	Campaña		
	82-83	84-85	87-88
Sodio	1,139	2,995	-0,790
Potasio	-0,015	,284	-0,107
Calcio	-0,501	-0,151	0,314
Magnesio	64,860	46,542	54,719
Fósforo	-0,274	-0,167	-0,774
Hierro	46,654	39,660	35,305
Cobre	925,295	1108,296	636,264
Manganeso	-1,504	-21,313	109,882
Zinc	-60,961	-39,994	-23,117
Constante	-344,305	-258,990	-235,662

TABLA XLVII. Coeficientes para las variables analizadas en las funciones de clasificación de las muestras por campañas. Corteza

5.3. Composición flavonoide de derivados.

Este apartado se planteó con dos finalidades: la primera, aplicar el perfil flavonoide para determinar la autenticidad en derivados de naranjas amargas, ya que según Tomás-Lorente et al. (1992) el patrón flavonoide de las frutas se mantiene en sus derivados; la segunda, intentar relacionar el contenido de naranjas amargas de Sevilla con los de sus antoxantinas características.

5.3.1. Derivados comerciales. Para las primeras experiencias, en 1997 se adquirieron diez diferentes derivados azucarados de cítricos, correspondientes a las muestras marcadas como DC01 a DC10 (tabla XXV). En una de las muestras (DC06), que se declara como “de pomelo”, sólo se encuentra naringina. En otra de las muestras (DC04), que se declara en la etiqueta como “de naranja”, se encuentran hesperidina, naringina y neohesperidina. Las 8 restantes contienen tanto naringina como neohesperidina y declaran estar elaboradas con naranjas, naranjas amargas o naranjas amargas de Sevilla, incluyendo algunas zumo de manzana (DC09) o zumo de limón (DC10). La muestra DC06 responde a un perfil típico del pomelo, la muestra DC04 sugiere una mezcla de naranjas dulces y amargas y el resto parece contener únicamente naranjas amargas. Sin embargo, para los ensayos previos sobre contenidos de fruta, se excluyeron las muestras que declaraban contener zumos de otras especies (tabla XLVIII).

Muestra	g de fruta en 100 g	Grados Brix	Naringina (mg/100 g)	Neohesperidina (mg/100 g)	Naringina/Neohesperidina
DC01	40	58,0	29,77	24,92	1,195
DC02	30	63,0	52,08	43,07	1,209
DC03	30	64,0	55,06	43,18	1,275
DC05	48	51,0	36,52	29,71	1,229
DC07	30	62,2	51,12	43,10	1,186
DC08	28	58,0	39,61	33,20	1,193

TABLA XLVIII – Características de las muestras comerciales. Ensayos previos.

En primer lugar puede verse cómo la relación entre naringina y neohesperidina se mantiene bastante constante, con un valor medio de 1,215, con una escasa variabilidad (coeficiente de variación 2,8 %). El valor medio queda dentro del intervalo 0,9-1,7 comunicado por Rouseff (1988).

En las figuras 35 y 36 se han representando, respectivamente, las concentraciones de naringina y de neohesperidina frente al contenido declarado de fruta, no pareciendo haber relación alguna entre ambas variables.

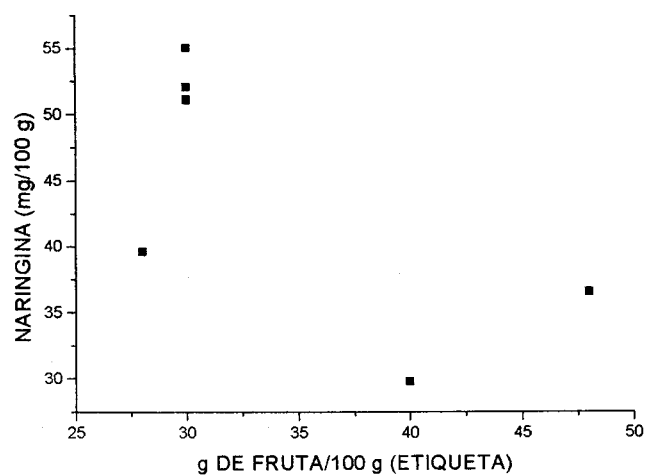


FIGURA 35 – Naringina y contenido declarado de fruta en derivados.

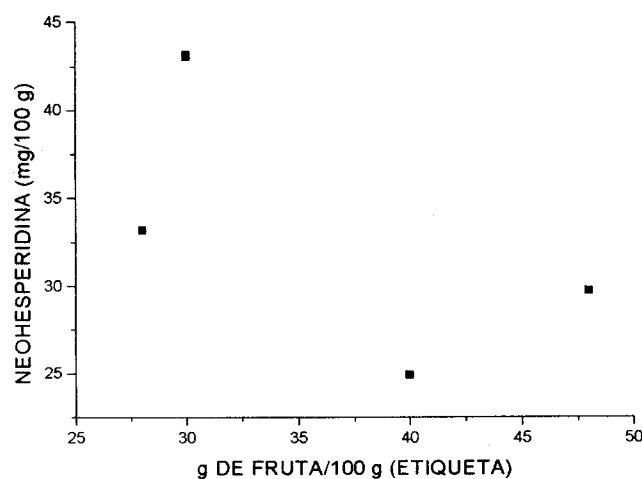


FIGURA 36 – Neohesperidina y contenido declarado de fruta en derivados.

Pero de la Tabla XLVIII se puede intuir una cierta relación entre contenido de neohesperidósidos y grados Brix, como se aprecia en las figuras 37 y 38.

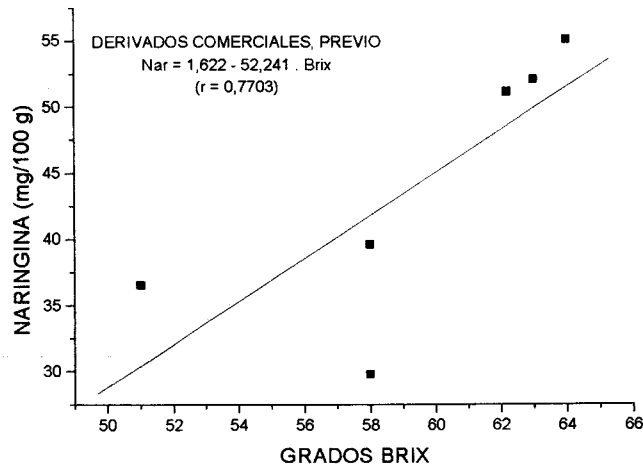


FIGURA 37 – Relación entre naringina y grados Brix (ensayos previos).

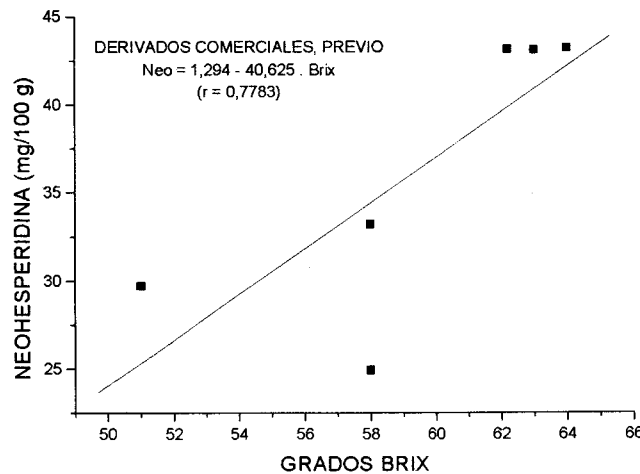


FIGURA 38 – Neohesperidina y grados Brix (ensayos previos).

Los sólidos solubles de confituras, jaleas, mermeladas y marmalades proceden del azúcar y de la fruta. Para elaborar los derivados se suele partir de preparados básicos con un determinado contenido de fruta (estimado por el que los ha elaborado, a partir de balances de materia) y aplican una receta para cada producto concreto. Los preparados suelen tener 70-80 % de fruta (con más del 80 % el producto es excesivamente viscoso) y 8-10 grados Brix.

Despreciando las adiciones de pectina y de ácido, no siempre necesarias en el caso de naranjas amargas, se podrían establecer balances de materia en función de las proporciones de azúcar y de preparado básico de por ejemplo el 80 % y 10 ° Brix, por lo que para cada fórmula concreta existiría una relación entre contenido de fruta y grados Brix (tabla XLIX).

PREPARADO BÁSICO (g)	AZÚCAR (g)	GRADOS BRUX DEL PRODUCTO FINAL	FRUTA (g/100 g) EN PRODUCTO FINAL
30	70	73,0	24,0
35	65	68,5	28,0
40	60	64,0	32,0
45	55	59,5	36,0
50	50	55,0	40,0
55	45	49,5	44,0
60	40	46,0	48,0
65	35	41,5	52,0
70	30	37,0	56,0

TABLA XLIX – Relación entre grados Brix y contenido de fruta (teórico).

Lo que indican, pues, las gráficas 37 y 38 es que no hay grandes diferencias entre las recetas utilizadas por los fabricantes, aunque sí puede haberlas en cuanto a los preparados básicos que usan. Si se admite que todos han usado el preparado básico del 80 %, se tendrían los siguientes contenidos de fruta:

MUESTRA	GRADOS BRUX	g FRUTA/100 g (ETIQUETA)	g FRUTA/100 g (BALANCE)
DC01	58,0	40	37,3
DC02	63,0	30	32,9
DC03	64,0	30	32,0
DC05	51,0	48	34,7
DC07	62,2	30	24,7
DC08	58,0	28	28,4

TABLA L – Estimación de contenidos de fruta a partir de los grados Brix.

Si se toman aparte las muestras en que hay coincidencia (DC02, DC03, DC08), se podría tratar de relacionar sus contenidos de fruta estimado con sus contenidos de naringina y de neohesperidina, admitiendo además, que 0 % de fruta daría valores nulos de ambas antoxantinas. Se obtienen así los ajustes representados en las figuras 39 y 40.

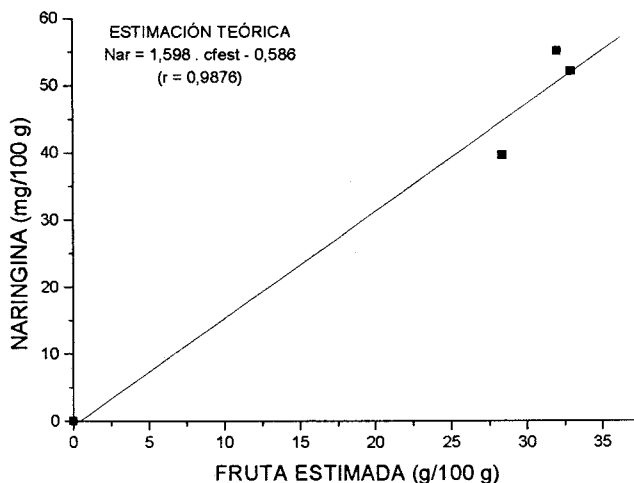


FIGURA 39 – Relación entre naringina y contenido de fruta estimado.

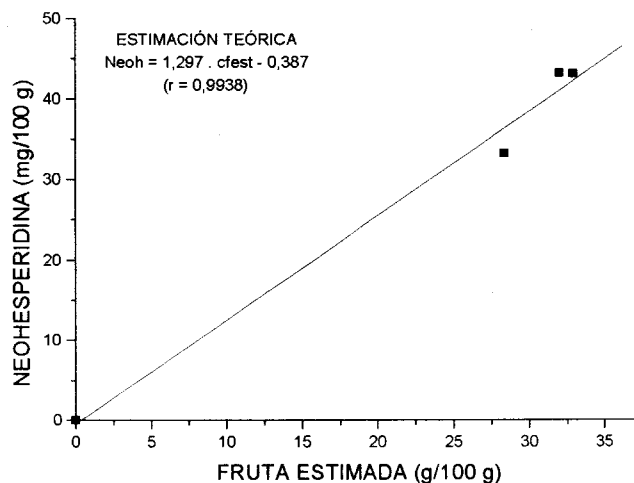


FIGURA 40 – Relación entre neohesperidina y contenido de fruta estimado.

Como se aprecia, ambas antoxantinas podrían utilizarse, en principio, para estimar los contenidos de fruta en derivados de naranja amarga.

5.3.2. Derivados elaborados en laboratorio. Para confirmar la correspondencia entre contenidos reales de fruta y concentraciones de neohesperidósidos, en 1998 y a partir de un único lote de naranjas amargas, tomadas directamente del árbol, se elaboraron los derivados básicos PB-A (que incorpora el agua de cocción de las cortezas) y PB-B (sin el agua de cocción de las cortezas) y con ellos se confeccionaron derivados azucarados con diferentes proporciones de fruta (tabla VII). En ellos se determinaron cuantitativamente la naringina y la neohesperidina, obteniéndose los resultados de la tabla XXVII. Las correlaciones obtenidas para el conjunto de los derivados se representa en las figuras 41 y 42.

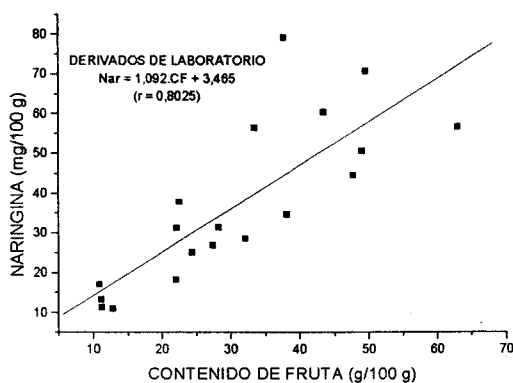


FIGURA 41 – Relación entre naringina y contenido real de fruta.

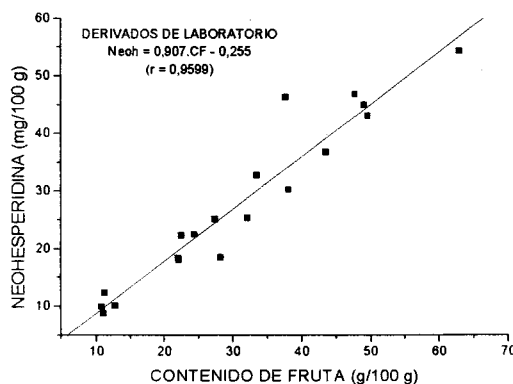


FIGURA 42 – Relación entre neohesperidina y contenido real de fruta.

Se aprecia en ambos casos una correlación positiva, mejor en el caso de la neohesperidina, lo que parece indicar que la incorporación o no del agua de cocción de las cortezas afecta más a la naringina que a la neohesperidina.

En efecto, representando las relaciones entre naringina y neohesperidina para ambos grupos de derivados, se aprecia que existen diferencias significativas entre ellos (figura 43):

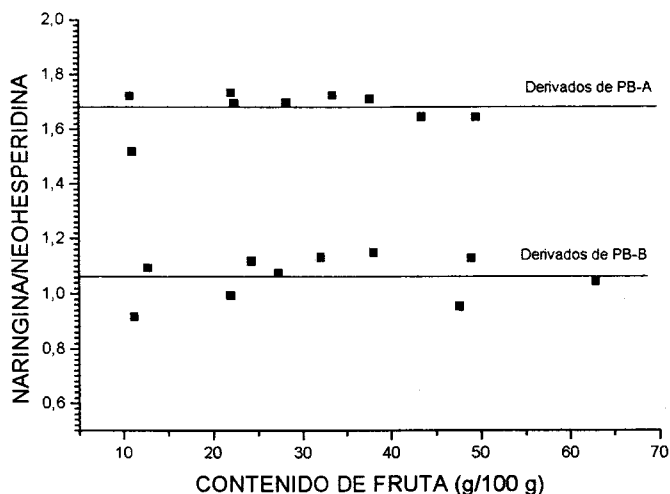


FIGURA 43 – Cocientes entre naringina y neohesperidina (muestras elaboradas en el laboratorio).

Parece que la naringina se solubiliza ligeramente mejor en agua caliente que la neohesperidina y así, el preparado básico A contiene 126,25 mg/100 g de naringina y 77,29 mg/100 g de neohesperidina (cociente 1,63), mientras que el preparado básico B contiene 68,14 mg/100 g de naringina y 62,55 mg/100 g de neohesperidina (cociente 1,09).

Puesto que existen esas diferencias, si se efectúan ajustes independientes, para cada grupo por separado, entre las concentraciones de cada uno de los neohesperidósidos mayoritarios presentes y los contenidos de fruta para cada grupo, se obtienen los resultados que se muestran en las figuras 44 a 47. Se aprecia una mayor dispersión en los resultados de la serie A que en los de la serie B, para ambas antoxantinas.

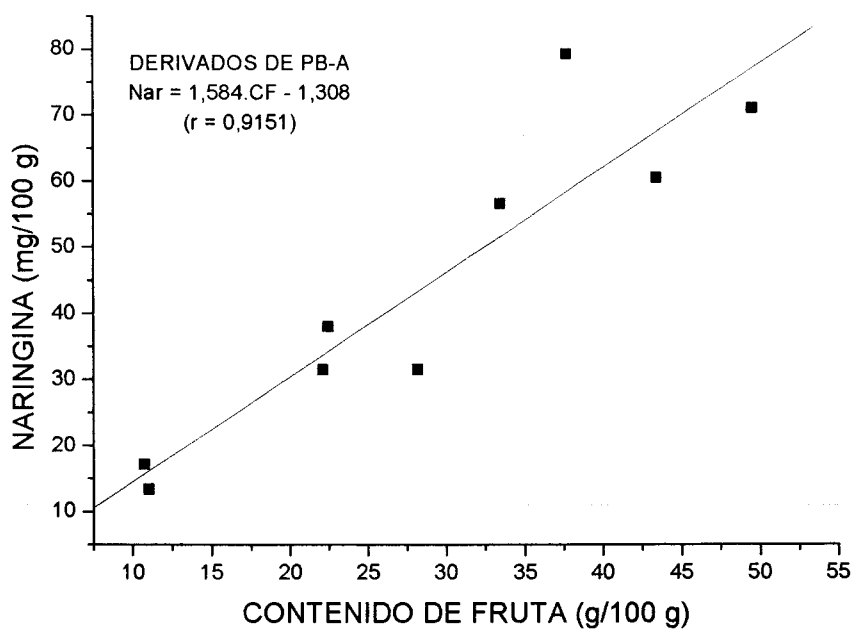


FIGURA 44 – Relación entre naringina y contenido de fruta (derivados con adición del agua de cocción de las cortezas).

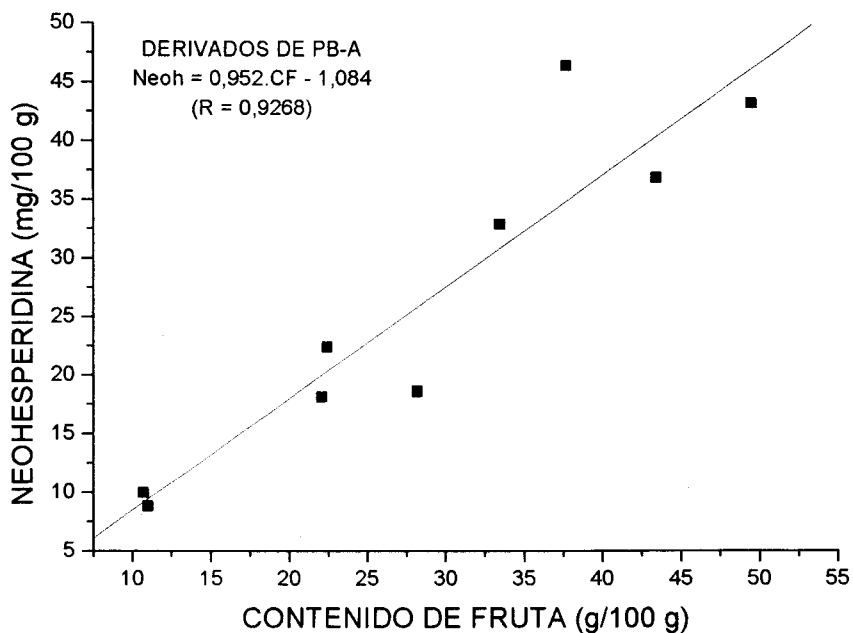


FIGURA 45 – Relación entre neohesperidina y contenido de fruta (derivados con adición del agua de cocción de cortezas).

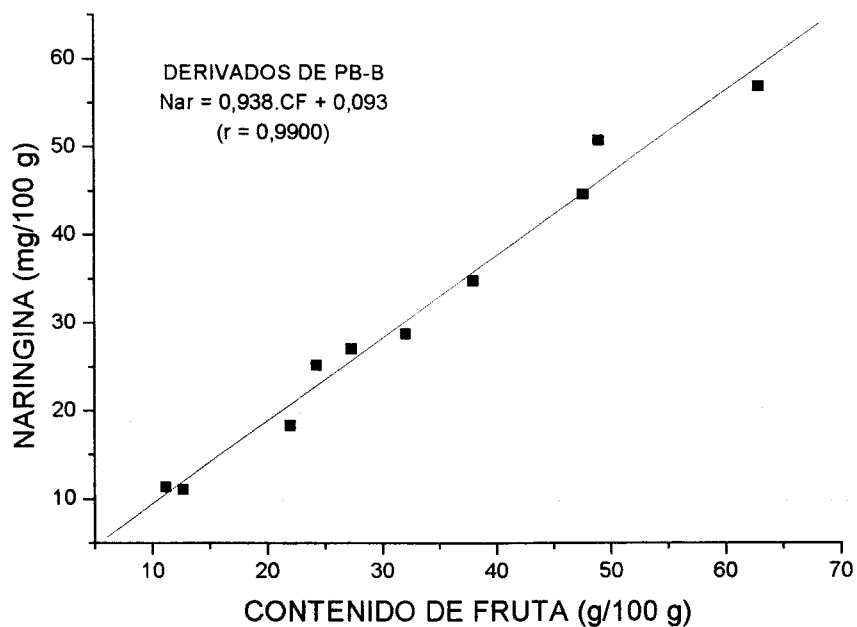


FIGURA 46 – Relación entre naringina y contenido de fruta (derivados sin adición del agua de cocción de cortezas).

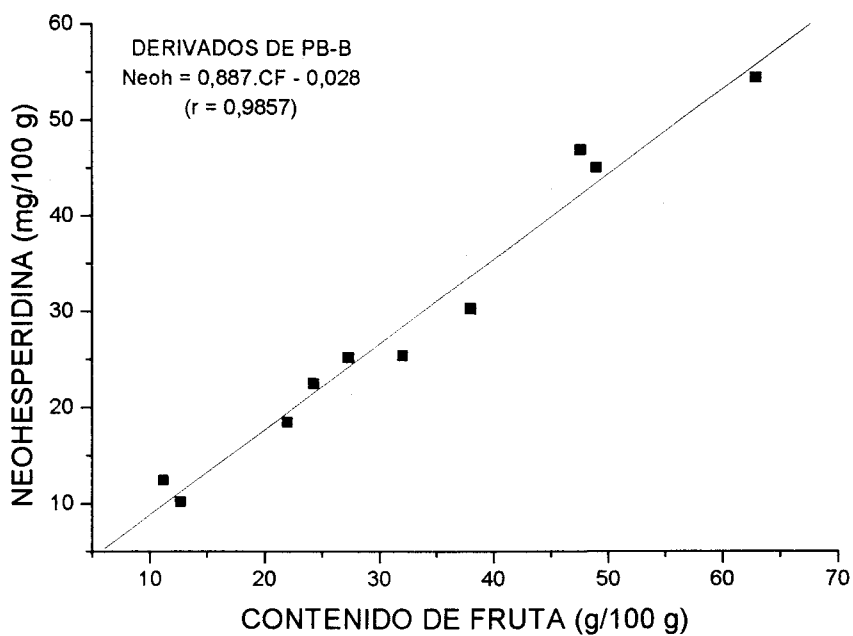


FIGURA 47 – Relación entre neohesperidina y contenido de fruta (derivados sin adición del agua de cocción de cortezas).

5.3.3. Comparación entre muestras comerciales y de laboratorio. En la práctica industrial, los preparados básicos tipo A (que incorporan el agua de cocer las cortezas y, por tanto, todos sus solutos, como las pectinas, vehiculados en ella) se elaboran únicamente en instalaciones que operan en discontinuo, sólo para pequeños volúmenes de producción y es una tecnología en desuso. Al otro extremo se encuentran los preparados básicos del tipo B, que corresponderían al producto resultante del arranque de instalaciones continuas de escaldado de cortezas, cuando éstas se cuecen con agua nueva, pues a medida que avanza la producción el líquido se enriquece progresivamente en solutos, la fuerza impulsora a la difusión disminuye y la corteza retiene más componentes. Es de esperar que las muestras reales presenten valores comprendidos entre ambas situaciones limitantes. Si se representan los cocientes entre naringina y neohesperidina para todas las muestras comerciales de productos con naranja amarga (tabla XXV) se puede apreciar que todos los casos quedan comprendidos entre el valor mínimo encontrado para los derivados tipo B y el valor máximo para los derivados tipo A, si bien son más próximos a los primeros, como cabía esperar (figura 48).

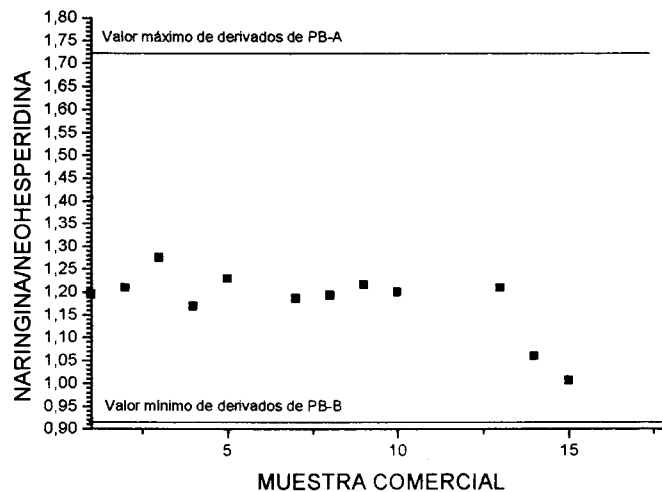


FIGURA 48 – Cociente de concentraciones de neohesperidósidos en derivados comerciales de naranjas amargas.

Resultaría aventurado estimar sus contenidos de fruta a partir de las concentraciones de naringina y de neohesperidina de tan sólo una sola muestra de naranjas amargas de un único año, pero a título ilustrativo se presenta esta estimación aplicando las correlaciones obtenidas para los derivados del tipo B, a los que se encuentran más próximos.

MUESTRA	g DE FRUTA POR 100 g	% DE NARANJA AMARGA ESTIMADO	
		DE NARINGINA	DE NEOHESPERIDINA
DC01	40	31,7	28,2
DC02	30	55,0	48,1
DC03	30	58,1	48,2
DC04	45	41,9	38,0
DC05	48	38,7	33,5
DC07	30	54,0	48,2
DC08	28	41,9	37,3
DC09	100	32,5	28,5
DC10	60	38,7	34,2
DC13	40	27,2	24,0
DC14	27	25,0	25,1
DC15	27	2,0	2,5

TABLA LII – Aplicación a las muestras comerciales de los ajustes obtenidos entre contenidos de neohesperidósidos y de fruta en derivados del tipo B.

Se aprecian discrepancias muy llamativas, de las que sólo cabe deducir dos cosas: primero, que si bien la técnica puede resultar aplicable a medio plazo, hace falta disponer de datos de varias campañas antes de desarrollar un índice analítico del contenido de fruta; segundo, que los fabricantes de derivados, al partir de preparados básicos elaborados por terceros, tienen que declarar los contenidos de fruta dando por ciertos los que los fabricantes de preparados básicos les aportan respecto de sus productos, pudiendo darse la circunstancia de que incluso alguno acepte un preparado básico con el 100 % de fruta (lo que resulta técnicamente inviable) y declare como proporción de fruta la de preparado básico utilizado.

5.3.4. Aspectos cualitativos. El estudio de los cromatogramas correspondientes a las muestras elaboradas en el laboratorio (figura 49) permite identificar dos picos con tiempos de retención $7,162 \pm 0,082$ y $9,252 \pm 0,032$, que se asignan a la naringina y a la neohesperidina. La identificación se confirma por comparación de los espectros obtenidos para las muestras con los espectros de los patrones correspondientes, como se indica en el capítulo de metodología. Se observó también la presencia de un pico que se repetía en todos los cromatogramas a un tiempo de retención entre 4 y 5 minutos ($4,852 \pm 0,071$). Según la bibliografía consultada (Tabla VIII) podría identificarse como neoeriocitrina, otro flavonoide característico de la naranja amarga.

En todas las muestras analizadas se detecta entre la naringina y la neohesperidina una señal (figura 49, pico 2). Considerando sólo su tiempo de retención relativo ($8,162 \pm 4,99$) se identificaría como hesperidina. Trazas de este compuesto han sido identificadas por diversos autores en variedades de naranjas amargas italianas y sevillanas (Venturella et al., 1964, 1965; Rouseff et al., 1987). Kefford y Chandler (1970) sugieren que existe base química para dividir las variedades de *Citrus aurantium* en dos grupos: naranja agria, en la que la hesperidina es el flavonoide predominante y naranja amarga, en la que los son la naringina y la neohesperidina. Sin embargo, en este caso la identificación como hesperidina no se confirma por la comparación de su espectro UV con el espectro de la hesperidina en una disolución patrón (figura 51), por lo que se podría afirmar que la hesperidina no está presente en la naranja amarga de Sevilla.

Los derivados comerciales etiquetados como de naranja amarga o de naranja amarga sevillana, presentan el perfil característico observado en los derivados elaborados en el laboratorio, siendo la naringina el flavonoide mayoritario, seguido de la neohesperidina y detectándose en todas ellas la neoeriocitrina.

Dentro de las mermeladas rotuladas como de naranja se observan dos perfiles diferentes, uno coincidente con el de la naranja amarga y otro con el de la

naranja dulce (*Citrus sinensis*), en el que la hesperidina es el flavonoide mayoritario, no detectándose naringina ni neohesperidina (Rouseff et al., 1987). Según estos resultados, la muestra DC16 ha sido elaborada con naranja dulce y las restantes (DC01, DC03, DC04, DC09, DC10, DC14 y DC15) con naranja amarga.

El cromatograma de la marmalade de pomelo estudiada (DC06) y que se representa en la figura 50, muestra un pico que, tanto por su tiempo de retención como por su espectro, coincide con la naringina. En algunas zonas se nombra indistintamente pomelo tanto a la toronja (*Citrus paradisi*) como al pomelo (*Citrus grandis*). Mientras que la toronja contiene neohesperidina en pequeña cantidad, el pomelo contiene mayoritariamente naringina, una pequeña cantidad de hesperidina y no contiene neohesperidina (Rouseff et al., 1987). La muestra analizada corresponde por tanto a *Citrus grandis*, aunque no se detecta la hesperidina, quizá por encontrarse por debajo del umbral de detección.

En la mermelada elaborada con una mezcla de limón y lima sólo se detecta hesperidina. El limón y la lima contienen también eriocitrina, que no se ha detectado por la técnica cromatográfica utilizada.

En cualquier caso y como se observa en la tabla LIII, cada tipo de derivado comercial presenta un perfil característico que podría usarse como "huella de identificación". Aunque no se han detectado compuestos como la eriocitrina o la narirutina, que permitirían una mejor identificación en el caso de mermeladas de limón, lima y naranja dulce. Este análisis permite, en sólo 10 minutos y usando un régimen isocrático, detectar los compuestos mínimos para identificar la autenticidad y posibles mezclas de los derivados de naranja amarga con otros cítricos.

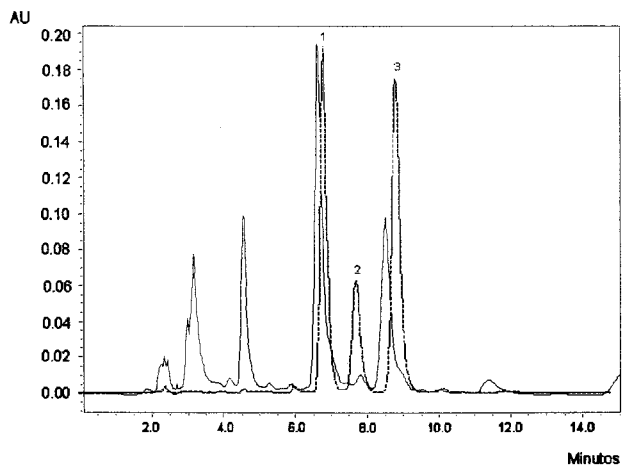


FIGURA 49 - Cromatograma de una muestra derivado de Naranja amarga (elaborado en el laboratorio) (-) y de la mezcla de patrones (...)

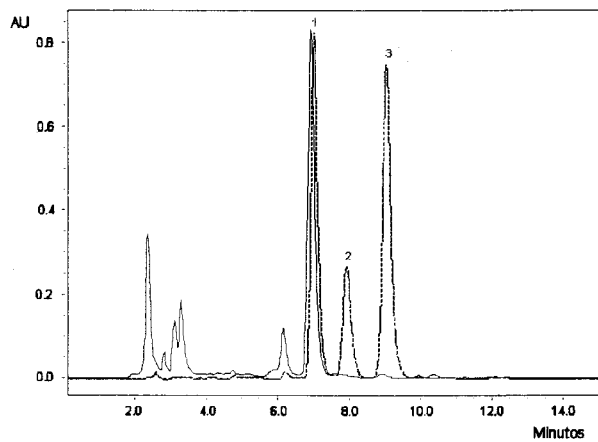


FIGURA 50 - Cromatograma de una muestra de derivado comercial de pomelo(-) y de la mezcla de patrones (...)

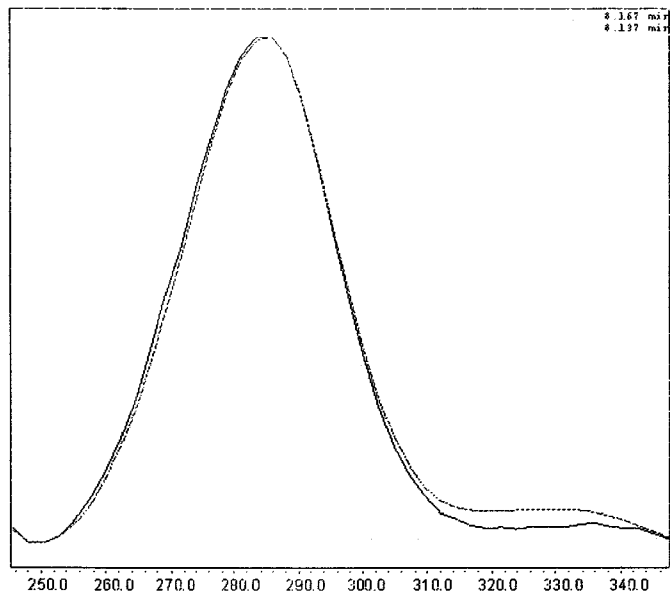


FIGURA 51 – Espectro de absorción de hesperidina de una disolución patrón y de una muestra de derivado de naranja amarga.

Muestra	Neoeriocitrina	Naringina	Hesperidina	Neohesperidina
<i>Naranja</i>				
DC01	++	+++	-	++
DC09	++	+++	-	++
DC03	++	+++	-	++
DC10	++	+++	-	++
DC04	++	+++	-	++
DC14	++	+++	-	++
DC15	++	+++	-	++
DC16	-	-	++	-
<i>Naranja amarga</i>				
DC08	++	+++	-	++
DC02	++	+++	-	++
DC07	++	+++	-	++
<i>Naranja amarga Sevillana</i>				
DC13	++	+++	-	++
DC05	++	+++	-	++
<i>Naranja dulce</i>				
DC12	-	-	++	-
DC11	-	-	++	-
<i>Pomelo</i>				
DC06	-	++++	-	-
<i>Limón y lima</i>				
DC06			++	

TABLA LIII – Perfiles de flavonoides mayoritarios en muestras comerciales de derivados azucarados de cítricos.

6. CONCLUSIONES

De todo cuanto antecede se deducen las siguientes conclusiones:

- 1ª La proporción de corteza en las naranjas amargas aumenta cuando disminuye el tamaño de la fruta, el cual es a su vez función del régimen de lluvias durante el período Abril a Julio. La humedad de las cortezas guarda una relación directa con las precipitaciones habidas entre Agosto y Noviembre.
- 2ª La composición mineral de las cortezas es significativamente distinta de la de las pulpas, localizándose preferentemente en aquéllas, por este orden : calcio, sodio, manganeso, magnesio, cinc, hierro, cobre y potasio. El fósforo se localiza preferentemente en la pulpa.
- 3ª Los elementos más abundantes en las cortezas son calcio, potasio y nitrógeno, seguidos de magnesio y fósforo.
- 4ª Las concentraciones de calcio y fósforo en la pulpa y, en menor medida, la de magnesio, decrecen al avanzar en la campaña.
- 5ª Las cortezas y las pulpas de las diferentes campañas pueden diferenciarse entre sí en función de sus composiciones minerales, especialmente en el caso de las pulpas.
- 6ª De los cocientes de concentraciones entre pares de elementos, los de potasio a cobre dan valores medios análogos entre campañas y son del mismo orden de magnitud en las cortezas y en la pulpa.

- 7^a Todos los derivados de naranjas amargas analizados, tanto los preparados en el laboratorio como los adquiridos en el comercio, contienen naringina, neohesperidina y neoeriocitrina, pero no hesperidina.
- 8^a En los derivados preparados en el laboratorio, las proporciones entre las concentraciones de naringina y de neohesperidina dependen del modo en que se haya elaborado el preparado básico del que proceden, siendo más altas cuando se incorpora el agua de escaldado de las cortezas que cuando ésta se descarta.
- 9^a En los derivados comerciales de naranja amarga, las proporciones entre las concentraciones de naringina y de neohesperidina presentan valores comprendidos entre los límites a que se hace referencia en la conclusión anterior, siendo más próximas a las de los derivados que no incorporan el agua de cocción de las cortezas.
- 10^a En los derivados preparados en el laboratorio, las concentraciones de naringina y de neohesperidina presentan correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con los contenidos de fruta, presentando ajustes diferentes según el preparado básico de procedencia.
- 11^a Parece factible la determinación de la identidad y modo de elaboración de los derivados de naranjas amargas a partir del cociente de concentraciones de naringina a neohesperidina, así como la estimación del contenido de fruta a partir de las concentraciones de neohesperidósidos. Para ello, se recomienda profundizar en este sentido, estudiando los perfiles flavonoides durante varias campañas cítricas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ajon, G. (1943) I pigmenti dei succhi di agrume durante la maturazione, Riv. Ital. Essenze e Profumi 25, 150-152.

Albach, R.F. y Redman, G.H. (1969) Composition and inheritance of flavanones in Citrus fruit, Phytochem. 8, 127-143.

A.O.A.C. (1970) Official methods of Analysis of AOAC, Washington DC.

A.O.A.C. International (1996) AOAC Official Method 986.14, Orange pulp wash and/or added H₂O in processed Florida Orange Juice. March Supplement, Ch. 37, 21-22.

A.O.A.C. International (1996) AOAC Official Method 994.11, Benzoic acid in orange juice. Liquid chromatographic method, Ch. 37, 22-23.

APPHA-AWWA-WPCF (1980) Standard methods for the examination of water and wastewater, 15^a Edición, 356-360, American Public Health Association, Washington DC.

Asociafruit (1999) J. Adam y G. Liñán, comunicación privada.

Attaway, J.A. y Carter, R.D. (1971) Some new analytical indicators of processed orange juice quality, Proc. Fla. State Hortic. Soc. 89, 49-51.

Attaway, J.A.; Barron, R.W.; Blair, J.G.; Buslig, B.S.; Carter, R.D.; Dougherty, M.H.; Fellers, P.J.; Hill, E.C.; Huggart, R.L.; Maraulja, M.D.; Petrus, D.R.; Rouse, A.H.; Ting, S.V. (1972) Some new analytical indicators of processed orange juice quality, 1971-72, Proc. Fla. State Hortic. Soc. 85, 192-203.

Azcón-Bieto, J.; Talón, M. (1993) Fisiología y Bioquímica vegetal, Ed. Interamericana McGraw-Hill.

Bae, E.A.; Han, M.J.; Kim, D.H. (1999) In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites, *Planta Medica* 65 (5) 442-443.

Bahar, A.; Siddiqui, A.A.; Ahmed, B. (1999) Bioactive naturally occurring flavonoids, *Hamdard Medicus* 42 (1) 84-98.

Balmer, D.M.; McLellan, W.D. (1996) Detection of pulp wash in orange juice by an enzymic HPLC method, *Fruit Process.* 7 (7) 257-261.

Barrett, H.C. y Rhodes, A.M. (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives, *Syst. Bot.* 1, 105-136.

Benavente García, O.; Castillo, J.; Marín, F.R.; Ortuño, A.; Río, J.A. del (1997) Uses and properties of Citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* 45 (12) 4505-4515.

Benk, E. (1961) Über Pomeranzen und Pomeranzensaft, *Riechst. Arom.* 11 (7) 236-237.

Berhow, M.A.; Fong, C.H.; Haegawa, S. (1996) Limonoid and flavonoid composition in varieties of *Papeda* and *Papedocitrus*, *Biochem. Systematics Ecol.* 24 (3) 237-242.

Berkovic, K.; Pavic, M.; Cikovic, N.; Gacic, M. (1995) Corrosion of iron, tin and aluminium in fruit juices, *Acta Alimentaria* 24 (1) 31-38.

Bessho, Y.; Manabe, T.; Koorama, M.; Kubo, S. (1964) Utilization of natsudaïdai. I. Distribution of naringin in the natsudaïdai fruits, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 11, 385-389.

Bessho, Y.; Kodama, M.; Kubo, S. (1974) Inorganic components of fruit, vegetables and their products. Part II. Inorganic composition of orange juice and

the effect of centrifugation on it, Ehime-ken Kogyo Shikenjo Kenkyu Hokoku 12, 41-43.

Borradaile, N.M.; Carroll, K.K.; Kurowska, E.M. (1999) Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin, *Lipids* 34 (6) 591-598.

Borrero, R. Y Romero, F. (1986) Elementos inorgánicos mayoritarios del zumo de la naranja amarga española (*Citrus aurantium* Linneo), *Alimentación, Equipos y Technol.* 5 (5) 155-157.

Bosch Vilá, J. (1984) *Historia de Sevilla. La Sevilla Islámica: 712-1248*, Serv. Publ. Univ. Sevilla, Sevilla.

Brause, A.R. (1993) Detection of juice adulteration, *J. Assoc. Food and Drug Officials* 57 (4) 6-25.

Brause, A.; Rateman, J.; Donor, L.W. (1984) Verification of authenticity of orange juice by oxygen 18 stable isotope ratio analysis, *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* 67, 535-539.

Braverman, J.B.S. (1952) *Los agrios y sus derivados. Composición y tecnología química*, Ed. Aguilar, Madrid (versión española de J. Royo Irazo).

Braverman, J.B.S. (1967) *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*, 238-239 y 250-251, Ed. Omega, Barcelona.

Buslig, B.S.; Ting, S.V. (1977) Automated enzymatic analysis of D-isocitric acid in citrus juice, *Proc. Intl. Soc. Citriculture* 3, 799-801.

Calomme, M.; Pieters, L.; Vlietinck, A.; Berghe, D.vanden (1996) Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids, *Planta Medica* 62 (3) 222-226.

Calvarano, M.; Postorino, E.; Gionfriddo, F.; Calvarano, I.; Bovalo, F. (1996) Naringin extraction from exhausted bergamot peels, *Perfumer and Flavorist* 21 (5) 1-2.

Cancalon, P.F. (1999) Analytical monitoring of citrus juices by using capillary electrophoresis, *J. AOAC Intl.* 82 (1) 95-106.

Castillo, J.; Benavente, O.; Río Conesa, J.A. del (1993) Hesperetin-7-O-glucoside and prunin in Citrus species (*C. aurantium* and *C. paradisi*), A study of their quantitative distribution in immature fruits and as immediate precursors of neohesperidin and naringin in *C. aurantium*, *J. Agric. Food Chem.* 41 (11) 1920-1924.

Castillo, J.; Benavente, O.; Río, J.A. del (1992) Naringin and neohesperidin levels during development of leaves, flower buds and fruits of *C. aurantium*, *Plant Physiol.* 99 (1) 67-73.

Chaliha, B.P.; Sastry, G.P.; Rao, P.R. (1965) Flavonoids of the Assam Citrus peels, *Bull. Nat. Inst. Sci. India* 31, 63-68.

Chen, J. y Montanari, A.M. (1998) Isolation and identification of new polymethoxyflavonoids from Dancy tangerine leaves, *J. Agric. Food Chem.* 46 (4) 1235-1238.

Cives, H.R. (1989) Uses of enzymes for obtaining naringin and special citrus peel concentrate, *Essenze Derivati Agrumari* 59 (3) 233-247.

Coll, M.D.; Coll, L.; Laencina, J.; Tomás Barberán, F.A. (1998) Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons, *Zeitschrift für Lebensmittel Unters. Forsch. A*, 206 (6) 404-407.

Cook, N.C.; Samman, S. (1996) Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.* 7 (2) 66-76.

Cooper, W.C. y Chapot, H. (1977) Fruit production with special emphasis on fruit for processing, en *Citrus Science and Technology* (S. Nagy, P.E. Shaw y M.K. Veldhuis, ed.) Vol. 2, 1-127, The Avi Publ. Co. Inc., Westport, Conn.

Correia Guerrero, C.; Carrasco de Brito, J.; Lapa, N.; Santos Oliveira, J.F. (1995) *Bioresource Technol.* 53 (1) 43-51.

Cotolí, A.; García Martínez, J.L.; Picó, F. (1973) Estudios de las necesidades nutritivas del naranjo. II. Evolución del contenido de macroelementos y diversas formas de los mismos en hojas y frutos de Washington Navel y Valencia Late, a lo largo del año, *Rev. Agroquím. Technol. Alimentos* 13, 401-415.

Creste, J.E. y Lima, L.A. de (1995) Influencia de diferentes porta-enxertos na composição mineral de folhas de ramos frutíferos da tangerineira "satsuma" (*Citrus unshiu* Marcovitch), *Científica Jaboticabal* 23 (1) 9-16.

Davis, W.B. (1947) Determination of flavanones in citrus fruits, *Anal. Chem.* 19, 476-478.

Donor, L.W.; Bills, D. (1981) Stable carbon isotope ratios in orange juice, *J. Agric. Food Chem.* 29, 803-805.

Dreyer, D.L. (1966) Citrus bitter principles. V. Botanical distribution and chemotaxonomy in the *Rutaceae*, *Phytochem.* 5, 367-378.

Domingues, E.T. y Neto, A.T. (1999) Aspectos da sistemática em *Citrus*, *Laranja* 20 (1) 187-204.

El-Adawy, T.A.; Rahma, E.H.; El-Bedawy, A.A.; Gafar, A.M. (1999) Properties of some citrus seeds. Part 3. Evaluation as a new source of protein and oil, *Nahrung* 43 (6) 385-391.

El-Nawawi, S.A. (1995) Extraction of citrus glucosides, *Carbohydrate Polymers* 27 (1) 1-4.

El Shazly, S.M.; Alcaraz, C.F.; Carpena, O. (1994) Effect of some citrus rootstocks on leaf mineral contents of young and adult lemon trees, *Proc. 7th Intl. Citrus Congress, Vol. 1, 275-279, Intl. Soc. Citricult., Catania.*

Embleton, T.W.; Jones, W.W.; Kirkpatrick, J.D. (1956) Influence of applications of dolomite, potash and phosphate on quality, grade and composition of Valencia orange fruit, *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 67, 191-201.

Espinoza, L.A.; McNeal, B.L.; Nguyen, J.H. (1998) Nutrient and metal trends as a result of biosolids application to a south Florida citrus grove, *Proc. 57th Ann. Meeting Soil and Crop Sci. Soc. Fla.* 57, 39-50.

Eun, Y.S.; Young, H.C.; Kyung, H.K.; Jeong, S.K. (1998) Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes in Cheju citrus fruits according to harvest date, *Korean J. Food Sci. Technol.* 30 (2) 306-312.

Fernández de Simón, B.; Pérez Ilzarbe, J.; Hernández, T.; Gómez Cordovés, C.; Estrella, I. (1992) Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices, *J. Agric. Food Chem.* 40 (9) 1531-1535.

Ferreres, F.; García Viguera, C.; Tomás Lorente, F.; Tomás Barberán, F.A. (1993) Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey, *J. Food Sci. Agric.* 61 (1) 121-123.

Ferreres, F.; Andrade, P.; Gil, M.I.; Tomás Barberán, F.A. (1996) Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey, *Zeit. Lebensm. Untersuchung Forschung* 202 (1) 40-44.

Gamache, P.; Ryan, E.; Acworth, I.N. (1993) Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection, *J. Chromatography A* 143-150.

García Viguera, C.; Tomás Barberán, F.A.; Ferreres, F.; Artés, F.; Tomás Lorente, F. (1993) Determination of citrus jams genuineness by flavonoid analysis, *Zeit. Lebensm. Unters. Forsch.* 197 (3) 255-259.

Grandi, R.; Trifiro, A.; Gheradi, S.; Calza, M.; Sacconi, G. (1994) Characterization of lemon juice on the basis of flavonoid content, *Fruit Processing* 4 (11) 355-359.

Greeve, M. (1997) AIJN code of practice, *Fruit processing* 7 (4) 136-140.

Guadagni, D.G.; Maier, V.P.; Turnbaugh, J.G. (1974) Some factors affecting sensory thresholds and relative bitterness of limonin and naringin, *J. Sci. Food. Agric.* 25, 1199-1205.

Guadagni, D.G.; Maier, V.P.; Turnbaugh, J.G. (1976) Effect of neodiosmin on threshold and bitterness in water and orange juice, *J. Food Sci.* 41, 681-684.

Guenther, F.; Burckhart, O.; Oostinga, I. (1968) Composition of lemon juices, *Ind. Obst. Gemueserwert* 53, 422-427.

Haag, H.P.; Gutierrez, L.E.; Dechen, A.R.; Mourao Filho, A.A.; Moreira, C.S. (1993) Variação de materia seca e de nutrientes nas folhas e nos frutos, produção de ácido ascórbico e suco, em seis cultivares de citros, *Scientia Agricola* 50 (2) 193-203.

Harminder, K.; Uppal, D.K.; Bajaj, K.L.; Kaur, H. (1993) Identification of nucellar and zygotic seedlings in interspecific/intervarietal crosses of mandarin and sweet orange, on the basis of leaf flavonoids, Punjab. Hortic. J. 33 (1-4) 9-16.

Herrmann, K. (1998) Occurrence and contents of flavonoid components in citrus fruits, Industrielle Obst und Gemueseeverwertung 83 (7) 202-210.

Herrero Egaña, M. (1962) El cultivo de los agrios, Cámara Oficial Sindical Agraria, Sevilla.

Hodgson, R.W. (1967) Horticultural varieties of *Citrus*, en The Citrus Industry (W. Reuther, H.J. Webber y L.D. Batchelor, ed.) Vol. 1, 431-591, Univ. of California Press, Berkeley, Ca.

Horowitz, R.M. (1964) Relations between the taste and structure of some phenolic glycosides, en Biochemistry of phenolic compounds (J.B. Harborne, ed.) 545-571, Academic Press, New York.

Hulme, B.; Morries, P.; Stainsby, W.J. (1965) Analysis of citrus fruits 1962-1964, J. Assoc. Public Analysts 3, 113-117.

IRANOR (1973) Norma UNE 55-001-73, Materias grasas: determinación de la humedad (Método de destilación).

Jong, B.E.; Young, M.J.; Gun, J.W. (1996) Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*C. aurantium* var.), Korean J. Food Sci. Technol. 28 (2) 371-377.

Kamiya, S. y Esaki, S. (1973) Flavonoids in *Poncirus* hybrids, Agric. Biol. Chem. 37, 2435-2436.

Karrer, W. (1949) Presence of hesperidin and neohesperidin in unripe oranges and in the seed vessels and stigmas of orange flowers, *Helv. Chim. Acta* 32, 714-717.

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. (1999 a) Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various Citrus juices on several cancer cell lines, *J. Agric. Food Chem.* 47 (7) 2509-2512.

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. (1999 b) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (5) 896-899.

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. (1999 c) Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits, *J. Agric. Food Chem.* 47 (9) 3565-3571.

Kayim, K.; Kemal, K.N.; Rokka, V.M. (1998) Variation of the nuclear DNA content of species of subtribe *Citrineae* (*Rutaceae*), *Hort. Sci.* 33 (7) 1247-1250.

Kefford, J.F. (1959) The chemical constituents of citrus fruits, *Adv. Food. Res.* 9, 285-372.

Kefford, J.F. y Chandler, B.V. (1970) The chemical constituents of Citrus fruits, Academic Press, New York.

Khan, M.R. y Sufi, N.A. (1995) Carrot and citrus juice waste as potential source of dietary fiber, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 38 (9-10) 396-397.

Kharebava, L.M. (1971) Effect of doses of potassium fertilizers on the chemical composition of mandarin leaf and fruit, *Subtrop. Kul't.* 3, 74-79.

Kim, B.Y.; Kim, K.S.; Lee, C.S.; Yoo, S.H. (1993) Survey on the natural heavy metal contents in fruits and orchard soils in Korea, RDA J. Agric. Sci. Soil Fertilizer 35 (2) 280-290.

Kolle, F. y Gloppe, K. (1936) A new hesperidin, Pharm. Zentralhalle 77, 421-425.

Koziet, J.; Bricout, E. (1997) Detection of added beet sugar in orange juice using determination of sucrose $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio, Sci. Aliments 17 (4) 403-408.

Kunkar, A. (1964) Contributo alla conoscenza dell'arancia amara (*Citrus aurantium*, Linneaus). Nota II: dati analitici del succo, Conserve Deriv. Agrumari 13, 3-6.

Kurowska, E.M.; Borradaile, N.M.; Spence, J.D.; Carroll, K.K. (2000) Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits, Nutr. Res. 20 (1) 121-129.

Larrauri, J.A.; Borroto, B.; Boys, T. (1996) Naringina: procesos para su obtención a partir de hollejos de toronjas, Alimentación, Equipos y Tecnol. 15 (3) 115-118.

Lay, K.N.; Hupe, M. (1998) Analysis of sterols: a novel approach for detecting juices of pineapple, passionfruit, orange and grapefruit in compounded beverages, J. Sci. Food Agric. 76 (4) 617-627.

Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Lee, C.K.; Lee, H.K.; Han, S.S. (1999) Antiviral activity of some flavonoids on herpes simplex viruses, Korean J. Pharmacognosy 30 (1) 34-39.

Li, Y.; Mao, X.W.; Lai, X.X.; Wu, J.L. (1997) Extraction of naringin from peels of citrus fruits by ultrafiltration, *Food Sci. China* 18 (5) 36-38.

Low, N.H. (1996) Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection, *J. AOAC Intl.* 79 (3) 724-737.

Maccarone, E.; Campisi, S.; Fallico, B.; Rapisarda, P.; Sgarlata, R. (1998) Flavor components of Italian orange juice, *J. Agric. Food Chem.* 46, 2293-2298.

Mak, N.K.; Wong-Leung, Y.L.; Chan, S.C.; Wen, J.M.; Leung, K.N.; Fung, M.C. (1996) Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*, *Life Sciences* 58 (15) 1269-1276.

Manly, B.F. (1986) *Multivariate Statistical Methods. A Primer*, Chapman and Hall, New York.

Marini, D. y Balestrieri, F. (1994) Variability of some analytical characteristics of orange juices, *Ital. J. Food Sci.* 6 (2) 225-235.

Marini, D.; Balestrieri, F. (1995) Multivariate analysis of flavanone glycosides in citrus juices, *Ital. J. Food Sci.* 7, 255-264.

Martin, G. (1992) SNIF-NMR- a method for detecting added beet sugar in fruit juices and for characterizing their authenticity, *Fluess. Obst.* 59 (8) 477-481.

Martin, G.J.; Fournier, J.B.; Allain, P.; Mauras, Y. (1997) Optimization of analytical methods for origin assessment of orange juices. II. ICP-MS determination of trace and ultra-trace elements, *Analysis* 25 (1) 7-13.

Matsumoto, R. (1995) Studies on genetics of bitterness of citrus fruits and application to breeding of bitterless citrus cultivars, with special reference to the

bitterness caused by flavanone glycosides, Bull. Fruit-tree Res. Stat., Tsukuba S6, 1-74.

Mc Intosh, C.A. y Mansell, R.L. (1997) Three-dimensional distribution of limonin, limonoate A-ring monolactone, and naringin in the fruit tissues of three varieties of *Citrus paradisi*, J. Agric. Food Chem. 45 (8) 2876-2883.

Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C. (1994) Potential health-promoting properties of citrus flavonoids, Food Technol. 48 (11) 115-119.

Miyazawa, M.; Okuno, Y.; Fukuyama, M.; Nakamura, S.; Kosaka, H. (1999) Antimutagenic activity of polymetoxylflavonoids from *Citrus aurantium*, J. Agric. Food Chem. 47 (12) 5239-5244.

Money, R.W. (1964) Analytical data of some common fruits. Potassium and phosphorus contents, J. Sci. Food. Agric. 15, 594-596.

Money, R.W. (1966) The potassium, phosphorus and nitrogen contents of whole citrus fruits and juices, J. Assoc. Public Analysts 4, 41-44.

Moshonas, M.G.; Shaw, P.E. (1997) Quantitation of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis, J. Agric. Food Chem. 45, 3968-3972.

Moss, G.I. (1972) The role of potassium in determining fruit quality of sweet orange, Austral. J. Exper. Agric. Animal Husband. 12, 195-202.

Mouly, P.; Arzouyan, C.; Estienne, J. (1993) Detection of pulp wash in orange juice, Annal. de Falsifications, de l'Expertise Chim. Toxicol. 86 (916) 87-102.

- Mouly, P.P.; Arzouyan, C.R.; Gaydou, E.M.; Estienne, J.M. (1994) Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1) 70-79.
- Murphy, J. y Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Analyt. Chimica Acta* 21, 31.
- Nagy, S.; Attaway, J.A. (1992) Anticarcinogenic activity of phytochemicals in citrus fruit and their juice products, *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 105, 162-168.
- Nagy, S.; Attaway, J.A. (1994) Anticancer phytochemicals of citrus fruits and their juice products, *Fruit Processing* 4 (11) 349-354.
- Nagy, S.; Shaw, P.E. y Veldhuis, M.K. (1977) *Citrus Science and Technology*, The Avi Publ. Co. Inc., Westport, Conn.
- Nakabayashi, T. (1961) Citrus flavonoids. VII. Flavonoid glycosides in sour orange, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 35, 945-949.
- Navarro, J.L. (1980) Progresos en la detección de adulteraciones en zumos de naranja, *Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos* 20, 289-298.
- Nebot Gil, E.; Romero Guzmán, M.D.; Romero Guzmán, F. (1993) Características de interés tecnológico de las naranjas amargas españolas, *EFCE Publ. Series* 101 (3) 123-130.
- Nickdel, S.; MacKellar, D.G.; Rezaaiyan, R. (1991) Analysis of mineral content and amount of chelated minerals in citrus juice by inductively coupled plasma emission spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 39 (10) 1773-1775.

Nishiura, M.; Esaki, S.; Kamiya, S. (1969) Flavonoids in Citrus and related genera. Part I. Distribution of flavonoid glycosides in Citrus and Poncirus, Agric. Biol. Chem. 33, 1109-1118.

Nishiura, M.; Kamiya, S.; Esaki, S. (1971 a) Flavonoids in Citrus and related genera. Part III. Flavonoid pattern and Citrus taxonomy, Agric. Biol. Chem. 35, 1691-1706.

Nishiura, M.; Kamiya, S.; Esaki, S.; Ito, F. (1971 b) Flavonoids in Citrus and related genera. Part II. Isolation and identification of isonaringin and neoeriocitrin from Citrus, Agric. Biol. Chem. 35, 1683-1690.

Nissenbaum, A.; Lifshitz, A.; Stepan, Y. (1974) Detection of citrus fruit adulteration using the distribution of natural stable isotopes, Lebensm. Wiss. Technol. 7, 152.

Nogata, Y.; Ohta, H.; Yoza, K.I.; Berhow, M.; Hasegawa, S. (1994) High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiodearray detector, J. Chromatography A 59-66.

Omar, M.B.E.; Rashwan, M.R.A.; El-Dengawi, R.A.H. (1998) Assessing quality parameters of peels and seeds of three important citrus varieties, Assiut J. Agric. Sci. 29 (3) 53-70.

Ooghe, W.C. y Detavernier, C.M. (1997) Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis*, by flavonoids, J. Agric. Food Chem. 45 (5) 1633-1637.

Ooghe, W. y Detavernier, C. (1999) Flavonoids as authenticity markers for *Citrus sinensis* juice, Fruit Processing 9 (8) 308-313.

Ooghe, W.C.; Ooghe, S.J.; Detavernier, C.; Huyghebaert, A. (1994) Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides, J. Agric. Food Chem. 42 (10) 2183-2190.

Ooghe, W.C.; Ooghe, S.J.; Detavernier, C.; Huyghebaert, A. (1994) Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by polymethoxylated flavones, J. Agric. Food Chem. 42 (10) 2191-2195.

Ortuño, A.; Reynaldo, I.; Fuster, M.D.; Botia, J.; García Puig, D.; Sabater, F.; García Lidón, A.; Porrás, I.; Río, J.A. del (1997) Citrus cultivars with high flavonoid contents in the fruits, Scientia Horticulturae 68 (1-4) 231-236.

Osborn, R.A. (1964) Chemical composition of fruits and fruit juices, J. Assoc. Offic. Agric. Chemists 47, 1068-1086.

Perfetti, G.A.; Joe, F.L.; Fazio, T.; Page, S.W. (1988) Liquid chromatographic methodology for the characterization of orange juice, J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists 71, 469-473.

Petrus, D.R.; Attaway, J.A. (1980) Visible and ultraviolet absorption and fluorescence excitation and emission characteristics of Florida orange juice and pulp wash, J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists 63, 1317-1331.

Potter, R.L.; Mansell, R.L. (1992) Assay for the detection of beet sugar adulteration of food products, US Patent US5128243/US544890.

Premi, B.R.; Lal, B.B.; Joshi, V.K. (1994) Distribution pattern of bittering principles in kinnow fruit, J. Food Sci. Technol. India 31 (2) 140-141.

Primo Yúfera, E. y Royo Iranzo, J. (1965) Detección de adulteraciones en zumos cítricos. V: composición mineral del zumo natural de naranjas industrializadas en España, Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 5 (2) 216-224.

Primo Yúfera, E. y Royo Iranzo, J. (1967), Detección de adulteraciones en zumos cítricos. IX: composición mineral del suero de zumos naturales de naranja elaborados en España y en Estados Unidos, Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 7 (3) 364-375.

Primo Yúfera, E. y Royo Iranzo, J. (1969), Detección de adulteraciones en zumos cítricos. XIV: composición mineral del suero de zumos de limón de variedades españolas, Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 9 (1) 100-105.

Protopapadakis, E. y Papanikolaou, X. (1998) Characterization of *Citrus aurantium* and *C. taiwanica* rootstocks by isoenzyme and essential oil analysis, J. Hortic. Sci. Biotechnol. 73 (1) 81-85.

Protopapadakis, E.; Voulgaropoulos, A.; Sofoniou, M. (1998) Rootstocks affect leaf and fruit mineral concentrations of Washington Navel orange, Fruits Paris 53 (3) 167-173.

Pupin, A.M.; Dennis, M.J.; Toledo, M.C.F. (1998) Polymethoxylated flavones in Brazilian orange juice, Food Chem. 63 (4) 513-518.

Pupin, A.M.; Dennis, M.J.; Toledo, M.C.F. (1998) Flavanone glycosides in Brazilian orange juice, Food Chem. 275-280.

Pupin, A.M.; Dennis, M.J.; Toledo, M.C.F. (1999) HPLC analysis of carotenoids in orange juice, Food Chem. 64 (2) 269-275.

Rapisarda, P.; Carollo, G.; Fallico, B.; Tomaselli, F.; Maccarone, E. (1998) Hidroxicinnamic acids as markers of Italian blood orange juices, J. Agric. Food Chem. 46, 464-470.

Real Academia Española (1984) Diccionario de la Lengua Española (20ª Edición), Madrid.

R.D. 670/1990, de 25 de Mayo, Norma de Calidad para confituras, jaleas y mermelada de frutas, crema de castañas y marmalade de frutas, B.O.E. Nº 130, 15140, 31.05.1990 (corrección de errores en B.O.E. de 18.09.1990).

R.D. 2002/1995, de 7 de Diciembre, por el que se aprueba la Lista Positiva de aditivos edulcorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, B.O.E. Nº 11, 12/01/1996, 838-848.

R.D. 2106/1996, de 20 de Septiembre, por el que se establecen las Normas de Identidad y Pureza de los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios, B.O.E. Nº 250, 16/10/1996, 30916-30923.

Reynaldo, I.; Río, J.A. del; Ortuño, A. (1997) Niveles de hesperidina y neohesperidina durante el desarrollo de los frutos de *Citrus macroptera*, Cultivos Tropicales 18 (1) 16-19.

Río, J.A. del; Cruz Arcas, M.; Benavente, O.; Sabater, F.; Ortuño, A. (1998) Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *C. aurantium* (cv. Sevillano) fruits, Planta Medica 64 (6) 575-576.

Robards, K.; Xia, L.; Antolovich, M.; Boyd, S. (1997) Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids, J. Sci. Food Agric. 75 (1) 87-101.

Rolle, L.A. y Vandercook, C.E. (1963) Lemon juice composition. III. Characterization of California-Arizona lemon juice by use of a multiple regression analysis, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 46, 362-365.

Romero, F.; Doblado, J.; Cota, J. (1988) Caracterización del aceite de semillas de naranjas amargas (*Citrus aurantium* L.), *Grasas y Aceites* 39 (6) 353-358.

Romero, F.; Blasco, S.L.; Cardenal, P.F.; Bejines, E. (1993) Spanish bitter oranges (*Citrus aurantium* L.): mineral composition of the solid portion in their juices, *Actas II International Congress on Food Technology and Development*, 28-33, CITEDA, Murcia.

Romero Guzmán, F. y Nebot Gil, E. (1995) Calidad tecnológica de la naranja amarga: zumo y su acidez, *Actas VI Symp. Andaluz del Alimento*, 135-143, ACTA-A, Granada.

Rosón Pérez, L. (1948) *La riqueza citrícola española*, Gráficas Infantes S.A., Madrid.

Rouseff, R.L. (1988) HPLC determination of naringin and neohesperidin to detect grapefruit juice in orange juice, *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* 71, 798-802.

Royo, J.; Barandalla, P.I.; Miralles, M.C. (1980) Preparación de corteza seca de mandarina, toronja, naranja amarga y limón para la obtención de pectina a partir de variedades cultivadas en España, *Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos* 20, 399-402.

Royo Iranzo, J. (1974) Métodos para la detección de fraudes en los zumos cítricos, en *Calidad y detección de adulteraciones en zumos cítricos*, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (C.S.I.C.), Valencia.

Royo Iranzo, J. y Giménez García, J. (1974) Detección de adulteraciones en zumos cítricos. XIX: diferencias entre las proporciones de los componentes característicos del suero y de la pulpa del zumo de naranjas españolas, *Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos* 14, 136-143 (1974).

Royo Iranzo, J.; Miralles, M.C.; Claramunt, P. (1975) Preparación de corteza seca de naranja para la obtención de pectina a partir de variedades cultivadas en España. Rendimiento y calidad del producto, Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 15, 539-546.

Royo Iranzo, J. y Peris Torán, I. (1970) Aplicación de la espectrofotometría de absorción atómica a la determinación de los elementos minerales característicos de los zumos cítricos, Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 10 (2) 274-278.

Royo Iranzo, J. y Romero Guzmán, F. (1973) Características y composición química del zumo de la naranja amarga española (*Citrus aurantium*, Linneo), Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos 13 (3) 426-435.

Safina, G. (1960) La determinazione dei costituenti minerali dei succhi di agrume. I. Sodio, potassio, ferro e fosforo, Conserve Deriv. Agrumari 11, 169-171.

Saleh, M.M.; Hashem, F.A.; Glombitza, K.W.; Abd-El-Megeed, H.F. (1998) Study of *Citrus taitensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated, Food Chem. 63 (3) 397-400.

Sawabe, A.; Kumamoto, H.; Matsubara, Y. (1998) Structure-function relationship of bioactive compounds in citrus fruit peels, Recent Res. Develop. Agric. Biol. Chem. 2 (1) 143-166.

Schuster, R. (1986) Determination of hesperidin in orange juice, Hewlett-Packard.

Shaw, P.E.; Buslig, B.S.; Moshonas, M.G. (1993) Classification of commercial orange juice types by pattern recognition involving volatile constituents quantified by gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* (41) 809-813.

Sheu, F.C. y Gow, C.Y. (1997) Changes in hesperidin content in different parts of freshly harvested citrus fruits grown in Taiwan, *J. Food Drug Analysis* 5 (1) 93-98.

Silva Emim, J.A. da y Oliveira, A.B.; Lapa, A.J. (1994) Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice, *J. Pharmacy Pharmacol.* 46 (2) 118-121.

Simpkins, W. y Harrison, M. (1995) The state of the art in authenticity tests, *Trends Food Sci. Technol.* 6 (10) 321-328.

Smith, P. y Rasmussen, G.K. (1961) Effect of potash rate on growth and production of Marsh grapefruit in Florida, *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 77, 180-187.

Soares, N.F.F. y Hotchkiss, J.H. (1998) Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice, *J. Food Sci.* 63 (1) 61-65.

Soni, S.L. y Randhawa, G.S. (1976) Ranges in ash mineral constituents of lemon during the growth and development, *Indian J. Horticult.* 33, 10-16.

Su, L.H.; Tang, Y.H.; Yu, C.H.; Chih, W.T.; Pei, D.L.C. (1998) Determination of naringin in marketed fruits, juices and candy from shaddock, *J. Food Drug Analysis* 6 (3) 599-604.

Suarez, J.; Herrera, M.D.; Marhuenda, E. (1998) In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone, *Phytomedicine* 5 (6) 469-473; 28.

Swallow, K.W.; Low, N.H.; Petrus, D.R. (1991) Detection of orange juice adulteration with beet medium invert sugar using anion-exchange liquid chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* 74 (2) 341-345.

Swift, L.J. (1965) Proximate analyses of Florida orange peel juice extracts for the 1962-63 and 1963-64 seasons, *J. Agric. Food. Chem.* 13, 282-284.

Swingle, W.T. (1943) The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily, en *The Citrus Industry*, Vol. 1 (H.J. Webber y L.D. Batchelor, ed.), Univ. of California Press, Berkeley.

Swingle, W.T. y Reece, P.C. (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives, en *The Citrus Industry* (W. Reuther, H.J. Webber y L.D. Batchelor, ed.) Vol. 1, 190-430, Univ. of California Press, Berkeley, Ca.

Tanaka, T. (1954) Species problems in *Citrus* (Revisio Aurantiacearum IX), *Japn. Soc. Prom. Sci.*, Ueno, Tokyo.

Tomás Barberán, F.A.; Gil, M.I.; Ferreres, F.; García Viguera, G.; Tomás Lorente, F. (1992) Detección de miel en turrón de Jijona mediante el análisis de flavonoides por HPLC, *Alimentación, Equipos y Tecnol.* 11 (4) 93-95.

Tomás Lorente, F.; García Viguera, C.; Ferreres, F.; Tomás Barberán, F.A. (1992) Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuineness, *J. Agric. Food Chem.* 40, 1800-1804.

Toussaint Samat, M. (1991) Historia natural y moral de los alimentos. 8. Las frutas y las verduras, Alianza Editorial, Madrid.

Twomey, M.; Downey, G.; McNulty, P.B. (1995) The potential of NIR spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice, J. Sci. Food Agric. 77-84.

Vandercook, C.E. y Guerrero, H.C. (1968) Effects of chemical preservatives and storage on constituents used to characterize lemon juice, J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 51, 6-10.

Vandercook, C.E. y Rolle, L.A. (1963) Lemon juice composition. II. Characterization of California-Arizona lemon juice by its polyphenolic content, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 46, 359-362.

Vandercook, C.E.; Rolle, L.A.; Postlmayr, H.L.; Utterberg, K.A. (1966) Lemon juice composition. V. Effects of some fruit storage and processing variables on the characterization of lemon juice, J. Food. Sci. 31, 58-62.

Venturella, P.; Bellino, A.; Cusmano, S. (1964) Substances in Citrus fruits. V. Isolation of the pigments from Citrus aurantium (varieties Alphonisii and Foetifera), Gazz. Chim. Ital. 96, 475-482.

Venturella, P.; Bellino, A.; Cusmano, S. (1965) Citrus components. Isolation of pigments from Citrus aurantium var. Foetifera, Atti. Accad. Sci., Lettere, Arti Palermo, Pt I, 24, 101-104.

Vogels, J.T.W.W.; Terwell, L.; Tas, A.C.; Berg, F.V.D.; Dukel, F.; Greef, J.V.D. (1996) Detection of adulteration in orange juices by a new screening method using proton NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques, J. Agric. Food Chem. 44, 175-180.

Wu, H.; Wang, X.; Wang, H.; Sun, Z.; Jiao, B.; Jiang, D.; Tang, Z.; Yu, E. (1995) A study on the growth and decline pattern of naringin in peel of developing fruits of shaddocks and grapefruit, *Scientia Agricultura Sinica* 28 (5) 73-77.

Xu, J.K.; Chen, J.Z.; Zou, H.Q.; Ye, T.H.; Li, F.C. (1994) Studies on the relation between calcium and fruit-cracking in "Hong Jiang" sweet orange, *J. South China Agric. Univ.* 15 (3) 77-81.

Yokoyama, H. (1965) Collaborative studies on the characterization of lemon juice, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 48, 530-533.

Yusof, S.; Ghazali, H.M.; King, G.S. (1990) Naringin content in local citrus fruits, *Food Chem.* 37 (2) 113-121.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D.^a Emilia Bejines Mejías
titulada Investigación de constituyentes minoritarios (mi-
nerales y glucósidos flavonoides) en naranjas amargas
españolas (Citrus aurantium L.) y productos derivados.
acordó otorgarle la calificación de SANEAMIENTO CON LAURE

Por unanimidad

Sevilla, 26 de Septiembre 2000

El Vocál,



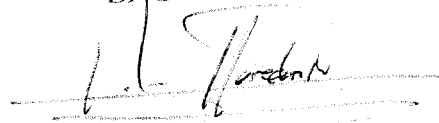
El Presidente



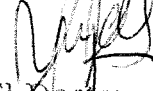
El Vocal,



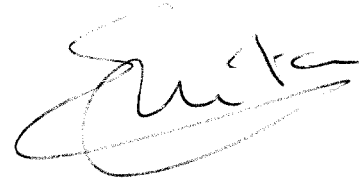
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



* 5 0 1 3 4 6 5 7 6 *

FQU I T/803