

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CONCENTRACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DURANTE LA MADURACIÓN
DE FRUTOS DE LIMÓN LISBON

por

Celene FRONDOY PIAZZOLI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2022

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Dra. Giuliana Gambetta Romaso

.....

Ing. Agr. MSc. Alfredo Gravina Telechea

.....

Ing. Agr. Oscar Bentancur

Fecha: 7 de marzo de 2022

Autora:

Celene Yanina Frondoy Piazzoli

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo incondicional durante la carrera, por sus consejos sus palabras de aliento y amor en todo momento: a mi mamá Sandy, a mis hermanas queridas Pamela, Romina y mi melli Silvina.

A mi tutora, Giuliana, por todo su apoyo, correcciones, aportes, consejos y el estar presente en todas las dudas.

A mi segundo tutor Alfredo que supo estar en las primeras instancias.

A la catedra de Ecofisiología de cítricos: Giuliana, Alfredo y Natalia por todo su apoyo y colaboración en el trabajo.

A Fabi y Sofí compañeras de carrera, por su gran apoyo en el trabajo y momentos compartidos.

Al Ing. Agr. Yamandú Pochintesta, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en la Quinta no. 7, de la localidad de Kiyú.

Al personal de Quinta no. 7, por su colaboración.

A todos mis compañeros, amigos, docentes de la Facultad de Agronomía.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <u>OBJETIVOS</u>	2
1.1.1 <u>Objetivo general</u>	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 <u>CARACTERÍSTICAS DE LA CITRICULTURA NACIONAL</u>	3
2.2 <u>CICLO PRODUCTIVO EN CITRUS</u>	3
2.2.1 <u>Introducción floral</u>	4
2.2.2 <u>Brotación y floración</u>	5
2.2.3 <u>Cuajado y crecimiento de frutos</u>	5
2.2.4 <u>Maduración del fruto</u>	6
2.2.5 <u>Comportamiento del limonero Lisbon en Uruguay</u>	7
2.3 <u>ACEITES ESENCIALES EN LIMÓN</u>	8
2.3.1 <u>Composición química de los aceites esenciales</u>	8
2.3.2 <u>Contenido y evolución de aceites esenciales en el fruto</u>	9
2.3.3 <u>Factores que influyen en el contenido y composición</u> <u>de aceites esenciales en el fruto</u>	11
2.4 <u>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES</u>	12
2.4.1 <u>Método de Clevenger</u>	13
2.4.2 <u>Método de Scott</u>	13
2.5 <u>HIPÓTESIS</u>	14
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
3.1 <u>MATERIAL VEGETAL</u>	15
3.2 <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	15
3.3 <u>EVALUACIONES REALIZADAS A CAMPO</u>	16
3.4 <u>EVALUACIONES REALIZADAS EN LABORATORIO</u>	17

3.4.1	<u>Contenido de aceites esenciales en fruta</u>	17
3.4.1.1	Procedimiento de determinación del contenido de aceite en fruta por método Clevenger.....	17
3.4.1.2	Procedimiento de determinación del contenido de aceite en fruta por método Scott	18
3.4.2	<u>Calidad interna</u>	20
3.4.3	<u>Color colorímetro y cartilla de color</u>	20
3.4.4	<u>Diámetro de frutos y grosor de cáscara</u>	21
3.5	MODELO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	21
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
4.1	RENDIMIENTO	23
4.2	ACEITES ESENCIALES	24
4.3	COLOR	28
4.4	GROSOR DE CÁSCARA.....	32
4.5	CALIDAD INTERNA	33
4.6	CONDICIONES AMBIENTALES.....	34
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	37
6.	<u>RESUMEN</u>	38
7.	<u>SUMMARY</u>	39
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	40

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Rendimiento promedio por árbol (kg) en cada fecha de cosecha.....	23
2. Calidad interna de frutos de limón según estrato de tamaño de frutos en las fechas de cosechas.....	33
Figura No.	
1. Localización de la parcela del experimento (cuadrante rojo), ubicada en la localidad de Kiyú San José.....	15
2. Cartilla de color de cosecha para limón	16
3. Destilador utilizado para la determinación de aceites por el método Clevenger	18
4. Destilador utilizado para la determinación de aceites por el método Scott	19
5. Medición de color con colorímetro (PCE-TCR 200).....	20
6. Evolución del porcentaje de kg de frutos por árbol correspondiente a cada estrato de tamaño durante el período de cosecha.....	24
7. Evolución de la concentración de aceites esenciales (g kg ⁻¹ materia fresca) en cada estrato de tamaño, determinada por el método de Scott (A) y por método Clevenger (B).....	25
8. Evolución del contenido de aceites esenciales por árbol, total y proveniente de cada estrato de tamaño de frutos (g árbol ⁻¹), determinado por el método Scott (A) y por el método Clevenger (B).....	27
9. Evolución de la proporción de frutos en cada categoría de color según fecha de cosecha, para frutos correspondientes al estrato de tamaño 40-55 mm (A), 55-60 mm (B), 60-65 mm (C) y >65 mm (D).....	30

10. Evolución del índice de color [(ax1000):(Lxb)] de cada categoría de estrato de tamaño (mm) durante las fechas evaluadas.....	31
11. Evolución de grosor de cáscara de frutos (mm) por estrato de tamaño durante el período de cosecha.....	32
12. (A) temperatura diaria (°C) y (B) humedad relativa diaria (%) registrada en la copa de los árboles durante el período de evaluación.....	35

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son unos de los frutales más importantes del mundo. Los limones y limas representan más de un 10 % de la producción y comercialización mundial de cítricos (FAO, 2019). Las variedades de limón más importantes son Eureka y Lisboa o Lisbon.

La producción de limones se puede destinar al consumo en fresco o a la industria y dentro de ésta se destaca la producción de aceites esenciales. El aceite esencial de limón es el más conocido y difundido, ocupando a nivel mundial el segundo lugar, luego del de naranjo dulce. Dentro de los mayores productores de limones del mundo, se encuentran: India, China, México, Argentina, Brasil, Estados Unidos y Sudáfrica. Los principales exportadores medidos en volumen, según datos de FAO (2019) son: México, España, Turquía, Sudáfrica, Argentina, Países bajos y Brasil. Siendo los principales destinos EEUU, Rusia, Reino Unido, Alemania, Canadá y Arabia Saudita. Los principales países a los que se destinan los aceites esenciales, son la zona Oeste de Europa, Estados Unidos y Japón (Cerruti y Neumayer, 2004).

En Uruguay, los cítricos constituyen el mayor rubro hortifrutícola, definido como un complejo agroindustrial orientado a la producción de fruta para consumo en fresco, destinada a exportación y mercado interno. El volumen de fruta que no se comercializa, es procesada industrialmente, dedicada a la producción de concentrados, aceites esenciales y bases para pectinas (MGAP. DIEA, 2020). Sin embargo, en los últimos años debido a un nuevo emprendimiento comercial, existe interés en la producción de aceites esenciales de limón. A nivel país, hay muy pocos trabajos publicados de investigación sobre aceites esenciales en variedades cítricas. En la actualidad no se han reportado estudios. La concentración de aceites esenciales en la cáscara varía durante el desarrollo del fruto (Feliú, 1943). A nivel productivo es necesario determinar el estado de desarrollo que permita el mayor rendimiento en aceites esenciales por árbol, para poder definir el período óptimo de cosecha.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Determinar la concentración de aceites esenciales en frutos de limón Lisbon desde fines de la fase II y durante la fase III de crecimiento del fruto

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto del tamaño y la maduración del fruto en la concentración de aceites esenciales
- Establecer el período de cosecha que favorezca el mayor rendimiento por árbol de aceites esenciales

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CITRICULTURA NACIONAL

La producción citrícola en el país abarca una superficie efectiva de 14.587 hectáreas, con un total de 7,2 millones de plantas. En el año 2020 se registró una producción total de 219 mil toneladas, de las cuales el 40 % correspondió a naranjas, el 36 % a mandarinas y el 24 % a limones (MGAP. DIEA, 2021).

La producción de cítricos se encuentra concentrada en pocas empresas; de 439 explotaciones presentes en el país, más del 50 % de la producción, superficie y número de plantas es abarcado por solo 4 empresas (MGAP. DIEA, 2021). La producción comercial se agrupa en dos grandes zonas, una zona Norte que comprende los departamentos de Salto, Paysandú, Artigas y Río Negro, en la cual se concentra el 91 % de la producción total, basada en la producción de naranjas, mandarinas y pomelos. Y una zona Sur, que comprende a los departamentos de San José, Colonia, Montevideo, Canelones y Maldonado, donde se produce el restante 9 % y comprende fundamentalmente a la producción de limones (MGAP. DIEA, 2021).

En el año 2020, el destino de producción de la fruta cítrica, comprendió en un 42 % al mercado interno, 44 % a la exportación para consumo en fresco y 14 % a la industria (MGAP. DIEA, 2021). Los principales destinos de exportación fueron a la Unión Europea (Países bajos, España e Italia, principalmente), Estados Unidos, Brasil, Rusia y Canadá. Las exportaciones de productos industrializados, están poco desarrolladas en el país, alcanzando el 1,0 % de la producción total en el año 2020, del cual 91 % comprendió a jugos y un 9% a aceites (MGAP. DIEA, 2021).

La producción de limón en el país ocupa una superficie de 2.763 hectáreas, con una producción de 51.620 toneladas. Las variedades más plantas en el país son: Lisbon o Criollo, Fino 49 y Eureka, siendo la primera la que ocupa la mayor superficie (MGAP. DIEA, 2021).

2.2. CICLO PRODUCTIVO EN CITRUS

Los cítricos son cultivos de hoja perenne, de origen tropical y subtropical, adaptados a climas templados, en los cuales pueden presentar de 1 a 3 brotaciones anuales. Presentan brotaciones vegetativas durante el período de verano-otoño y brotaciones reproductivas durante el período de primavera. La excepción la constituye el limón (*C. limón* Burm), que puede presentar brotaciones vegetativas y reproductivas durante todo el año, excepto en el invierno (Gravina, 2014). El ciclo productivo anual en cítricos comprende las etapas de inducción y diferenciación floral, brotación y floración, cuajado y crecimiento de fruto, maduración y senescencia de los mismos.

2.2.1. Inducción floral

Se entiende por inducción floral al proceso que involucra la desrepresión de genes en el meristemo apical de las yemas, las cuales, estimuladas por factores exógenos o endógenos, promueven los procesos de formación de estructuras florales (Davenport, 1990). Según Goldschmidt y Monselise (1970) todas las yemas de los cítricos están determinadas a ser reproductivas una vez pasada la etapa de juvenilidad, siempre que se den las condiciones favorables y no existan inhibiciones. En las zonas con inviernos marcados, este proceso se da durante el período otoño-invierno.

La temperatura y el estrés hídrico son los principales factores exógenos promotores de la inducción floral. Temperaturas por debajo de 15 °C promueven la inducción floral en cítricos, favoreciendo el desarrollo de estructuras reproductivas, observándose una correlación positiva entre el tiempo de duración del frío y el número de flores formadas (Lovatt et al., 1988). Las temperaturas inductivas se asocian a los contenidos hormonales que intervienen en el proceso de floración. Los árboles sometidos a bajas temperaturas, presentan bajos niveles de giberelinas (15 °C), produciendo mayor número de flores, en relación a los árboles sometidos a altas temperaturas (30 °C), los cuales no produjeron flores (Poerwanto y Inoue, 1990). El estrés hídrico promueve la inducción floral en cítricos. Su severidad y duración provocan una respuesta inductiva progresiva en el número de yemas florales, flores e inflorescencias (Nakajima et al. 1993, Manzi 2011).

La presencia del fruto y su permanencia en la planta, son factores endógenos que inhiben la inducción floral en cítricos. Se ha demostrado que una alta carga de frutos en plantas cítricas, provocan una baja floración en la primavera siguiente, a partir de la inhibición de expresión de genes promotores de la inducción floral (*CiFT* y *SOC*) durante el período inductivo, tanto en hojas como en yemas (Muñoz-Fambuena et al., 2011). El factor endógeno más importante en la regulación de la inducción floral, son las giberelinas producidas por el fruto. La aplicación de ácido giberélico (GA_3) durante el período inductivo en árboles de naranjo dulce ‘Salustiana’, resultó en una reducción del 72 % de la floración con respecto al control y, por el contrario, los árboles tratados con paclobutrazol (inhibidor de la biosíntesis de giberelinas) presentaron un aumento del 123 % en la intensidad de floración con respecto al control (Muñoz-Fambuena et al., 2012). Esto confirma el efecto inhibitorio importante de las giberelinas sobre el proceso de inducción floral. Por otro lado, los frutos también inhiben la floración de forma indirecta, reprimiendo las brotaciones vegetativas de verano y otoño y por lo tanto reduciendo el número de yemas jóvenes capaces de inducirse y brotar en la primavera (Verreyne y Lovatt, 2009).

2.2.2. Brotación y floración

El inicio de la brotación en el país se da a fines de agosto, adelantándose dos semanas en la zona Norte. En los limoneros, a pesar de que la brotación reproductiva de primavera es la más importante, las brotaciones de los flujos de verano también presentan brotes reproductivos (Gravina, 1999). Los citrus, producen yemas reproductivas en ramas jóvenes del año, por lo que la renovación de la madera en los brotes, es de suma importancia para la producción (Gravina, 2014).

En citrus se distinguen 5 tipos de brotes, que se clasifican en base a la proporción de flores y hojas, estos son: brotes vegetativos, brotes de flor solitaria sin hojas, inflorescencias de dos o más flores sin hojas, brotes de flor terminal con hojas y brotes mixtos con hojas y 2 o más flores (Gravina, 2014). La proporción relativa de los distintos brotes, está en función de la regulación endógena de balances hormonales como también de las reservas de carbohidratos de la planta (Agustí et al., 2002). Según el mismo autor, la intensidad de las brotaciones está condicionada por la carga de frutos de la cosecha anterior, pero también por el genotipo.

El limonero, al igual que otros cítricos presenta dominancia apical, pero en esta especie es más marcada, siendo sus flujos de brotación de menor intensidad que las mandarinas e híbridos, en los cuales la menor dominancia apical favorece un mayor número de yemas brotadas en cada flujo (Gravina, 1999). La brotación depende también de factores exógenos, entre ellos la temperatura del aire y del suelo. Poerwanto y Inoue (1990) estudiaron el efecto de estos factores en mandarina 'Satsuma', donde determinaron que temperaturas de suelo menores a 15 °C durante el período previo a la brotación, promovían el aumento de brotaciones vegetativas y reproductivas, disminuyendo notablemente a temperaturas de suelo mayores a 30 °C en el mismo período. También observaron que plantas sometidas a bajas temperaturas de aire, acompañadas de altas temperatura de suelo (15 °C / 30 °C), durante un período previo a la brotación, presentaron mayores floraciones que las expuestas a las condiciones opuestas (30 °C/ 15 °C aire y suelo respectivamente), estableciendo que la baja temperatura del aire es más eficaz promoviendo la inducción floral, que la baja temperatura del suelo, pero que esta última presenta un efecto directo sobre la brotación.

2.2.3. Cuajado y crecimiento de frutos

El crecimiento inicial del fruto comienza a partir del cuajado, el cual se define desde el punto de vista botánico como el reinicio de crecimiento del ovario, posteriormente a los procesos de polinización y fecundación o a un estímulo partenocárpico.

El crecimiento del fruto sigue una curva sigmoide, que consta de 3 fases. La etapa I, de división celular del ovario, comienza con la antesis y finaliza con el fin de la caída fisiológica. Esta etapa es en la cual se define el número potencial de frutos que va a alcanzar la madurez, por lo que cualquier factor que interrumpa el desarrollo normal de estos, puede generar su abscisión. Esta fase es regulada por estímulos hormonales, principalmente asociados a las giberelinas y citoquininas (Gravina, 2014).

El cuajado de los frutos está determinado por características exógenas y endógenas. Dentro de las endógenas, las características varietales, factores nutricionales y hormonales son los principales reguladores (Borges et al., 2009). El cuajado inicial está determinado principalmente por factores hormonales, fundamentalmente los niveles de giberelinas (GAs), las cuales estimulan la tasa de división celular, favoreciendo la capacidad fosa de los frutitos y promoviendo su crecimiento y supervivencia (Rivas et al., 2007). Los factores nutricionales se encuentran referidos principalmente a la disponibilidad de carbohidratos de la planta; una mayor disponibilidad reduce la abscisión de frutos, favoreciendo el cuajado final (Iglesias et al., 2003). Los principales factores exógenos que afectan el cuajado de los frutos, promoviendo el proceso de abscisión son, temperaturas y radiaciones altas y estrés hídrico (Borges et al., 2009).

Finalizada la caída fisiológica, comienza la fase II de crecimiento del fruto, la cual está basada principalmente en la elongación celular y el llenado de los vesículas de jugo ubicados en los lóculos. Esta etapa está regulada hormonalmente por auxinas y giberelinas y por el aporte de carbohidratos, agua y nutrientes. En esta etapa se alcanza la mayor parte del tamaño final del fruto (Gravina, 2014).

2.2.4. Maduración del fruto

La maduración es la fase III del crecimiento del fruto, en la cual éste adquiere las características organolépticas adecuadas para su consumo. Los cítricos son frutos no climatéricos. Cuando su crecimiento activo se enlentece y el metabolismo se modifica, se dan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, que llevan a la obtención de un órgano adecuado para su consumo. Este proceso es regulado tanto por factores exógenos como endógenos (Iglesias et al. 2007, Gravina 2014).

El fruto cítrico es una baya modificada llamada hesperidio, compuesto por dos regiones morfológicamente distintas, el pericarpio que comprende a la cáscara y el endocarpio que comprende la parte comestible del fruto, constituida por las semillas y varios segmentos o gajos que contienen las vesículas de jugo (Gravina, 2014). El pericarpio se divide en dos partes: el exocarpio o flavedo, que es la porción externa de color y el mesocarpio o albedo que comprende la parte blanca de la cáscara.

Durante la maduración, el fruto alcanza su tamaño máximo y completa su desarrollo, adquiriendo propiedades físicas y componentes químicos, que determinan su calidad final, como textura, color, firmeza, facilidad de pelado, acidez, contenido de azúcares solubles, aromatizantes y sustancias volátiles (Iglesias et al., 2007). La mayor evidencia de la maduración externa, es el cambio de color del fruto, el cual es debido a la conversión de cloroplastos en cromoplastos, que consiste en la disminución progresiva de la síntesis de clorofila y aumento en la biosíntesis de carotenoides, manifestándose así el cambio de coloración (Gross, 1981). Este proceso es reversible y está regulado por factores hormonales, ambientales y nutricionales (Huff, 1983).

Con relación a las condiciones ambientales, las bajas temperaturas por debajo de 13 °C promueven el cambio de color de la fruta, promoviendo la degradación de clorofilas y síntesis de carotenoides, mientras que las altas temperaturas se encuentran relacionadas con el reverdecimiento. También se verificó un efecto de la luz sobre la coloración, reportándose que frutos situados en el exterior del árbol, presentaban una coloración más intensa (Goldschmidt, 1988). El efecto del contenido de carbohidratos y nutrientes minerales sobre la coloración del fruto también ha sido determinado; el contenido de nitrógeno (N) en la cáscara promueve la síntesis de cloroplastos que podría asociarse al contenido de giberelinas (GAs), mientras que la acumulación de azúcares, promueve la formación de cromoplastos (Huff, 1983). En este sentido, posteriormente se comprobó que el cambio de color del fruto se asocia a la disminución en la cáscara de GAs activas y N, y al aumento de los azúcares solubles (Gambetta et al., 2012).

2.2.5. Comportamiento del limonero Lisbon en Uruguay

En la zona Sur del país, se reportó una intensidad de floración para esta especie, menor a 20 flores cada 100 nudos, ubicadas mayoritariamente en brote de tipo flor solitaria. Esta variedad se caracteriza por presentar varios flujos de brotación, siendo la brotación de primavera la principal, con predominio de brotes reproductivos. Las brotaciones posteriores son menos intensas, presentándose tanto brotes reproductivos como vegetativos, encontrándose en la planta superposición de diferentes estados de desarrollo de las estructuras. En general presenta elevados porcentajes de cuajado de frutos (entre 15 % y 27 %). El período de cosecha más importante comprende desde junio hasta agosto, siendo las cosechas de fin de primavera y verano de menor rendimiento. En dicho estudio se registró un rendimiento exportable de 33 toneladas por hectárea en la cosecha de invierno, con un promedio de 100 kg y 750 frutos por planta (Espino et al., 2005).

2.3. ACEITES ESENCIALES EN LIMÓN

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, responsables del aroma de las plantas (Cerruti y Neumayer, 2004). Se pueden obtener de diferentes órganos de una planta, tanto en hojas como raíces, flores, semillas y frutos. En las variedades cítricas como el limón, los aceites esenciales se encuentran predominantemente en la corteza del fruto, fundamentalmente en el flavedo, donde se encuentran mayoritariamente las glándulas de aceites (Kealey et al., 1979).

Los aceites cítricos se utilizan comercialmente para aromatizar alimentos, bebidas, perfumes, y medicamentos cosméticos (Babazadeh, 2009). Además, presentan propiedades insecticidas, antimicrobianas y antioxidantes, actuando como barrera tóxica natural contra microorganismos e insectos (Shahidi y Zhong, 2005). El principal destino del aceite de limón es la industria de refrescos, en la que se utiliza para toda una gama de bebidas carbonatadas. Aproximadamente una cuarta parte del aceite esencial producido en el mundo, proviene del hemisferio sur, siendo Argentina uno de los mayores productores, siguiéndole Brasil, Chile y Sudáfrica (Misitano, 2000).

2.3.1 Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de cítricos son una mezcla compleja de componentes volátiles, que comprende una variedad de terpenos y sus derivados oxigenados, además de ésteres, alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos y residuos no volátiles (Babazadeh 2013, Ghoorchibeigi et al. 2017). Estos compuestos pueden determinarse a través de técnicas de cromatografía líquida (HPLC) y/o de gases (Albaladejo, 1999).

De los compuestos terpénicos, los hidrocarburos son los compuestos mayoritarios, comprendiendo el 94 % del aceite esencial, siendo el d-limoneno el principal, con un 60 % - 70 %, junto con β -pineno, que se sitúa sobre un 10 % - 13 % y el γ -terpineno en un 9 % - 11 %. En menor proporción se encuentran los compuestos oxigenados, siendo los aldehídos los más representativos, seguidos de ésteres y alcoholes, alcanzando valores de 2 % - 6 % (Cerruti y Neumayer 2004, Divaio et al. 2010, Argote-Vega et al. 2017). Estas sustancias químicas se encuentran en el orden de partes por millón (Cerruti y Neumayer, 2004). Según estudios realizados por Sinclair (1984), la composición del aceite de limón puede variar en función del ambiente, prácticas culturales, genética, madurez de la fruta y técnicas de procesamiento utilizadas.

La calidad de un aceite esencial se puede calcular a partir de la cantidad de compuestos oxigenados presentes en el mismo, que consisten principalmente en alcoholes, aldehídos y ésteres como linalol, citral y acetato de linalilo; siendo los aldehídos los componentes que más contribuyen al aroma del aceite; su contenido es utilizado como

un índice comercial de calidad en cítricos (Sinclair 1984, Kealery y Kinsella 1979, Kostadinović et al. 2010).

El citral es un aldehído insaturado formado por dos isómeros (geraniol y neral), responsable del aroma de la esencia del aceite de limón, utilizada para aromatizar diferentes productos industriales (Babazadeh , 2009). Por esto, la calidad del aceite de limón se asocia al contenido total de este aldehído y a su porcentaje en el aceite esencial de limón (Sinclair, 1984). Lodge et al. (1984), señalan que el contenido de citral del aceite de cáscara de limón, ronda en un valor medio de 4 % extraído por prensado en frío, similar a lo establecido por Sinclair (1984), que señala valores entre 5 % y 6 %. Por otro lado, Guo et al. (2018) en base a análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), establecieron valores de 1,88 %.

La cantidad de compuestos oxigenados presentes en el aceite, entre los que se encuentra el citral, es variable y depende de una serie de factores como portainjertos, variedad, época del año y tipo de órgano (flor, hoja, cáscara y jugo de mandarina, Babazadeh 2009, 2011a, 2011b).

Según Babazadeh (2011b), Gok et al. (2015), el método de extracción utilizado también puede variar la determinación de composición de estos compuestos, determinándose mayores contenidos de hidrocarburos monoterpénicos (D-limoneno, b-pineno, y terpineno) cuando se extraen por hidrodestilación, en comparación a la extracción por prensado en frío. Lo contrario se observó en el contenido de compuestos oxigenados, con mayores variaciones en aldehídos (principalmente neral y geraniol), registrando mayor contenido al ser extraídos por el método de prensado en frío. El contenido de ésteres y alcoholes presentó valores superiores en la extracción por hidrodestilación.

Según Misitano (2000), el aceite procedente de Uruguay, presenta características muy similares al italiano, señalando que el aceite uruguayo es de calidad muy consistente, con alto contenido de aldehídos y rotación óptica.

2.3.2 Contenido y evolución de aceites esenciales en el fruto

El contenido de aceites esenciales en un fruto puede diferir según la variedad, fase de maduración, tiempo entre cosecha y procesamiento de la fruta, así como también con el trato que haya tenido el fruto durante su cosecha y manipulación (Feliú, 1943). Esto último está relacionado con lo dicho por Bartholomew y Sinclair (1946b), los cuales establecen que una cáscara suave y flácida produce menos aceite que una firme, debido a que la ruptura de los sacos contenedores de aceites es más ineficiente, por lo que el tiempo de cosecha y el tiempo transcurrido entre ésta y la extracción influye en el rendimiento de aceite, así como también lo afecta el estado de madurez del fruto.

Kesterson y Braddock (1975), señalan que existen diferencias entre especies y variedades en el contenido de aceite en la cáscara; las variedades de pomelo, en general presentan la mitad del contenido de aceite extraído que las variedades de naranjas. En limón, las variedades 'Limoneira', 'Lisboa' y 'Genova' presentaron contenidos de aceite en cáscara superiores a 'Eureka' (van der Merwe, 2005).

Con respecto al efecto del portainjertos en la composición de aceites esenciales en el fruto, existen diferencias entre la literatura. Por un lado Bitters y Scora (1970), evaluando el efecto de diferentes portainjertos de cítricos en naranja Valencia (*Citrus sinensis*), no encontraron grandes diferencias en los constituyentes principales. Por otro lado, van der Merwe (2005), identificó que los contenidos de aceite en cáscara de frutos muestreados de limón (*Citrus limón*) injertados en portainjertos poco vigorosos, como *Poncirus trifoliata* y citrange Carrizo, eran superiores a aquellos con portainjertos vigorosos como limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush).

Bartholomew y Sinclair (1946a), realizaron estudios para determinar el efecto de la edad de la fruta, tamaño y ambiente, sobre el contenido de aceites esenciales en la cáscara de naranja Washington navel y naranja Valencia en el Sur y centro de California. Observaron que a medida que la fruta madura y aumenta de tamaño, el rendimiento medio de aceite por unidad de superficie de cáscara mostró muy pocos cambios, independientemente de la madurez y tamaño del fruto, permaneciendo constante durante el desarrollo del fruto. El rendimiento de aceite por superficie de fruta aumentó durante el crecimiento del fruto, es decir que los frutos de tamaño grande produjeron más aceite que los pequeños, pero cuando los rendimientos se expresan por kilogramo de fruta, el rendimiento de los frutos pequeños es mayor, debido a que presentan una mayor superficie por tonelada. Estos resultados coinciden con lo establecido por Feliú (1943), que a medida que avanza la madurez del fruto, su tamaño aumenta y la superficie de corteza disminuye en relación a su peso, causando una disminución del rendimiento de aceite por tonelada de fruta. Estableciendo que durante toda la etapa de crecimiento del fruto y maduración, el contenido de aceite se encuentra directamente correlacionado con el tamaño de la fruta.

Drescher et al. (1971) estudiaron el contenido de aceites en cáscara de limón en diferentes estados de madurez durante el período agosto- diciembre (HN), determinando que a medida que aumenta la edad de la fruta, el contenido de aceite en cáscara disminuye, observándose un aumento en las primeras etapas, cuando el fruto presenta coloración verde y una disminución hacia la maduración cuando el fruto presenta coloración amarilla. Esto coincide con lo mencionado por Bain (1957), el cual señala que durante la etapa I de desarrollo del fruto se forman nuevas glándulas de aceite y se expanden, durante la etapa II aumentan de tamaño hasta la etapa III de desarrollo del fruto, en la cual se detiene el crecimiento. Las primeras etapas de desarrollo del fruto son las determinantes para la expansión y desarrollo de las glándulas de aceites.

Bartholomew y Sinclair (1946a) proponen que una vez que el fruto ha llegado a su tamaño máximo, el contenido de aceites esenciales pasa a depender de las condiciones ambientales externas y no del tamaño del fruto.

En lo que refiere a la variación de los compuestos químicos durante la evolución del fruto de limón, desde el otoño hacia el invierno (durante la temporada noviembre-mayo, HN), Cotroneo et al. (1986) determinaron que el contenido de hidrocarburos terpénicos permaneció constante, pero no ocurrió lo mismo en sus compuestos principales. Los valores de D-limoneno fueron superiores al inicio de la temporada, disminuyendo luego y los valores de β -pineno mostraron un comportamiento inverso. Los compuestos oxigenados presentaron valores que variaron de 3,7 % a 4,6 %, registrando sus valores mínimos hacia el final de la temporada; el citral presentó el mismo comportamiento, registrándose valores altos al comienzo de temporada y disminuyendo considerablemente hacia el final. En cambio, Kealey et al. (1979) observaron que, en naranjas, la concentración de aldehídos en el aceite aumentó al aumentar la maduración del fruto.

2.3.3. Factores que influyen en el contenido y composición de aceites esenciales en el fruto

Los aceites esenciales en los cítricos son una mezcla de compuestos volátiles con altos niveles de instauración siendo generalmente inestables a factores como luz, calor y humedad (Choi y Sawamura 2002, Di Vaio et al. 2010), generando reacciones oxidativas causantes de olores y sabores desagradables (Sinclair, 1984).

Van der Merwe (2005) reportó que la posición del fruto en el árbol afecta el contenido de aceite en la corteza de limón 'Eureka', siendo mayor en los frutos que se encontraban en el exterior de la copa con respecto a aquellos ubicados en posiciones sombreadas o semi-sombreadas o al interior del árbol, señalando un efecto positivo entre la exposición de los frutos a la luz directa y su contenido de aceite en cáscara.

Estudios nacionales, realizados por Dellacassa et al. (1994, 1997), determinaron que las condiciones meteorológicas, influyen en la composición de aceites. Los autores evaluaron tres temporadas correspondientes a los años 1992, 1993 y 1995, comparando además dos zonas del país, Norte y Sur. Estudiaron en primera instancia la composición de las temporadas 1992 y 1993, reportando que los frutos de árboles ubicados en la zona Sur, presentaron un mayor contenido de compuestos oxigenados y un menor contenido de hidrocarburos con respecto a aquellos de la zona Norte para cada temporada de producción. Los aceites extraídos durante la temporada 1993 presentaron un contenido medio más alto de compuestos oxigenados que los producidos durante 1992. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones meteorológicas sufridas en las dos temporadas, indicando que el invierno de la temporada 1992 fue altamente lluvioso y con

temperaturas invernales más bajas con relación a la temporada 1993. Para la temporada 1995, en comparación a las temporadas previas, la composición cuantitativa de los aceites del Norte fue muy similar, mientras que los frutos ubicados en la zona Sur en comparación al año 1993 presentaron un menor contenido de compuestos oxigenados, pero un contenido mayor de hidrocarburos y monoterpenos. En comparación a los aceites de 1992, los aceites de 1995 mostraron un contenido ligeramente inferior de hidrocarburos y monoterpenos y superior de compuestos oxigenados. En cambio, en comparación al año 1993, el contenido de hidrocarburos, monoterpenos y compuestos oxigenados fue similar, mientras que el contenido de ésteres y alcoholes fue superior. Los autores señalan que las diferencias encontradas en la composición de los aceites entre temporadas, pueden deberse a las condiciones meteorológicas sufridas en estos años; permitiendo establecer que inviernos muy lluviosos y con temperaturas más bajas el contenido de compuestos oxigenados es menor y el de hidrocarburos y monoterpenos mayor.

En estudios realizados por van der Merwe (2005), evaluando varias regiones de Sudáfrica, se determinó que el contenido de aceite era mayor en las muestras provenientes de regiones que presentaban climas áridos (secos y calientes), relacionándolo de forma positiva con la acumulación de unidades de calor creciente. Este autor también evaluó el efecto de hormonas promotoras e inhibidoras de crecimiento, aplicadas en limoneros en diferentes épocas y concentraciones. Observó que, aplicaciones de giberelinas sintéticas, citoquininas y auxinas, no presentaron un efecto en el contenido de aceite en la cáscara, mientras que la aplicación de Etefón (promotor de la síntesis de etileno), disminuyó el contenido de aceite, cuando se aplicó 8 semanas antes de cosecha.

2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se pueden extraer por diferentes métodos: mecánico de prensado en frío o métodos de destilación e hidrodestilación (Sinclair 1984, Cerruti y Neumayer 2004). El método más convencional es el mecánico de prensado en frío, aunque también se utilizan los métodos de destilación por arrastre de vapor o agua (Danila et al., 2018).

Los métodos mecánicos obtienen el aceite por presión o abrasión sobre la cáscara, provocando la ruptura de las glándulas de aceite, expulsando el aceite y siendo retenido por aspersiones de agua, formando una emulsión de aceite-agua. Las aspersiones de agua hidratan las células esponjosas del flavedo y albedo adyacentes a las glándulas de aceites, evitando así la absorción del aceite liberado por esos tejidos (Sinclair, 1984). Las aspersiones de agua, aumentan la presión osmótica de las células circulantes, generando un aumento de la presión osmótica de las glándulas. Consecuentemente, la cantidad de aceite liberado al romperse el flavedo, está relacionado con el nivel de turgencia de la fruta (Cerruti y Neumayer, 2004). Todos los métodos de extracción de aceites de cítricos

rompen o escarifican las glándulas de aceite, recogíendolo en el menor tiempo posible para evitar que sea absorbido por el albedo esponjoso.

Kesterson y Hendrickson (1958), Gok et al. (2015) han identificado ciertas desventajas en el producto obtenido según el método de extracción utilizado, estableciendo que temperaturas elevadas y un tiempo de extracción largo por hidrodestilación, pueden causar modificaciones químicas de los compuestos del aceite y pérdida de componentes más volátiles. En el método de extracción por prensado en frío, una vez extraído el aceite, el mismo se centrifuga con agua, permitiendo la entrada de oxígeno en el mismo, lo que favorece los procesos de oxidación e hidrólisis, generando disminución de compuestos oxigenados, principalmente aldehídos y alcoholes, alterando la calidad del aceite (Cerruti y Neumayer, 2004).

2.4.1. Método de Clevenger

El método Clevenger es un método de hidrodestilación, utilizando un aparato tipo clevenger. El material a extraer está completamente sumergido en agua, es calentado hasta ebullición por medio de fuego directo o a través de otro método de calefacción. El aceite extraído es arrastrado con el vapor hacia un condensador o refrigerante; al final de éste se ubica una trampa Clevenger, que va separando el aceite del agua condensada, facilitando la correcta extracción y determinación del mismo (Clevenger 1928, UNAM 2014).

Unas de las características principales de este método, es el contacto directo que existe entre el agua de ebullición y el material, este último permanece bien disperso en el agua, debido al movimiento generado por la ebullición, lo que permite que no se deposite en el fondo (Chávez et al., 2014).

2.4.2. Método de Scott

El método Scott, es un método desarrollado por Scott y Veldhuis (1966), el cual implica la estimación del contenido de aceite en cítricos con bromo, a partir de la combinación cuantitativa en solución acida de d- limoneno. El método consiste en agregar isopropanol a la mezcla a la cual se le quiere estimar el contenido de aceite, posteriormente se destila y a la muestra destilada se acidifica con HCL, para luego ser titulada con una solución de bromato de potasio, y estimado el valor final a partir de la desaparición del color del indicador de naranja de metilo. La medición del d-limoneno como una representación del contenido de aceite se ha convertido en un valor estándar en la industria (Kimball, 1999).

2.5. HIPÓTESIS

Con estos antecedentes se plantean las siguientes hipótesis.

H1) La concentración de aceites esenciales, se modifica con el tamaño del fruto y durante la fase de maduración del mismo

H2) El contenido total de aceites esenciales por árbol aumenta durante la época de cosecha

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el departamento de San José, próximo a la localidad de Kiyú, en la quinta no. 7 de la empresa San Miguel Global (Figura 1).



Figura 1. Localización de la parcela del experimento (cuadrante rojo), ubicada en la localidad de Kiyú, San José

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para la realización del trabajo se seleccionaron árboles adultos de limón ‘criollo’ o tipo ‘Lisbon’ (*Citrus limón* Burm.), injertados sobre *Poncirus trifoliata* (L) Raf., plantados en el año 2010 con un marco de plantación de 6,5 m x 3 m. Se seleccionaron 28 árboles homogéneos en cuanto a tamaño y carga de frutos y considerando el estado sanitario en el que se encontraban, descartándose aquellos que presentaban importantes daños causados por taladro (*Diploschema rotundicolle* Audinet-Serville).

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este experimento se evaluaron dos factores, fecha de cosecha y estrato de tamaño de frutos. El diseño experimental fue completamente al azar en parcelas divididas donde la ‘Fecha de cosecha’ fue el factor aplicado a la parcela grande. Las unidades experimentales correspondientes a la parcela grande fueron los árboles. El factor correspondiente a la parcela menor fue el ‘Estrato de tamaño’ de frutos.

3.3 EVALUACIONES REALIZADAS A CAMPO

Para evaluar el efecto de los dos factores, en el contenido de aceites esenciales, se realizaron 7 fechas de cosecha (23/04, 15/05, 12/06, 3/07, 24/07, 14/08, 4/09), en las que se evaluaron 4 estratos de tamaño de frutos (diámetro ecuatorial entre 40-55 mm, 55-60 mm, 60-65 mm y > 65 mm).

En cada fecha de cosecha se cosecharon 4 árboles, se midió el diámetro ecuatorial de todos los frutos para clasificarlos en los 4 estratos de tamaño y se contabilizó el número y peso de frutos por estrato de tamaño por árbol. Adicionalmente se cuantificó el número de frutos de cada estrato correspondiente a cada categoría de color, utilizando la cartilla de color para limón (Figura 2).

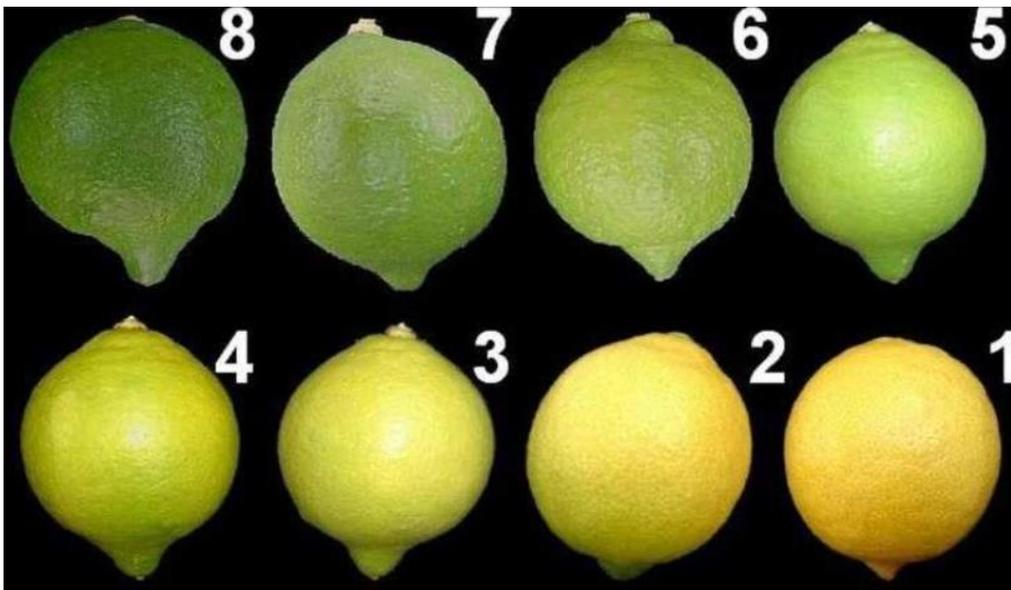


Figura 2. Cartilla de color de cosecha para limón

En cada fecha de cosecha se muestrearon 15-20 kg de fruta por estrato y por árbol para la extracción de aceites esenciales por los métodos de Clevenger y Scott. Adicionalmente, se utilizó una muestra de 15 frutos para la medición del color con colorímetro digital, el diámetro ecuatorial, grosor de cáscara y realizar el análisis de calidad interna (porcentaje de jugo, sólidos solubles y acidez titulable).

Durante todo el experimento se registró en forma horaria la humedad relativa y temperatura mediante el uso de 2 sensores (I-button, Higrchron) ubicados en la copa de los árboles distribuidos en diferentes sectores del cuadro.

Adicionalmente, se obtuvo el aporte de fertilizantes y riego realizado en el cuadro y el registro de las precipitaciones durante todo el período. Para el período setiembre a diciembre de 2018 (fase I de crecimiento del fruto) se registró una aplicación de 145 unidades de nitrógeno (kg ha^{-1}), 47 y 42 unidades de K_2O y P_2O_5 , respectivamente. Desde enero hasta mediados de abril, que implicó la fase II de crecimiento del fruto y comienzo de fase III, se aplicó un total de 57 unidades de nitrógeno y 135 unidades de K_2O , no se aplicó P_2O_5 durante este período. Durante el desarrollo y final de la fase III, que implicó el período de mayo a setiembre del 2019, abarcando la mayoría de las fechas de cosecha evaluadas, no se realizaron aplicaciones de fertilizantes.

El riego equivalente en mm y las precipitaciones registradas en el cuadro durante la primera fase de crecimiento del fruto, fueron respectivamente 57,8 mm y 401 mm. Durante el período de enero a abril, se regó 54 mm y las precipitaciones fueron de 213 mm. Durante la fase III de crecimiento del fruto (de mayo a setiembre) no se regó y se registró un nivel de precipitaciones de 316 mm.

3.4 EVALUACIONES REALIZADAS EN LABORATORIO

3.4.1 Contenido de aceites esenciales en fruta

En cada estrato de tamaño de frutos y fecha de cosecha se determinó la concentración de aceites por medio de dos métodos de extracción. Los métodos de extracción utilizados fueron método de hidrodestilación tipo Clevenger y el método Scott, utilizando la metodología descrita por Redd et al. (1986), Kimball (1999). Para la determinación por ambos métodos se utilizó la muestra de 15kg-20kg de cada estrato de tamaño, de la cual se extrajo una muestra de 3kg, la misma se licuó con 3kg agua durante 10 minutos hasta obtener una masa homogénea.

3.4.1.1 Procedimiento de determinación del contenido de aceite en fruta por método Clevenger

Se colocaron 200 g de la muestra licuada en un balón de fondo redondo de 2 l, agregándole a continuación 200 g de agua. Luego se le aplicó 1ml de silicona antiespumante. Se armó el equipo de destilación y se dejó destilar durante 50 minutos desde la ebullición. Se esperó 10 minutos para realizar la lectura luego del descenso de la temperatura del sistema. Para el cálculo de la concentración de aceites se utilizó el valor 0,853 como densidad de aceite de limón. Los resultados se expresaron en g de aceite por kg de fruta.

$$\frac{\text{Lectura (ml)} \cdot \text{densidad de aceite} \cdot 2 \cdot 1000}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

Peso de muestra (g)



Figura 3. Destilador utilizado para la determinación de aceites por el método Clevenger

3.4.1.2 Procedimiento de determinación del contenido de aceite en fruta por método Scott

Se colocaron 13 g de muestra licuada en un balón de 250 ml, se le agregó 50 ml de alcohol isopropílico (1:1) medidos con probeta para poner a destilar. Se le aplicaron 2 a 3 gotas de antiespumante.

Una vez realizados los pasos mencionados anteriormente, se pasó a armar el aparato de destilación como se muestra en la Figura 4, posteriormente se encendió la fuente de calor y la corriente de agua.

Una vez finalizado el proceso de destilación, se recogió 50 ml del destilado en un matraz de Erlenmeyer, se agregó 10 ml de HCL (1:2) y 3 gotas del indicador anaranjado de metilo. Posteriormente se tituló con solución de bromuro/bromato (0,1 N) hasta desaparición de color.

Por último, se realizó un blanco, colocando 50 ml de alcohol isopropílico (1:1) en un balón de destilación y se repitieron los pasos mencionados anteriormente.

$$\frac{(\text{ml gasto} - \text{ml blanco}) \times N \text{ Br}^-/\text{BrO}_3^- \times 0,0404 \times 0,853 \times 2 \times 1000}{P_m}$$

P_m

0,0404= relación estequiométrica del d-limoneno neutralizado por $\text{Br}^-/\text{BrO}_3^-$

0,853= densidad del aceite de limón

1000= para expresar el resultado en toneladas

2= factor de dilución

P_m = peso de la muestra



Figura 4. Destilador utilizado para la determinación de aceites por el método Scott

3.4.2 Calidad interna

Se utilizó una muestra de 15 frutos por estrato en cada tratamiento para determinar los parámetros de calidad interna: acidez titulable (%), porcentaje de jugo y sólidos solubles totales (° Brix). La acidez se calculó en base a una titulación con NaOH con normalidad 0,1, utilizando como reactivo tres gotas de fenolftaleína, en 2 ml de jugo y los sólidos solubles totales con un refractómetro manual (B&C 30103).

3.4.3 Color colorímetro y cartilla de color

Se midieron 15 frutos por fecha de cosecha con un colorímetro (PCE-TCR 200), se tomaron dos medidas en la zona ecuatorial del fruto. El colorímetro permite obtener 3 variables importantes en la determinación del color, estas son la luminosidad (L), el ángulo de tono o hue y la saturación o croma, estos últimos se calculan a partir de los datos que arroja el colorímetro (variables a y b). La variable a indica la evolución de rojo a verde y la variable b , de azul a amarillo, a través del sistema CIE Lab, Se calculó además el índice de color para cítricos, propuesto por Jiménez-Cuesta et al. (1981) los cuales relacionan los tres parámetros ICC: $[(ax1000):(Lxb)]$. A los mismos frutos se les determinó el color utilizando la cartilla de color comercial (Figura 2), clasificándolos en 8 categorías.



Figura 5. Medición de color con colorímetro (PCE-TCR 200)

3.4.4 Diámetro de frutos y grosor de cáscara

A los 15 frutos muestreados por estrato y fecha de cosecha también se les determinó con calibre digital (Mytutoyo) el diámetro ecuatorial y el grosor de la cáscara.

3.5 MODELO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \delta_{ik} + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} : valor de la característica en estudio

μ : media general

A_i : el efecto del tratamiento i sobre la parcela grande

δ_{ik} : el error sobre la parcela grande

B_j : el efecto del subtratamiento j dentro de la parcela grande.

$(AB)_{ij}$: interacción entre el tratamiento i y el subtratamiento k

ϵ_{ijk} : el error sobre la parcela chica

i : 1,2,3,4,5,6,7 (Fecha de cosecha) (a)

j : 1,2,3,4 (Estrato de tamaño) (b)

k : 1.2.3.4 (Repeticiones) (r)

$\delta_{ik} \sim N(0; \sigma^2_{\epsilon a})$ condiciones de parcela grande

$\epsilon_{ijk} \sim N(0; \sigma^2_{\epsilon b})$ condiciones de parcela chica

Las variables continuas se analizaron a través del modelo lineal general ANAVA, contemplando el modelo de parcelas divididas. Las variables analizadas a nivel de árbol fueron número de frutos y rendimiento (kg) por estrato de tamaño y por árbol, y las analizadas a nivel de frutos fueron contenido de aceite (g/kg fruto), diámetro ecuatorial del fruto, color, grosor de cáscara, sólidos solubles, acidez.

La separación de medias se realizó por prueba Tukey ($p \leq 0,05$), excepto para la determinación de color por cartilla, que se realizó a través de pruebas de diferencia de proporciones, inferencia basada en dos muestras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTO

El rendimiento promedio por árbol se ubicó entre 119 kg y 177 kg en las siete fechas evaluadas (Cuadro 1). El tamaño de los frutos fue aumentando desde la cosecha de abril hasta la de setiembre (Figura 6), observándose una disminución del porcentaje de frutos menores a 55 mm, de 22 % de los kg correspondientes a dicho estrato de tamaño en la primera fecha (23/04) a menos del 10 % a partir de la tercera fecha (12/06). Por el contrario, se observó un incremento del porcentaje de kg correspondientes a los frutos en el estrato superior (> 65 mm), representando el 24 % en la primera fecha de cosecha y más del 60 % en la tercera fecha, llegando a un 76-77 % en las últimas fechas de cosecha (14/08).

Cuadro 1. Rendimiento promedio por árbol (kg) en cada fecha de cosecha

	Fecha de cosecha	Rendimiento por árbol (kg)
1	23/04/2019	123,94 a
2	15/05/2019	118,62 a
3	12/06/2019	146,86 a
4	03/07/2019	120,67 a
5	24/07/2019	165,11 a
6	14/08/2019	177,3 a
7	04/09/2019	158,07 a

Sin diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

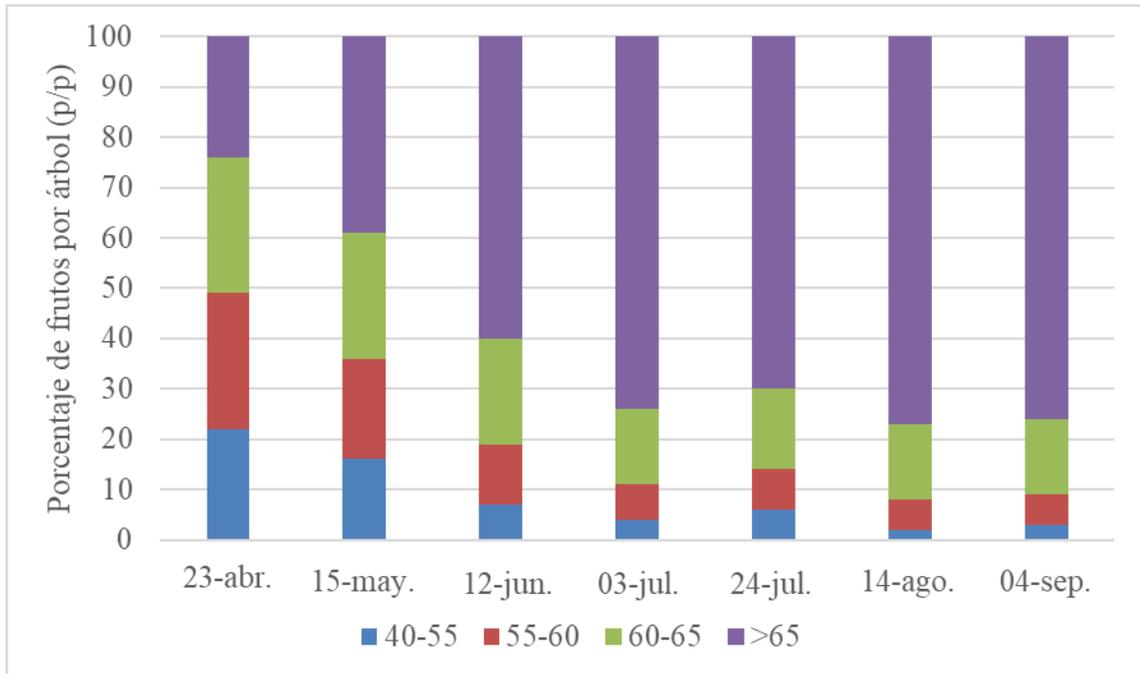


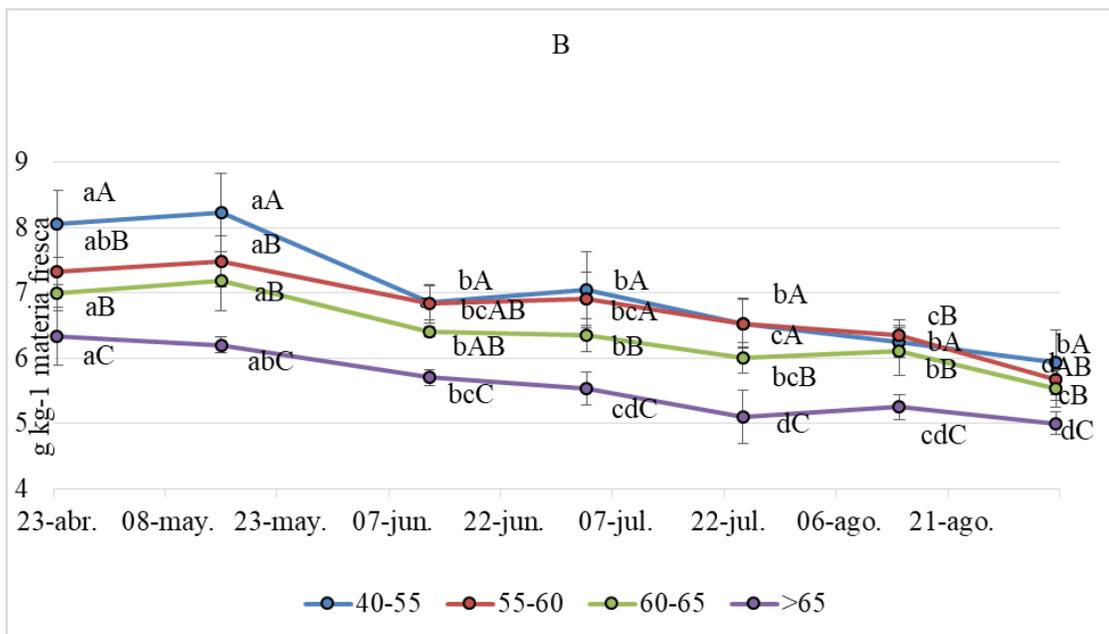
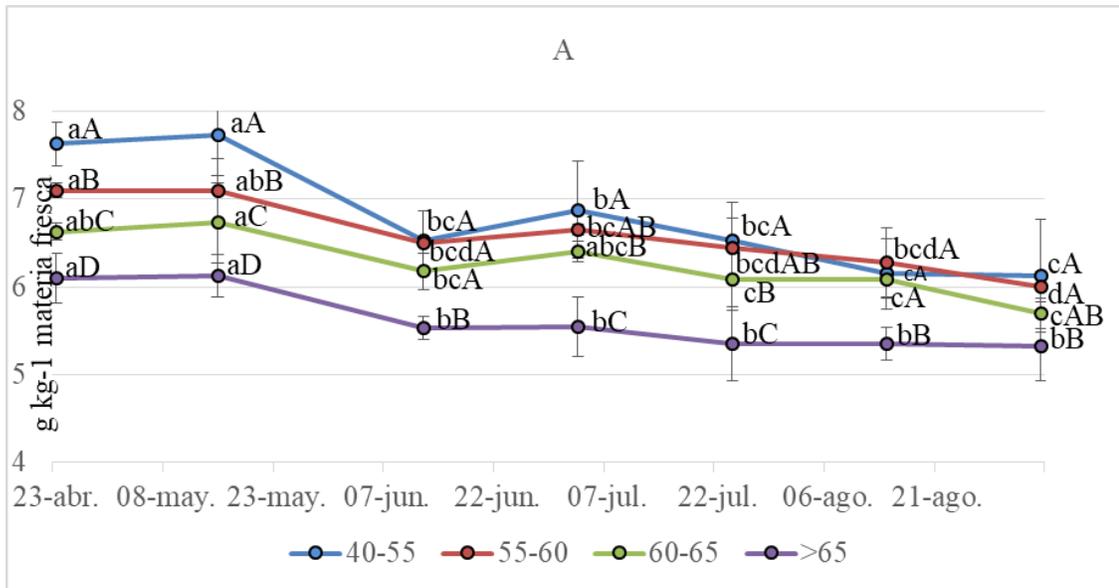
Figura 6. Evolución del porcentaje de frutos por árbol (p/p) correspondiente a cada estrato de tamaño durante el período de cosecha (23/04/2019 al 04/09/2019)

4.2. ACEITES ESENCIALES

La concentración de aceites esenciales determinada por los métodos de Scott y Clevenger fue similar, siendo superior con el segundo debido al tipo de determinación. En ambos casos, la evolución de aceites presentó una tendencia descendente a lo largo de las fechas evaluadas. En las dos primeras fechas la concentración no presentó variaciones, sin embargo, se redujo significativamente a partir de la tercera. Esta reducción fue muy notoria en los frutos del estrato de menor tamaño (40-55 mm), menos importante, pero manteniendo la significancia estadística, en los dos estratos siguientes (55-60 mm y 60-65 mm), y más leve en los frutos mayores a 65 mm de diámetro (Figura 7).

Al inicio del experimento (fechas 1 y 2), la concentración de aceites se relacionó en forma inversa con el tamaño de los frutos, siendo estadísticamente diferente en cada uno de los estratos cuando se determinó por el método Scott. En la determinación por el método Clevenger, se mantuvo la diferencia entre los frutos de mayor y menor tamaño, pero la concentración de aceites en los frutos de los dos estratos intermedios no presentó diferencias significativas. A partir de la tercera fecha de muestreo, en todos los casos las diferencias entre los estratos intermedios se fueron perdiendo. Sin embargo, desde el inicio

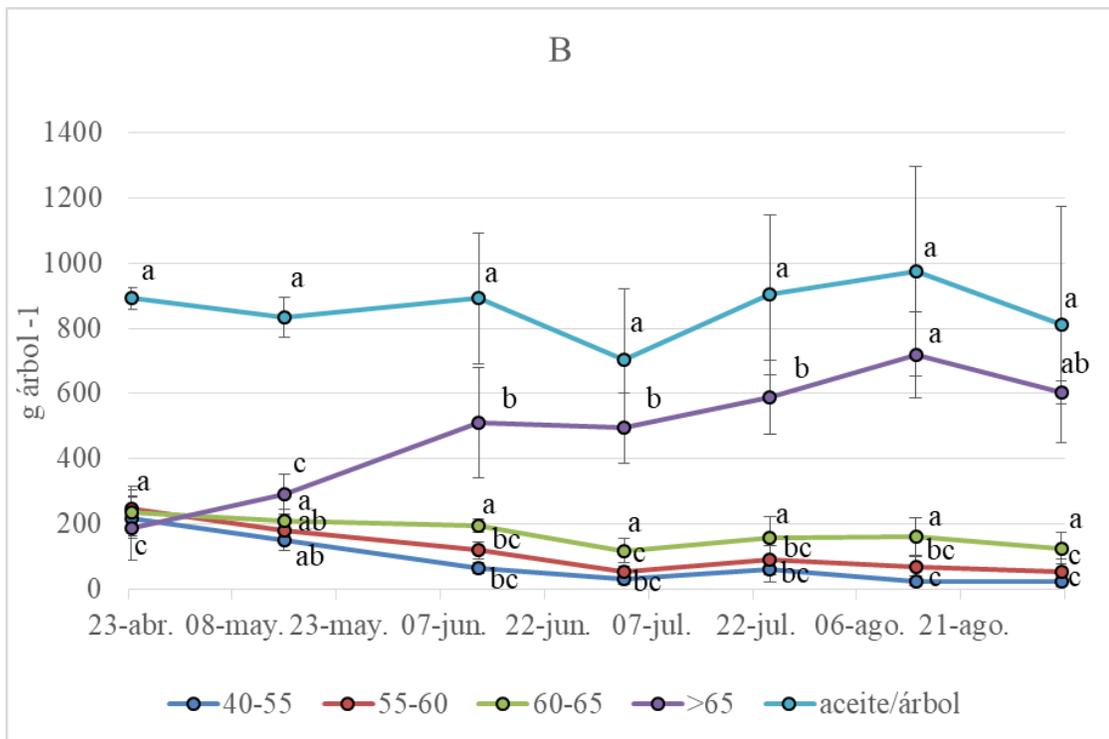
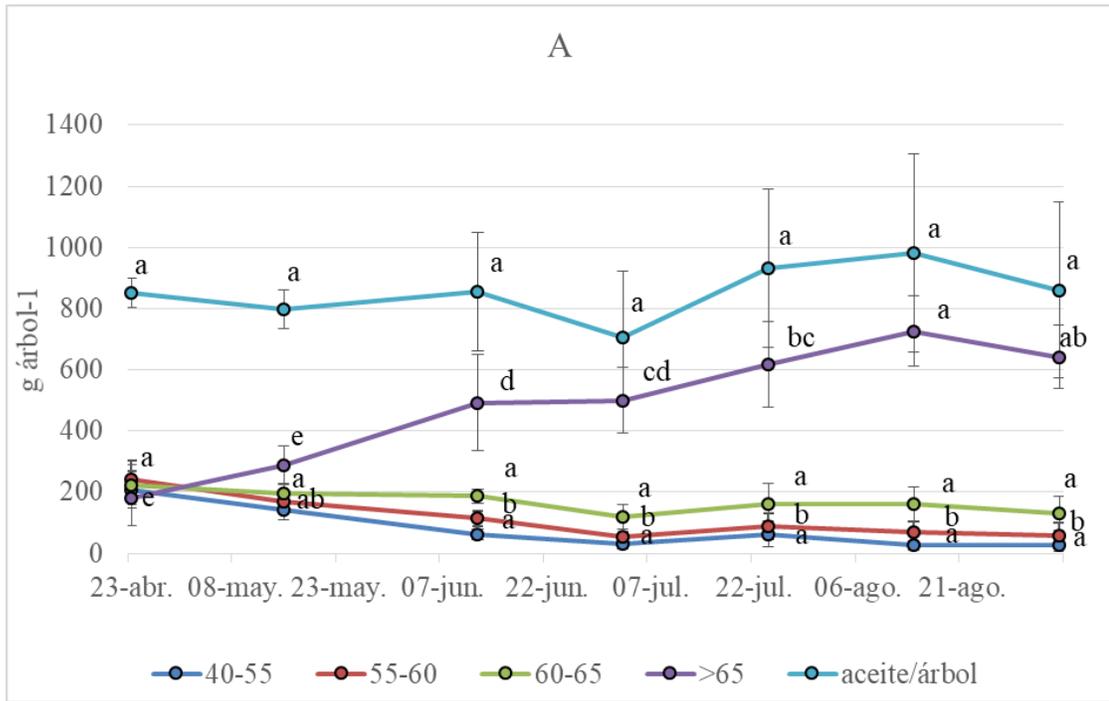
hasta el final del experimento, la concentración de aceites de los frutos de menor tamaño fue superior a la de los de mayor tamaño. Este resultado difiere de lo establecido por Bartholomew y Sinclair (1946a), los cuales hallaron que el rendimiento medio de aceite por unidad de superficie permanecía constante durante todo el desarrollo del fruto, independientemente del tamaño y maduración del mismo.



Letras minúsculas indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre fechas para cada estrato de tamaño. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estratos de tamaño para una misma fecha.

Figura 7. Evolución de la concentración de aceites esenciales (g kg^{-1} materia fresca) en cada estrato de tamaño, determinada por el método de Scott (A) y por el método Clevenger (B)

El contenido total de aceites esenciales por árbol, determinado por ambos métodos, considerando la concentración promedio de aceites esenciales en cada estrato de tamaño y los kilogramos de fruta correspondientes al estrato en cada árbol, se mantuvo prácticamente constante. Se observó una leve disminución en la fecha 4, aunque no significativa, probablemente debido a la leve reducción del rendimiento promedio por árbol (Cuadro 1 y Figura 8). La magnitud de aceites esenciales por árbol proveniente del estrato de mayor tamaño se incrementó con el tiempo, debido al incremento del número de frutos en esta categoría, con mínimas variaciones en la concentración de aceites (Figuras 6 y 7). Este estrato de tamaño es el que aporta la mayor proporción de aceites esenciales por árbol a partir de la tercera fecha de cosecha (12 de junio). Estos resultados coincidieron con lo establecido por los autores Bartholomew y Sinclair (1946a), quienes determinaron, que el rendimiento de aceite por superficie de fruto aumenta durante el crecimiento del mismo, presentando los frutos de mayor tamaño una mayor cantidad de aceite. Por otro lado, Cerruti y Neumayer (2004), establecieron que además de la correlación directa del contenido de aceites con el tamaño del fruto, también influye el estado de madurez; en etapas muy avanzadas de madurez donde la cáscara del fruto se torna blanda, los rendimientos de aceite son menores, debido a que la ruptura de los sacos de aceite es más difícil. Esta disminución en el rendimiento debido a la madurez del fruto, se vio reflejada en la última fecha evaluada, la cual presentó una tendencia a valores menores de rendimiento de aceite comparado a las fechas anteriores (Figura 8, Cuadro 1).



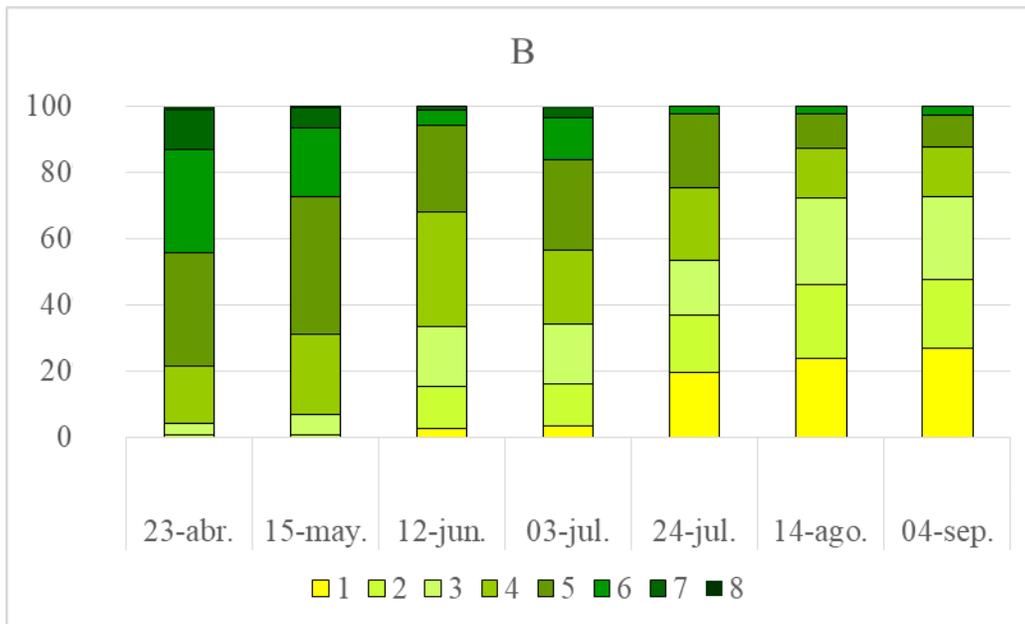
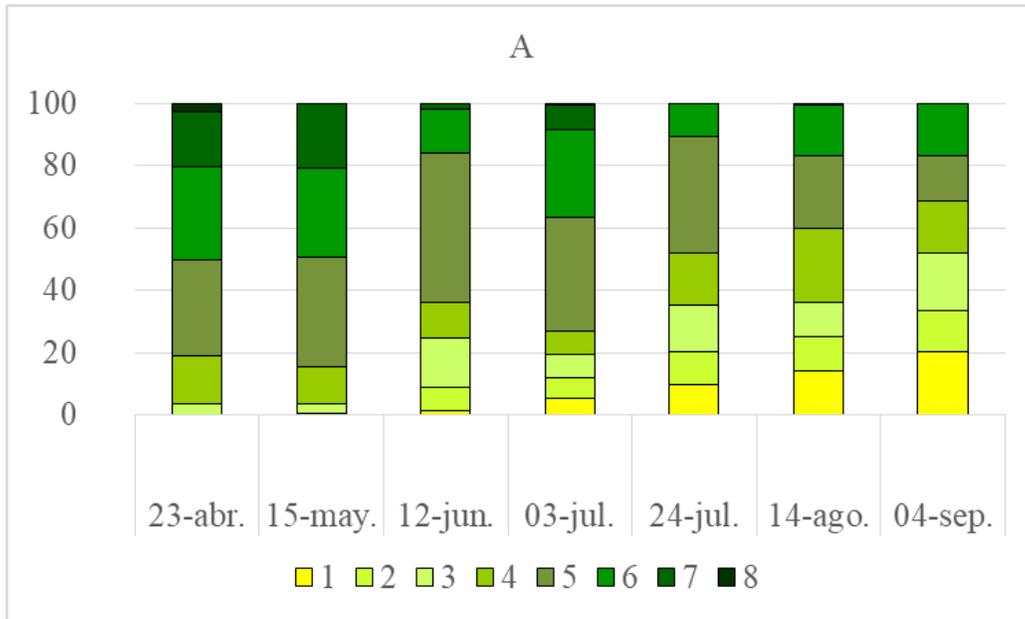
Letras diferentes para una misma categoría (estrato o total) indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Figura 8. Evolución del contenido de aceites esenciales por árbol, total y proveniente de cada estrato de tamaño de frutos (g árbol^{-1}), determinado por el método Scott (A) y por el método Clevenger (B)

4.3. COLOR

Para todos los estratos de tamaño, en las dos primeras fechas de cosecha, la mayoría de los frutos se encontraba entre las categorías 5 y 8 de la cartilla de color (Figura 9). A partir de la tercera fecha (12 de junio) el número de frutos con el color correspondiente a las categorías 6 y 7 fue disminuyendo de forma significativa, y por el contrario fue aumentando significativamente el número de frutos con coloración 1 y 2. En la tercera y cuarta fecha la mayor proporción de frutos se ubicó entre las categorías 2 y 4 y a partir de la quinta fecha (23/07) la mayoría de los frutos se encontraba en las dos categorías de mayor coloración (1 y 2). En los frutos del estrato de menor tamaño (40-55 mm), en las dos primeras fechas la distribución en las categorías de color fue muy similar, predominando en ambos casos los frutos de color verde (Figura 9 A). A partir de la tercera fecha, comienza el cambio de color en los frutos de este estrato, coincidiendo con la disminución de la concentración de aceites esenciales (Figuras 7 y 10).

En el estrato de frutos de mayor diámetro, desde las primeras fechas de cosecha existió una pequeña proporción de frutos con coloración correspondiente a las categorías 1 y 2, que fue aumentando de forma significativa a medida que avanzaba la estación. En este estrato de tamaño, la disminución de frutos con el color correspondiente a las categorías 6 y 7, conjuntamente con el aumento de la proporción de frutos en las categorías 1 y 2 fue más notoria que en los demás estratos. En las dos últimas fechas de cosecha (14 de agosto y 4 de setiembre) más del 85 % de los frutos alcanzó dicha coloración (Figura 9 D). A su vez los frutos de este estrato de tamaño presentaron desde el inicio menor concentración de aceites esenciales, pudiendo relacionarse al estado de madurez más avanzado, en comparación con los frutos de los otros estratos de tamaño. Estos resultados pueden explicarse porque en la fase III de maduración del fruto, las glándulas de aceite dejan de crecer y además a la menor eficiencia en la extracción de aceite, debido a una dificultad en la ruptura de las glándulas de aceite a medida que el fruto avanza en su etapa de madurez (Cerruti y Neumayer, 2004).



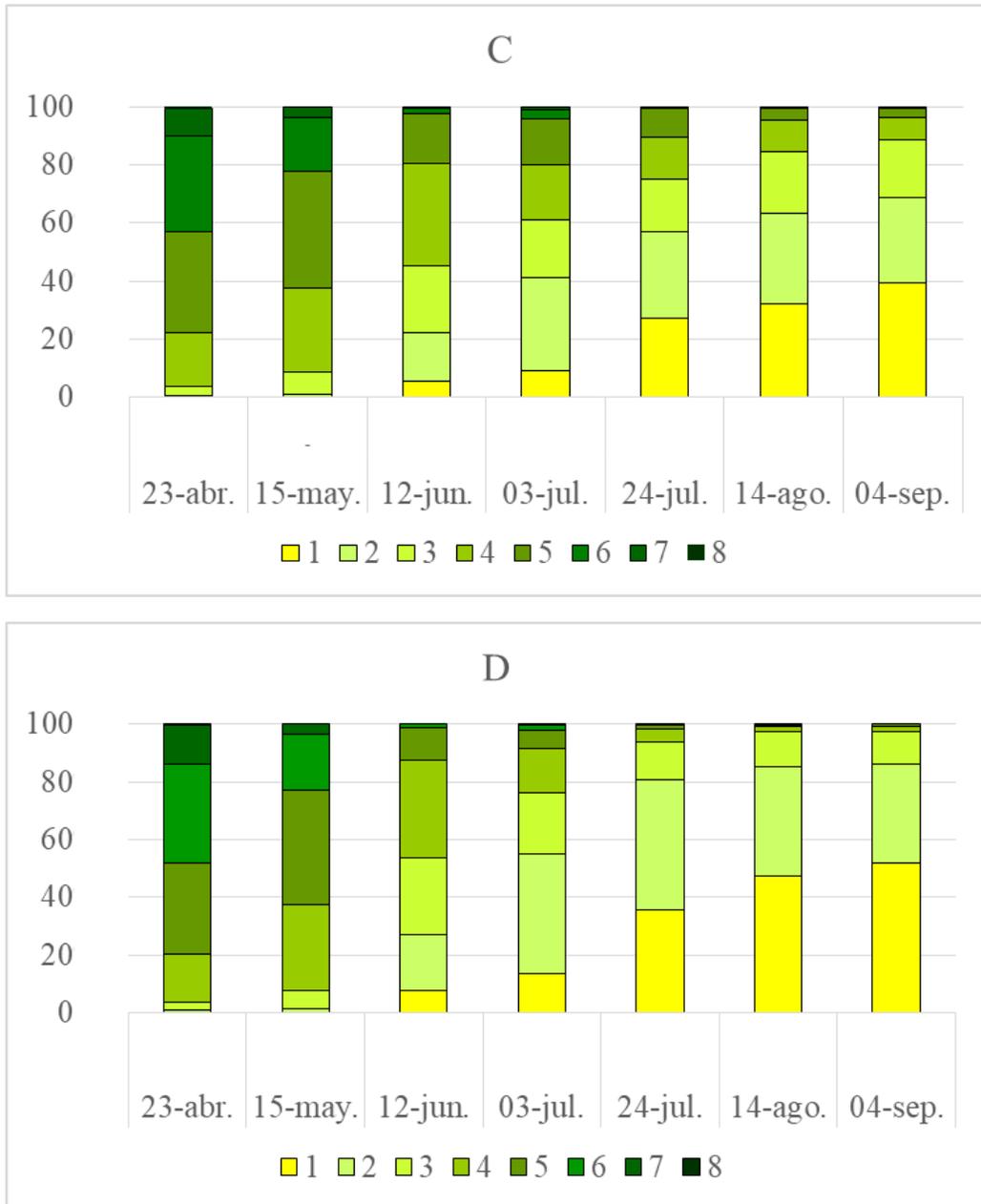
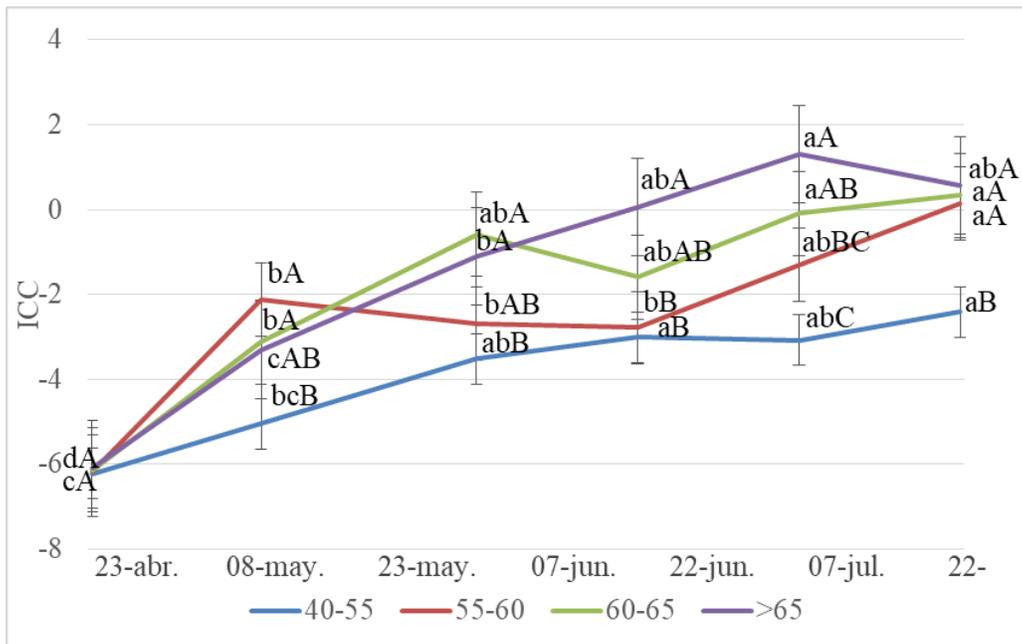


Figura 9. Evolución de la proporción de frutos en cada categoría de color según fecha de cosecha, para frutos correspondientes al estrato de tamaño 40-55 mm (A), 55-60 mm (B), 60-65 mm (C) y >65 mm (D)

La evolución del índice de color para cítricos (ICC), determinado a partir de las mediciones de las variables L, a y b del sistema CIE Lab, confirmó los resultados

obtenidos con clasificación cualitativa utilizando la cartilla comercial de color (Figura 10). Los valores comprendidos entre -7 y 0 indican la evolución del color de cáscara de verde a inicio de color amarillo. El cambio de color determinado a partir de la tercera fecha se observa mayoritariamente en los estratos de mayor tamaño. En las fechas finales de evaluación, se determinaron valores superiores a 0, reflejando el color amarillo de la mayoría de los frutos de dicho estrato de tamaño. Por el contrario, el promedio de color de los frutos de menor tamaño no logró llegar al valor 0. La coloración se relacionó inversamente a la concentración de aceites esenciales en la cáscara de los frutos con una disminución significativa a partir de la tercera fecha (Figura 7). Este resultado coincide con Drescher et al. (1971), que determinaron que el contenido de aceite aumenta en las primeras etapas del crecimiento, cuando el fruto presenta coloración verde y disminuye con la edad del fruto hacia la maduración, cuando presenta coloración amarilla.

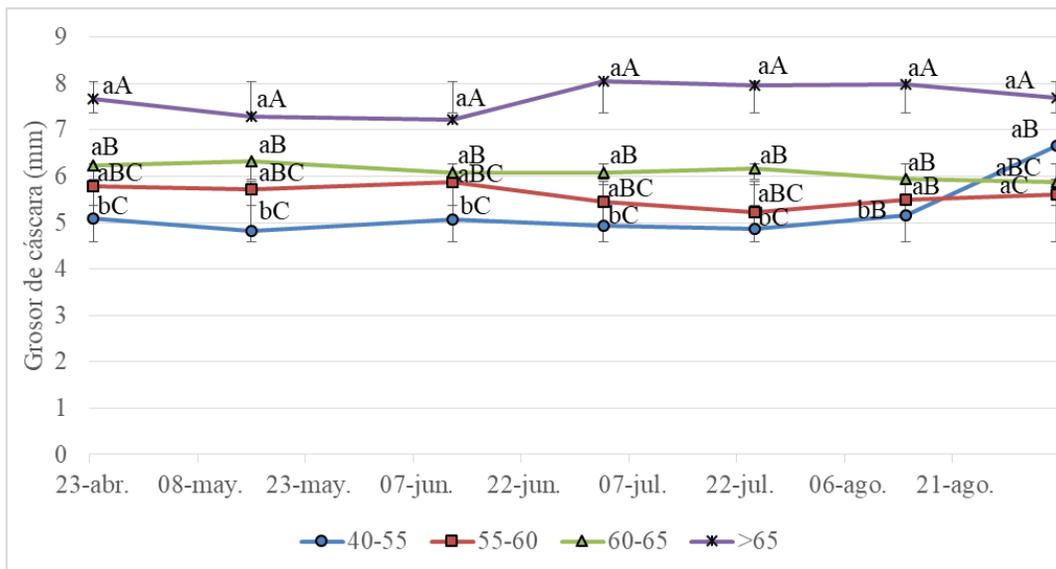


Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre fechas para cada estrato de tamaño. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre estratos de tamaño para una misma fecha.

Figura 10. Evolución del índice de color [(ax1000):(Lxb)] de cada categoría de estrato de tamaño (mm) durante las fechas evaluada

4.4. GROSOR DE CÁSCARA

Durante todo el período evaluado los frutos del estrato de mayor tamaño (> 65 mm) presentaron significativamente mayor grosor de cáscara que los frutos de los demás tamaños evaluados (Figura 11). Entre la cuarta y sexta fecha esta diferencia se incrementó. Para el caso de los frutos correspondientes a los estratos 55-60 mm y 60-65 mm, el grosor de cáscara permaneció prácticamente constante durante todo el período, a diferencia de los frutos del estrato 40-55 mm, que al inicio presentó significativamente el menor grosor de cáscara y en la última fecha se observó un aumento significativo. Considerando la concentración de aceites esenciales y la evolución de grosor de cáscara de frutos correspondientes a los diferentes estratos de tamaño, no se encontró asociación entre estas dos variables.



Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre fechas para cada estrato de tamaño. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre estratos de tamaño para una misma fecha.

Figura 11. Evolución de grosor de cáscara de frutos (mm) por estrato de tamaño durante el período de cosecha

4.5. CALIDAD INTERNA

En términos generales, no se encontraron diferencias importantes en las variables de calidad interna (Cuadro 2). Se destaca el bajo porcentaje de jugo, especialmente en las primeras fechas de cosecha y en los estratos de tamaños menores. En ninguno de los casos se alcanzó el 40 % de jugo, valorado a nivel comercial. Los sólidos solubles totales y la acidez, se encontraron dentro de rangos normales para limón y no presentaron variaciones importantes entre fechas o estratos de tamaño.

Cuadro 2. Calidad interna de frutos de limón según estrato de tamaño de frutos en las 7 fechas de cosechas

Fecha de cosecha	Estrato de tamaño (mm)	Sólidos solubles totales (°Brix)	Acidez titulable (%)	Jugo (% p/p)
1 23/04/2019	40-55	7 a	7 a	24 a
	55-60	7 a	7 a	26 a
	60-65	7 a	7 a	26 a
	>65	7 a	7 a	26 a
2 15/05/2019	40-55	8 a	8 a	24 a
	55-60	7 a	7 b	28 a
	60-65	8 a	7 b	29 a
	>65	8 a	7 b	29 a
3 12/06/2019	40-55	7 a	6 a	25 c
	55-60	7 a	6 a	30 abc
	60-65	7 a	6 a	32 a
	>65	7 a	6 a	31 ab
4 03/07/2019	40-55	8 a	6 a	29 a
	55-60	8 a	6 a	30 a
	60-65	8 a	6 a	31 a
	>65	8 a	6 a	28 a
5 24/07/2019	40-55	7 a	6 a	32 a
	55-60	8 a	6 a	30 a
	60-65	7 a	6 a	32 a
	>65	8 a	6 a	30 a
6 14/08/2019	40-55	7 a	5 a	23 b
	55-60	7 a	6 a	28 ab
	60-65	7 a	6 a	31 a
	>65	7 a	6 a	31 a

7 04/09/2019	40-55	8 ^a	6 a	31 a
	55-60	7 ab	6 a	30 a
	60-65	7 ab	6 a	33 a
	>65	7 b	6 a	32 a

Letras diferentes en una misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre estratos de tamaño.

4.6. CONDICIONES AMBIENTALES

La temperatura registrada se encontró por debajo de 30 °C durante todo el período de evaluación (Figura 12 A). En los 10 días previos a la primera cosecha, la temperatura varió entre 5 y 30 °C, rango que fue disminuyendo gradualmente hasta la cuarta cosecha, en la que en los días previos se encontró entre - 1 y 21 °C; posteriormente se fue incrementando levemente hasta la última fecha de cosecha, en la que la temperatura de los días previos varió entre 1 y 25 °C.

La humedad relativa permaneció la mayor parte del tiempo por encima de 60 %, aunque se registraron períodos, fundamentalmente al inicio del experimento (primera y segunda fecha de cosecha) y al final (última fecha de cosecha), en los que estuvo gran parte del día entre 40 % y 60 % (Figura 12 B).

Estudios nacionales realizados por Dellacassa et al. (1994, 1997), determinaron que las condiciones meteorológicas, influyen en la composición de aceites. En el presente trabajo no se planteó el objetivo de evaluar el efecto de las variables ambientales en la producción de aceites, pero se registraron ambas variables. La evolución de la temperatura y de la humedad durante las fechas evaluadas, se consideraron dentro de las condiciones típicas de clima templado que caracterizan al país. No se presentaron fluctuaciones de estos parámetros que se puedan relacionar de forma directa con los rendimientos de aceite obtenidos. Las precipitaciones registradas durante la fase I de crecimiento del fruto promediaron los 100 mm por mes, lo que ascendió a 115 mm con el riego complementario. Durante la fase II, la suma de las precipitaciones y el riego promedió 67 mm mensuales, debido a menores valores desde febrero a abril. A partir mayo -fase III de crecimiento del fruto- y hasta la última cosecha, no se efectuó riego, registrándose en promedio 80 mm mensuales de precipitaciones. En un estudio realizado por van der Merwe (2005) en limón 'Eureka' en diferentes regiones de Sudáfrica, se determinó que el contenido de aceite era mayor en muestras provenientes de regiones áridas (secas y calientes), relacionado de forma positiva con la acumulación de unidades de calor. En este caso, las temperaturas máximas a las cuales se llegó, fueron por periodos cortos, no permitiendo establecer una relación causa-efecto con los contenidos de aceite extraídos. La reducción de la concentración de aceites a partir de la tercera fecha de cosecha, coincide con la disminución de la temperatura, que a su vez desencadena el cambio de color de los frutos cítricos (Mitalo et al., 2020). Sobre el final del experimento, cuando las temperaturas se incrementan, la concentración no aumenta.

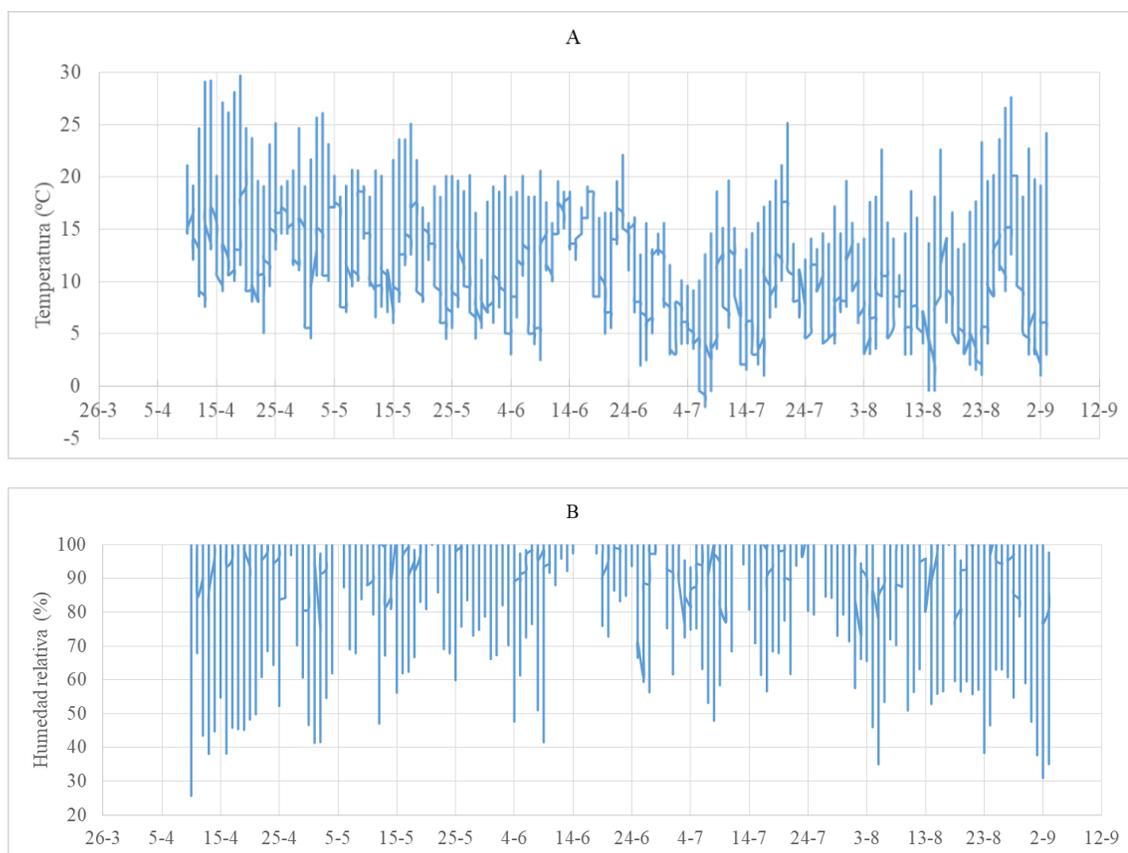


Figura 12. (A) temperatura diaria (°C) y (B) humedad relativa diaria (%) registrada en la copa de los árboles durante el período de evaluación

En síntesis, la concentración de aceites esenciales disminuyó fundamentalmente a partir de mediados de junio, asociado al cambio de color de los frutos. Los frutos de mayor tamaño presentaron menor concentración de aceites esenciales desde el inicio y ésta se mantuvo prácticamente constante. Sin embargo, el contenido de aceites obtenido por árbol permaneció prácticamente estable desde el inicio hasta el final del experimento, dado que las diferencias en la concentración se compensaron con el incremento en el tamaño de los frutos. Con estos resultados fue posible aprobar las dos primeras hipótesis planteadas, relacionadas al efecto del tamaño y maduración del fruto en la concentración de aceites esenciales y rechazar la tercera, que señalaba el aumento del contenido total de aceites esenciales por árbol durante el período en estudio.

La primera hipótesis señalaba el efecto del tamaño del fruto, hipótesis que se comprobó ya que se observó que los frutos de menor tamaño (calibres de 45-55mm)

presentaron durante todo el período de estudio, una mayor concentración de aceites esenciales con respecto a los demás calibres evaluados.

5. CONCLUSIONES

- El tamaño del fruto afectó negativamente la concentración de aceites esenciales, siendo mayor en los de menor tamaño, durante todo el período de estudio.
- El cambio de color, que determina el avance en la fase de maduración del fruto, mostró un efecto negativo en la concentración de aceites esenciales.
- El contenido de aceites esenciales por árbol no presentó diferencias significativas entre las fechas evaluadas, debido a que el incremento de frutos de mayor tamaño, que presentan menor concentración de aceites esenciales, fue compensado por el rendimiento, permitiendo establecer un amplio período de cosecha sin disminuciones en el rendimiento en aceite por árbol.

6. RESUMEN

La producción citrícola es el principal rubro hortifrutícola del país, destacándose las mandarinas, naranjas y limones como especies prioritarias. Dentro de esta última, el limón Criollo o tipo Lisbon es una de las variedades más plantadas. La producción de limones se destina al consumo en fresco o a la industria y dentro de ésta, se destaca la producción de aceites esenciales. El aceite esencial de limón es el más conocido y difundido, y ha logrado un interés y comercialización creciente en los últimos años. Existen muy pocos trabajos nacionales sobre la proporción y contenido de aceites esenciales en variedades cítricas, como también sobre las condiciones internas del cultivo (estado de desarrollo del fruto, genotipo, portainjerto) y externas (condiciones climáticas, métodos de extracción, entre otras) que inciden en su contenido. A nivel productivo es necesario determinar el estado de desarrollo del fruto que permita el mayor rendimiento en aceites esenciales por árbol, para poder definir el período óptimo de cosecha. Ante la falta de esta información en el país, se propuso la realización del presente trabajo, con los siguientes objetivos: 1) Determinar la concentración de aceites esenciales en frutos de limón Lisbon desde fines de la fase II y durante la fase III de crecimiento del fruto, 2) Determinar el efecto del tamaño del fruto en la concentración de aceites esenciales, 3) Determinar el efecto de la maduración del fruto en la concentración de aceites esenciales y 4) Establecer el período de cosecha que favorezca el mayor rendimiento de aceites esenciales por árbol. Para esto se evaluó el efecto de dos factores, fecha de cosecha y tamaño de frutos, en el contenido de aceites esenciales. Se evaluaron 7 fechas de cosecha desde 23/4 hasta 04/9, en las que se determinó la concentración de aceites esenciales en 4 rangos de tamaño de frutos. Los métodos de extracción utilizados fueron Scott y Clevenger. Adicionalmente se contabilizó el número y peso de frutos por estrato de tamaño por árbol y en una muestra de 15 frutos por estrato se determinó el color con colorímetro digital y cartilla comercial en cada una de las fechas. Se observó que aquellos frutos que presentaban menor tamaño (diámetro ecuatorial de 40-55 mm) la concentración de aceites esenciales fue mayor que en los demás tamaños evaluados (55-60, 60-65, > 65 mm). La concentración de aceites esenciales disminuyó con la fecha de cosecha, presentando una caída marcada a partir de 12/06, coincidiendo con el cambio de color de los frutos. El contenido total de aceites esenciales (kg por árbol) durante el período evaluado se mantuvo estable debido a que, a pesar de que la concentración de aceites del fruto disminuyó con la maduración, esto fue compensado por el aumento de tamaño de los frutos, lo que permite establecer un período amplio de cosecha sin perder rendimiento en aceites esenciales.

Palabra clave: Limón; ‘Lisbon’; Aceites esenciales; Fruto; Método; Maduración.

7. SUMMARY

The citrus production is the principal fruit and vegetable sector; mandarines, oranges and lemons can be emphasized as prioritized species. The Creole lemon or Lisbon is one of the most planted varieties. The production of lemon is used for fresh consumption or in the industry. We can stand out the production of essential oils. The essential oil of lemon is the most known, and it has got great interest and commercialization in the recent years. There are a few national works about the proportion and content of essential oils in cytric varieties, and also about the internal conditions of the fruit crop development, genotype, rootstock, and also about the external conditions (climatic, methods of extraction, among others) that have to do with its content. According to the productive level, it is necessary to decide the state of development of the fruit which lets the highest yield in essential oils per tree, therefore the best harvest period can be defined. Due to the lack of information in the country, this actual work was proposed having the following objectives: 1) To determine the concentration of essential oils in the fruit of Lisbon lemons from the end of the fase II, and during the fase III in the growing of the fruit. 2) To determine the effect of the size of the fruit in the concentration of essential oils. 3) To determine the effect of the maturation of the fruit in the concentration of essential oils. 4) To establish the harvest period that favors the best yield of essential oils per tree. To get this, the effects of the two factors: the date of harvest and the size of fruit in the content of essential oils were evaluated. Seven dates of harvest from 23/4 to 04/9, and the concentration of essential oils in four fruit size ranges were evaluated. The extraction methods used were Scott and Clevenger. Also the number and weight of the fruits per size stratum per tree and in a sample of fifteen fruits per stratum, the color with digital coloring and comercial card were determined on each of the dates. It could be observed that in those fruits that had a minor size (ecuatorial diameter of 40-55mm), the concentration of natural essences was major than in the other evaluated sizes (55- 60, 60 – 65 >65 mm). The concentration of natural essential oils decreased with the harvest date, which presented a marked fall from the 12/06, and it coincided with the change of the fruit color. The total content of essential oils (kg per tree) during the evaluated periods kept stable even though the concentration of oils of the fruit dismished with the maturation. All this was compensated with the increase of the size of the fruit, which lets to establish a wide period of harvest without losing performance in essential oils.

Keywords: Lemon; ‘Lisbon’; Essential oils; Fruit; Method; Maturation.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agustí, M.; Martínez-Fuentes, A.; Mesejo, C. 2002. Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*. 6 (2):1-16.
2. Albaladejo, M. Q. 1999. El aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. Murcia, España, Universidad de Murcia. Departamento de Tecnología de Alimentos Nutrición y Bromatología. 299 p.
3. Argote-Vega, F. E.; Suárez-Montenegro, Z. J.; Tobar-Delgado, M. E.; Pérez-Álvarez, J. A.; Hurtado-Benavides, A. M.; Delgado-Ospina, J. 2017. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 5 (2):52-60.
4. Babazadeh Darjazi, B. 2009. The effects of rootstock on the volatile flavor components of Page mandarin juice and peel. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 28 (2):99-111.
5. _____. 2011a. Comparison of volatile components of flower, leaf, peel and juice of Page mandarin. *African Journal of Biotechnology*. 10 (51):10437-10446.
6. _____. 2011b. A comparison of volatile components of flower of page mandarin obtained by ultrasound-assisted extraction and hydrodistillation. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(13):2840-2847.
7. _____. 2013. Comparison of peel oil components of grapefruit and lime (*Citrus* sp.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 6(12):840-847.
8. Bain, J. M. 1957. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Australian Journal of Botany*. 6 (1):1-23.
9. Bartholomew, E. T.; Sinclair, W. B. 1946a. Factors influencing the volatile oil content of the peel of immature and mature oranges. *Plant Physiology*. 21 (3):319-331.

10. _____.; _____. 1946b. Volatile oil content of the peel of oranges. *Journal California Citrograph*. 31:293-329.
11. Bitters, W. P.; Scora, R. W. 1970. The influence of citrus rootstocks upon the volatile rind oil content of Valencia orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Botanical Gazette*. 131 (2):105-109.
12. Borges, A.; Da Cunha Barros, M.; Pardo, E.; García, M.; Franco, J.; Gravina, A. 2009. Cuajado de frutos en tangor 'Ortanique' en respuesta a la polinización y a distintas situaciones de estrés ambiental. *Agrociencia (Uruguay)*. 8(1):7-18.
13. Cerruti, M.; Neumayer, F. 2004. Introducción a la obtención de aceites esenciales en limón. *Revista Invenio (Argentina)*. no. 12:149-155.
14. Chévez, H.; Coronado, A.; Espinoza, L. 2014. Determinación y comparación de propiedades físico-químicas de dos aceites de pino (*Pinus oocarpa Schiede* extraídos mediante la técnicas de soxhlet y clevenger). Tesis Lic. Químico. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 108 p.
15. Choi, H. S.; Sawamura, M. 2002. Effects of storage conditions on the composition of *Citrus tamurana* Hort. Ex Tanaka (Hyuganatsu) essential oil. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66 (2):439-443.
16. Clevenger, J. F. 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 17 (4):345-349.
17. Cotroneo, A.; Verzera, A.; Lamonica, G.; Dugo, G.; Licandro, G. 1986. On the genuineness of citrus essential oils. Part x. research on the composition of essential oil produced from sicilian lemons using 'Sfumatrice' extractors during the entire 1983/84 production season. *Flavour and Fragrance Journal*. 1:69-86.
18. Danila, E.; Moldovan, Z.; Popa, M.; Chifiriuc, M. C.; Kaya, M. A. 2018. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm efficacy of *C. limón* and *L. angustifolia* EOs and of their mixtures against *Staphylococcus epidermidis* clinical strains. *Industrial Crops & Products*. 122:483-492.
19. Davenport, T. L. 1990. Citrus flowering. *Horticultural Reviews*. 12:349-360.

20. Dellacassa, E.; Rossini, C.; Lorenzo, D.; Moyna, P.; Verzera, A.; Trozzi, A.; Dugo, G. 1994. Uruguayan Essential Oils Part III. Composition of the Volatile Fraction of Lemon Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*. 7:25-37.
21. _____.; Lorenzo, D.; Moyna, P.; Verzera, A.; Mondello, L.; Dugo, P. 1997. Uruguayan Essential Oils Part VI. Composition of lemon oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 12:247-255.
22. Di Vaio, C.; Graziani, G.; Gaspari, A.; Scaglione, G.; Nocerino, S.; Ritieni, A. 2010. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars. *Scientia Horticulturae*. 126:50-55.
23. Drescher, R. W.; Dennison, R. A. Kesterson, J. W. 1971. Yield of peel oil in lemons as related to budwood and rootstocks. *Florida Agricultural Experiment Stations Journal*. no. 4183:190-193.
24. Feliú, A. R. 1943. Análisis cuantitativo de las esencias del fruto de los agrios más cultivados en España. *Boletín del Instituto de Investigaciones Agrónomicas*. no. 33:162-191.
25. Espino, M.; Da Cunha Barros, M.; Arbiza, H. 2005. Estudio del comportamiento Fenológico-Reproductivo de Limón tipo 'Lisbon'. In: Congreso Argentino de Citricultura (5º., 2005, Concordia, Argentina). Trabajos presentados. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p.
26. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2019. Producción y comercio. (en línea). Roma. s.p. Consultado mar. 2020. Disponible en <http://fenix.fao.org/faostat/internal/es/?#data>.
27. Gambetta, G.; Martínez-Fuentes, A.; Bentancur, O.; Mesejo, C.; Reig, C.; Gravina, A.; Agustí, M. 2012. Hormonal and nutritional changes in the flavedo regulating rind color development in sweet orange (*Citrus sinensis* L.Osb.). *Plant Growth Regulation Journal*. 31:273-282.
28. Ghoorchibeigi, M.; Larijani, K.; Azar, P.; Zare, K.; Mehregan, I. 2017. Chemical composition and radical scavenging activity of citrus limón peel essential oil. *Oriental Journal of Chemistry*. 33(1):458-461.
29. Gok, A.; Kirbaslar, I. S.; Kirbaslar, G. F. 2015. Comparison of lemon oil composition after using different extraction methods. *Journal of Essential Oil Research*. 27 (1):17-22.

30. Goldschmidt, E. E.; Monselise, S. P. 1970. Hormonal control of flowering in citrus and some other Woody perennials. Rehovot, Israel, Hebrew University. Department of Citriculture. 758 p.
31. _____. 1988. Regulatory aspects of chloro-chromoplast interconversions in senescing citrus fruit peel. (en línea). Israel Journal of Botany. 37:123-130. Consultado mar. 2020. Disponible en 10.1080/0021213X.1988.10677092
32. Gravina, A. 1999. Ciclo fenológico-reproductivo en citrus: bases fisiológicas y manejo. Montevideo, Facultad de Agronomía. 55 p.
33. _____. 2014. Fisiología de citrus. Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 145 p.
34. Gross, J. 1981. Pigment changes in the flavedo of Dancy tangerine (*Citrus reticulata*) during ripening. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 103(5):451-457.
35. Guo, J.; Gao, Z.; Xia, J.; Ritenour, M.; Li, G.; Shan, Y. 2018. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. LWT-Food Science and Technology. 97:825-839.
36. Huff, A. 1983. Nutritional control of regreening and degreening in citrus peel segments. Plant Physiology. 73:243-249.
37. Iglesias, D. J.; Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E.; Talon, M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in Citrus trees. Tree Physiology. 23:199-204.
38. _____.; Cercós, M.; Colmenero-Flores, J. M.; Naranjo, M. A.; Ríos, G.; Carera, E.; Ruiz-Rivero, O.; Lliso, I.; Morillon, R.; Tadeo, F. R.; Talon, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. Brazilian Journal of Plant Physiology. 19(4):333-362.
39. Kealey, K. S.; Kinsella, J. E.; Nagy, S. 1979. Orange juice quality with an emphasis on flavor components. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 11(1):1-40.

40. Kesterson, J. W.; Hendrickson, R. 1958. Utilization of Citrus By-Products. *Botánica Económica*. 12 (2):164-185.
41. _____.; Braddock, J. 1975. Total peel oil content of the major Florida citrus cultivars. *Journal of Food Science*. 40(5):931 -33.
42. Kimball, D. A. 1999. Analyses of brix, soluble solids, acids, oils, and pulp. *In: Citrus processing*. 2nd. ed. Gaithersburg, Maryland, Chapman & Hall. pp. 191-246 (Chapman and Hall Food Science Book).
43. Kostadinović, S.; Stefova, M.; Nikolova, D.; Nedelcheva, D.; Martinez, N.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E.; Mirhosseini, H. 2010. Multivariate analysis discrimination of various cold-pressed lemon oils from different geographical regions. *Agriculture & Environment*. 8(2):132-136.
44. Lodge, N.; Paterson, V. J.; Young, H. 1984. The physico-chemical composition of New Zealand lemon oil. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 35:447-451.
45. Lovatt, C. J.; Zheng, Y.; Hake, K. D. 1988. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in citrus. *Israel Journal of Botany*. 37:181-188.
46. Manzi, M. 2011. Respuesta metabólica y reproductiva de dos variedades de cítricos bajo estrés hídrico. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 75 p.
47. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2021. Anuario estadístico agropecuario 2021. (en línea). Montevideo. 263 p. Consultado feb. 2021. Disponible en <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>
48. Misitano, V. 2000. Lemon Essential Oil: world production, extraction methods and trading. *Perfumer & Flavoris*. 2:29-42.
49. Mitalo, O.; Otsuki, T.; Okada, R.; Obitsu, S.; Masuda, K.; Hojo, Y.; Matsuura, T.; Mori, I.; Abe, D.; Asiche, W.; Akagi, T.; Kubo, Y.; Ushijama, K. 2020. Low temperature modulates natural peel degreening in lemon fruit independently of endogenous ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 71(16):4778-4796.

50. Muñoz-Fambuena, N; Mesejo, C.; Gonzáles-Mas, M. C.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. Iglesias, D. J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*. 108 (3):511-519.
51. _____.; _____.; _____.; Iglesias, D. J.; Primo-Millo, E.; Agustí, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by repressing CiFT gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31:529-536.
52. Nakajima, Y.; Susanto, S.; Hasegawa, K. 1993. Influence of water stress in autumn on flower induction and fruiting in young pomelo trees (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 62(1):15-20.
53. Poerwanto, R.; Inoue, H. 1990. Effects of air and soil temperatures on flower development and morphology of satsuma mandarin. *Journal of Horticultural Science*. 65(6):739-745.
54. Redd, J. B.; Hendrix, C. M.; Hendrix, D. L. 1986. Quality control manual for citrus processing plants book 1: regulations, citrus methodology, microbiology, conversion charts, tables, other. Lakeland, Intercit. 250 p.
55. Rivas, F.; Gravina, A.; Agustí, M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two citrus cultivars. *Tree Physiology*. 27:527-535.
56. Shahidi, F.; Zhong, Y. 2005. Citrus oils and essences. In: Shahidi, F. ed. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6th. ed. St. John's, Newfoundland, Canada, Memorial University of Newfoundland. pp. 49-66.
57. Sinclair, W. B. 1984. *The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits*. Oakland, University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. 975 p.
58. UNAM. FQ (Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, MX). 2014. Manual de prácticas para el laboratorio de Química Orgánica I (1311). (en línea). México. 77 p. Consultado 2 feb. 2020. Disponible en https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/11097/mod_resource/content/7/Manual%20completo.pdf

59. van der Merwe, H. E. 2005. Factors affecting rind oil content of lemon (*Citrus limón* (L.) Burm.f.). Thesis MSc. of Science in Agriculture. Stellenbosch, South Africa. University of Stellenbosch. 105 p.
60. Verreynne, J. S.; Lovatt, C. 2009. The Effect of Crop Load on Budbreak Influences Return Bloom in Alternate Bearing 'Pixie' Mandarin. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 134(3):299–307.