

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MANADARINA OBTENIDO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF MANDARIN ESSENTIAL OIL OBTAINED FROM AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES

CAROLINA NAVARRETE

Ingeniera Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, caronavarr@hotmail.com

JESUS GIL

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, jhgil@unal.edu.co

DIEGO DURANGO

Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, dldurango@unal.edu.co

CARLOS GARCIA

Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, cmgarcia@unal.edu.co

Recibido para revisar Octubre 2 de 2008, aceptado Julio 17 de 2009, versión final Julio 20 de 2009

RESUMEN: En los últimos años, la agroindustria de cítricos nacional ha mostrado un dinamismo significativo, originado por la expansión del mercado de los derivados de frutas. Esta actividad ha conllevado a la generación de una gran cantidad de residuos, los cuales tienen potencialidad como material de partida para la elaboración de productos comerciales con alto valor agregado como: aceites esenciales (AE), aceites fijos y fibras entre otros. Los AE tienen una importante demanda en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos. Este trabajo describe la extracción y caracterización del AE de mandarina obtenido, mediante arrastre con vapor, a partir de desechos agroindustriales. Se evaluó el efecto de la presión de vapor, el espesor y el número de capas del material vegetal, sobre el rendimiento y calidad del AE. Las condiciones de operación fueron ajustadas de acuerdo con las características de diseño de la planta de extracción de una industria local.

PALABRAS CLAVE: Cítricos, composición del aceite esencial, CG-EM, monoterpenos.

ABSTRACT: In recent years, citrus national agro-industries have shown a significant momentum, led by the market expansion of fruit derivatives. This activity has resulted in the generation of large amounts of waste, which could have a potential as starting material for the development of commercial products with high added value such as essential oils (EO), fixed oils, and fibres among others. The EO have a strong demand in the food industry, pharmaceuticals, and cosmetics. This paper describes the extraction and characterization of mandarin EO obtained through steam distillation, of agro-industrial waste. The effect of vapour pressure, thickness, and the number of layers of plant material, were evaluated on the yield and quality of EO. The operating conditions were adjusted in accordance to the design characteristics of the extraction plant of a local company.

KEYWORDS: Citrus, composition of essential oil, GC-MS, monoterpenes.

1. INTRODUCCIÓN

La protección del medio ambiente se ha convertido en un tema prioritario para los sectores gubernamental e industrial, por ello es importante lograr un aprovechamiento racional de los subproductos agroindustriales; el aprovechamiento racional de los materiales residuales puede brindar rendimientos económicos que pueden contribuir a minimizar los gastos que supone la gestión de residuos. Por lo tanto, es necesaria la realización de estudios que potencien el desarrollo de procesos tecnológicos económicos, eficaces y rentables, que incentiven la utilización de los desechos como una fuente de materias primas adecuadas para la obtención de productos de alto valor agregado.

En los últimos años, la agroindustria de cítricos en Colombia ha mostrado un crecimiento significativo, originado por la expansión del mercado de los derivados de frutas como jugos, concentrados, néctares y pulpas entre otros [1]. Los residuos generados durante el procesado de cítricos están constituidos por flavelos, alvedos, segmentos de membrana y semillas, que tienen potencialidad como material de partida para la elaboración de productos comerciales importantes; entre ellos son destacables los aceites esenciales (AE), aceites fijos, fibras, y pectinas. En particular, el epicarpio de los cítricos es una fuente importante de AE, los cuales están constituidos por compuestos volátiles (generalmente destilables por arrastre con vapor) que son responsables de los olores y sabores característicos de algunas plantas. Los AE de los cítricos (mandarina, limón, naranja y lima) tienen una demanda alta, principalmente en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos [2-3], y son utilizados en la preparación de aromatizantes, saborizantes, desinfectantes ambientales y en procesos de síntesis química [4-5].

Los AE de cítricos pueden ser extraídos mediante prensado en frío [6], hidrodestilación [7], fluidos supercríticos [8] e hidrodifusión con microondas y gravedad [9] entre otros. Tradicionalmente en algunos países, entre ellos Colombia, los AE son extraídos industrialmente mediante técnicas económicas viables como el prensado en frío o la destilación por arrastre de vapor. Los aceites

presentes en los sacos o glándulas, localizadas en el epicarpio del fruto, pueden ser removidos mecánicamente por prensado, obteniéndose una emulsión la cual es centrifugada hasta separar el aceite de la fase acuosa. Alternativamente, el AE puede ser obtenido mediante arrastre con vapor; durante este proceso las cortezas de los cítricos son expuestas a una corriente de vapor de agua con una temperatura cercana a los 100 °C que libera y evapora el aceite esencial. Luego, la mezcla de vapor de agua y el AE es condensada y separada en un recipiente conocido como “vaso florentino”.

Uno de los inconvenientes más significativos de la industria local, productora de AE de cítricos por destilación por arrastre de vapor, ha sido el bajo rendimiento obtenido durante el proceso de extracción. Por tanto, el objeto del presente trabajo fue: a) evaluar el efecto de la presión de vapor, el espesor, y el número de capas de material vegetal sobre el rendimiento en la extracción del AE de mandarina producido en una industria local a partir de desechos agroindustriales; b) caracterizar mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG-EM) el AE de mandarina, antes y después de seleccionar las mejores condiciones de operación de la planta de extracción.

2. MATERIALES Y METODOS

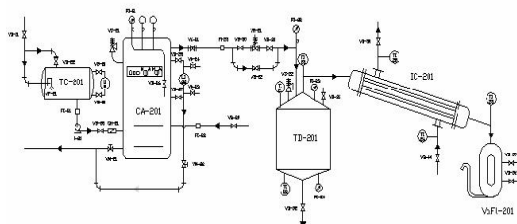
2.1 Materia prima

En la obtención de los AE se utilizó material vegetal proveniente de los desechos agroindustriales de diferentes compañías procesadoras de frutas, localizadas en la ciudad de Medellín (Productos al sol, Pomelos, Mimos, etc.). Por lo tanto, la materia prima no es homogénea en cuanto a la variedad de mandarina utilizada, estado de madurez, origen y condiciones físicas (por ejemplo, tamaño y color de la cáscara).

2.2 Equipo de extracción Y montaje de la planta

El equipo utilizado para la extracción de los AE está localizado en la compañía C.I

TECNACOL S.A y consta de las siguientes partes: caldera de vapor (rango de trabajo: 0 - 100 psi, 25 - 280 °C, superficie de calefacción: 130 pie², vapor: 690 lb/hora, capacidad: 20 BHP (caballos de fuerza), poder calorífico (ACPM): 138500 BTU/galón), tanque destilador, intercambiador de calor y vaso florentino (véase figura 1).



TC-201. Tanque de agua a la entrada de la caldera
 CA-201. Caldera
 TD-201. Tanque destilador
 IC-201. Condensador
 VF-201. Vaso florentino

Figura 1. Equipo de extracción de AE
Figure 1. Oil extraction equipment

2.3 Proceso de extracción

Para definir las variables críticas a evaluar durante el proceso de extracción con arrastre con vapor, se tuvo en cuenta: el “know how” de la compañía, la experiencia técnica del personal, la capacidad de la planta de extracción y los aspectos económicos que hicieran viable el mejoramiento del proceso.

Los pericarpios de mandarina previamente pesados se depositaron en el tanque extractor. En esta etapa se realizaron variaciones en cuanto al espesor de la capa (8 a 21 cm) y al número de capas (1 a 4). Una vez cerrado el tanque, se inició el proceso de extracción haciendo pasar el vapor de agua a diferente presión (0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 psi, medida dentro del tanque de extracción y referida a la fuerza del vapor del agua ejercida sobre un área de material vegetal). Seguidamente se realizó la condensación y separación de la mezcla agua/aceite en un separador de fases o vaso florentino y se calculó el rendimiento utilizando la ecuación (1).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Kg. Aceite obtenido}}{\text{Kg. Carga vegetal}} \times 100 \quad (1)$$

Por razones económicas y de disposición del material vegetal, los ensayos ejecutados bajo

diferentes condiciones de operación se realizaron por duplicado.

2.4 Empaque y almacenamiento

Los AE obtenidos se empaclaron en recipientes herméticos de vidrio oscuro para evitar degradaciones químicas por acción de la luz, el calor y el aire. El almacenamiento se llevó a cabo en un lugar fresco a temperaturas que no excedieran los 25 °C.

2.5 Caracterización química del aceite esencial

La caracterización química del AE se llevó a cabo mediante CG-EM. Los análisis cromatográficos se realizaron en un equipo Agilent modelo 6890 acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5973, utilizando una columna HP5-MS (0.25mm x 30m x 0.25µm) con temperatura máxima de 350 °C. Se inyectaron 0.2 µL de muestra disueltas en metanol en el modo Splitless. La temperatura del inyector fue de 230 °C. Se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo de 1,00 mL/min y una presión de 7.52 psi. Programa de operación: temperatura inicial: 50 °C durante 1.0 min, rampa de calentamiento 10 °C/min, temperatura final de 250 °C durante 3.0 min, temperatura del detector 280 °C en modo scan. Tiempo total de la corrida 25.0 min. El reconocimiento de los compuestos individuales se realizó mediante la comparación de los patrones de fraccionamiento de masas disponibles en la librería de compuestos NIST 2000. La composición relativa de los compuestos se estimó mediante el análisis de relación de áreas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación del espesor de la capa de material vegetal sobre el rendimiento

Para evaluar el efecto que el espesor de capa tiene sobre el rendimiento del proceso de extracción se dejó constante la presión (1.2 psi) y el número de capas (3 capas). Para encontrar el espesor de capa óptimo se realizaron evaluaciones en el rango de 8 a 21 cm. Los resultados encontrados se reportan en la tabla 1.

Tabla 1. Efecto del espesor de capa sobre el rendimiento de extracción a presión y número de capas constante.

Table 1. Effect of the thickness of layer on the yield of extraction with pressure and number of

Ensayo	Espesor de capa (cm)	Rendimiento (%)	Tiempo ^a (min)
1	8	0.30	35
2	9	0.30	40
3	10	0.29	35
4	11	0.29	40
5	12	0.29	45
6	13	0.20	45
7	14	0.14	45
8	16	0.13	45
9	18	0.08	50
10	20	0.08	50
11	21	0.08	50

layers constant.

^a El tiempo de extracción se midió en el momento en el cual, el espesor de la capa de aceite observado a la salida del vaso florentino permaneció constante. Se tomaron datos cada 5 minutos.

El espesor de material vegetal tuvo un efecto importante sobre el rendimiento de la extracción, permaneciendo constante a espesores comprendidos entre 8 y 12 cm; a valores superiores, hubo un decaimiento del rendimiento hasta del 72% (21 cm), lo cual es significativo para el proceso. Por tanto, con el fin de aprovechar al máximo la capacidad del equipo, se utilizó un espesor de capa máximo de 12 cm. El tiempo de operación del proceso se estimó en 45 minutos.

3.2 Evaluación de la presión de vapor de agua sobre el rendimiento

Para estimar el efecto de la presión de vapor sobre el rendimiento de extracción, se llevaron a cabo evaluaciones donde la presión se varió entre 0.6 y 1.8 psi. El espesor (12 cm) y el número de capas de material vegetal (3 capas) permanecieron constantes. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2. Efecto de la presión de vapor de agua sobre el rendimiento de la extracción.

Table 2. Effect of the vapour pressure of water on the yield of extraction.

Ensayo	Presión (psi)	Rendimiento (%)
1	0.6	0.06
2	0.9	0.15
3	1.2	0.28
4	1.5	0.11
5	1.8	0.04

Es de destacar que al incrementar la presión de vapor de 0.6 a 1.2 psi se aumentó drásticamente el rendimiento de la extracción (~466 %), con lo cual se podría inferir, que la presión influyó de manera favorable en el coeficiente de transferencia de masa desde el material vegetal hacia la fase de vapor. También es posible que a bajas presiones (0.6 - 0.9), no se alcance la fuerza suficiente para arrastrar el aceite esencial hacia el intercambiador de calor, presentándose así, condensaciones en el interior del tanque de extracción. Adicionalmente, los bajos rendimientos pueden ser atribuibles a que a estas presiones (0.6-0.9 psi) no se alcanzan a dilatar suficientemente las células del pericarpio del material vegetal que contienen el aceite esencial. Al aumentar la presión de 1.2 a 1.8 psi, el rendimiento disminuyó considerablemente (~86 %), lo cual pudo ser debido a una pérdida de aceite esencial a la atmósfera, ya que, a estas presiones (1.5-1.8 psi) se sobrepasó la capacidad de condensación del intercambiador de calor disponible. Se estableció como valor óptimo de presión 1.2 psi.

3.3 Efecto del número de capas sobre el rendimiento

De acuerdo con las características del equipo de extracción de la compañía, solo fue posible hacer variaciones del número de capas en el rango de 1 a 4. Se llevaron a cabo una serie de experimentos en donde permaneció constante el espesor de capa del material vegetal (12 cm) y la presión de vapor (1.2 psi). En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3. Variación del rendimiento de extracción de aceite esencial de mandarina respecto al número de capas.

Table 3. Variation of the yield of extraction of essential oil of mandarin regarding the number of layers.

Ensayo	Número de capas	Rendimiento (%)
1	1	0.22
2	2	0.30
3	3	0.29
7	4	0.16

Cuando se realizó la extracción de una sola capa de material vegetal se obtuvo un rendimiento menor en comparación con las evaluaciones hechas con dos y tres capas. Posiblemente, cuando se utiliza una sola capa cualquier pérdida de material volátil que se pueda producir, debido a que la transferencia de vapor encuentra poca resistencia para arrastrar los volátiles, influye significativamente sobre el cálculo del rendimiento. Cuando se incrementó el número de capas a 4, se observó una disminución en el rendimiento (~46 %). Esta reducción de la eficiencia de la extracción, pudo deberse a que se utilizó la capacidad máxima del equipo extractor, provocando una saturación del sistema que dificultó la transferencia de masa de los compuestos volátiles desde el material vegetal hacia la fase de vapor; y posiblemente, las capas superiores podrían actuar como barreras al vapor, al colisionar con estas, perdiendo energía y condensándose en el interior del extractor. Se recomendó utilizar un número de capas de tres con el fin de hacer uso de la máxima capacidad del equipo a la cual se observó un mayor rendimiento.

3.4 Composición química relativa del Aceite esencial de mandarina obtenido

La composición química de los aceites esenciales de mandarina se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para efectos comparativos, se analizó una muestra antes de ajustar los parámetros de extracción (AEM114) y otra después de los ajustes (AEM207).

3.4.1 Caracterización química del aceite esencial de mandarina previa a la estandarización del proceso de extracción

En la tabla 4 se presenta el perfil cromatográfico del AE de mandarina, obtenido previo a la estandarización de los parámetros de extracción y con un rendimiento del 0.07 %. El reconocimiento de los compuestos individuales se realizó mediante comparación de los espectros de masas reportados en la librería NIST-2000. Los resultados obtenidos están en concordancia con lo encontrado por otros autores [10-11], quienes reportan que el aceite esencial de estos cítricos está constituido principalmente por hidrocarburos alifáticos no oxigenados, siendo mayoritarios el limoneno (57.5 %), γ -terpineno (17.5 %), α - y β -pineno (17.7 %) y terpinoleno (2.0 %), e hidrocarburos oxigenados hallándose mayoritariamente el linalool (1.2 %), α -terpineol (1.2 %) y el antranilato de dimetilo (1.9 %).

Tabla 4. Composición relativa de los compuestos presentes en el aceite esencial de mandarina antes de la estandarización de la extracción.

Table 4. Relative composition in the essential oil of mandarin before standardization process

Pico N°	Tiempo de retención, t_R (min.)	Porcentaje total de cada pico (%)	Nombre
1	5.013	7.7	Alfa-pineno
2	5.685	10.0	(\pm) Beta-pineno
3	6.726	57.4	limoneno
4	7.075	17.5	Gamma-terpineno
5	7.430	2.0	terpinoleno
6	7.553	1.2	linalool
7	8.936	1.2	Alfa terpineol
8	12.070	1.9	Antranilato de dimetilo

Por otro lado, la relación de los diferentes componentes del aceite esencial de mandarina ha sido un parámetro importante para determinar el quimiotipo en muestras de mandarina de diferentes variedades, provenientes de Uruguay, Estados Unidos, Italia y Argentina entre otros [10]. Aunque en este estudio no es apropiado hacer una clasificación del aceite, de acuerdo a la

composición de estos dos metabolitos, dado que el material de partida era una mezcla de cultivares de mandarina, sí podemos decir que el aceite obtenido antes de la estandarización de los parámetros de extracción se asemeja a un aceite del quimiotipo limoneno/ γ -terpineno, donde el contenido de limoneno puede estar entre el 55.8 y 79.0 %, y el de γ -terpineno entre 0.1 y 19.0 %, de acuerdo con la clasificación establecida por Lota y colaboradores [12].

En el perfil cromatográfico presentado en la figura 2, es importante destacar la baja proporción de compuestos oxigenados (> 0.2 %), tales como el óxido de limoneno (t_R = 8.085 min), provenientes de la oxidación del compuesto mayoritario (limoneno), puesto que es un indicativo de que los procesos oxidativos deletéreos, que se pudieron haber presentado durante el proceso de extracción del aceite esencial, no fueron significativos (figura 2). La presencia de estos compuestos oxidados puede proporcionar a la muestra características organolépticas no deseables para su utilización como aditivo en la industria de los alimentos, de ahí la importancia de evitar su formación durante la extracción.

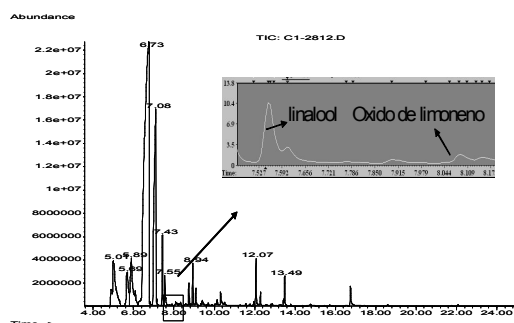


Figura 2. Reconocimiento del óxido de limoneno en el perfil cromatográfico del aceite esencial de mandarina (AEM114)

Figure 2. Recognition of limonene oxide in the chromatographic profile of mandarin essential oil (AEM114)

3.4.2 Caracterización química del aceite esencial de mandarina posterior a la estandarización del proceso de extracción

Después de llevar a cabo la estandarización del proceso de extracción se obtuvo un lote de AE con un rendimiento del 0.29 %. Desde el punto de vista de la eficiencia de producción, este resultado es relevante puesto que hubo un

incremento de más del 400 % en la obtención del producto. Sin embargo, es igualmente importante determinar las características químicas del producto final, con el fin de establecer los efectos que sobre la composición y calidad del producto pudieran tener los parámetros de extracción.

En la tabla 5 se presenta la composición relativa del lote (AEM207) del AE de mandarina obtenido después de estandarizar los parámetros de extracción. En comparación con AEM114, se observó un incremento en la composición de limoneno y linalool, y una disminución en la concentración de γ -terpineno y terpinoleno. La cantidad de los demás metabolitos permaneció relativamente constante. De acuerdo con esta composición, podría decirse que el aceite obtenido después de la estandarización de los parámetros de extracción conserva el quimiotipo limoneno/ γ -terpineno de acuerdo con la clasificación realizada por Lota [12].

Tabla 5. Composición relativa de los compuestos presentes en el aceite esencial de mandarina después de la estandarización de la extracción

Table 5. Relative composition in the essential oil of mandarin after standardization process

Pico N°	Tiempo de retención, t_R (min.)	Porcentaje total de cada pico, (%)	Nombre
1	5.013	4.4	Alfa-pineno
2	5.685	11.2	(\pm) Beta-pineno
4	6.758	70.8	Limoneno
5	7.036	8.3	Gamma-terpineno
6	7.424	0.9	terpinoleno
7	7.559	2.3	linalool
8	8.936	1.1	Alfa-terpineol
9	9.084	0.9	Decanal

Aunque la variación en la concentración de los metabolitos de los aceites obtenidos en este trabajo no debe asociarse a un efecto del proceso de extracción, puesto que no se caracterizó o clasificó el desecho agroindustrial de mandarina utilizado como materia prima, si se observó que ambos lotes de producción mostraron patrones cromatográficos similares, encontrándose

variaciones solo en el contenido cuantitativo. Los perfiles químicos obtenidos están en concordancia con los resultados reportados por otros autores [7,13], en donde la composición química de los AE de diferentes variedades de mandarina está constituida mayoritariamente por hidrocarburos monoterpénicos (95 %), como el limoneno, γ -terpineno, α -pineno y β -pineno, y en menor proporción por monoterpenos oxigenados como α -terpineol y linalool.

La estabilidad de los constituyentes químicos volátiles de los aceites esenciales durante la manipulación y el almacenamiento es un parámetro importante a tener en cuenta para su aplicación en alimentos, perfumería, fragancias y aromaterapia. Los aceites de cítricos son una mezcla compleja, la cual es generalmente lábil al calor y a las reacciones químicas [14]. En este sentido, es importante analizar los posibles cambios que en la composición pudo tener el aceite esencial de mandarina durante la extracción.

El aceite obtenido, bajo los parámetros de extracción que arrojaron el mejor rendimiento, al parecer no sufrió cambios importantes en la composición. El proceso de extracción posiblemente no influyó en la oxidación química de compuestos mayoritarios como el limoneno y el γ -terpineno. Al comparar los perfiles cromatográficos de los lotes de AE, obtenidos bajo diferentes parámetros de extracción (AEM114 Y AEM207), no se observó un cambio cualitativo o cuantitativo significativo respecto a artefactos, como el óxido de limoneno o hidróxidos del γ -terpineno, que podrían haberse generado por la exposición del aceite al aire y a las altas temperaturas durante el arrastre con vapor de agua.

4. CONCLUSIONES

Mediante la variación de parámetros de extracción como la presión, el número y espesor de capas de material vegetal, se logró incrementar significativamente el rendimiento del proceso de extracción del AE de mandarina, pasando del 0.07 al 0.29 %. Los valores de trabajo recomendados son: 3 capas de material, un espesor de capa de 12 cm, y una presión de vapor de agua de 1.2 psi.

Además de aprovecharse al máximo la capacidad del equipo y obtenerse un excelente rendimiento, se logró conservar adecuadamente las características químicas del producto final.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la compañía C.I TECNACOL SA por haber permitido la realización del trabajo de grado de la estudiante de Ingeniería Química, Navarrete C., en sus instalaciones.

REFERENCIAS

- [1] ESPINAL, C. F., MARTÍNEZ, H. J., PEÑA, Y. La cadena de cítricos en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia, documento de trabajo No. 107. Disponible :<http://www.agrocadenas.gov.co>. [Consultado agosto de 2008].
- [2] MATSUURA, R., UKEDA, H., SAWAMURA, M. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 2309-2313, 2006.
- [3] VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) Essential Oils. Food Control, 19, 1130-1138, 2008.
- [4] STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, R., PINZON, M.H., RAMÍREZ, J. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). Journal of Chromatography A, 752, 217-222, 1996.
- [5] GAMARRA, F. M. C., SAKANAKA, L. S., TAMBOURGI, E. B., CABRAL, F. A. Influence on the quality of essential lemon (*Citrus aurantifolia*) oil by distillation process.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, 23, 147–151, 2006.

[6] MERLE, H., MORON, M., BLAZQUEZ, M.A., BOIRA, H. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 491–497, 2004.

[7] BLANCO TIRADO, C., STASHENKO, E.E., COMBARIZA, M.Y., MARTINEZ, J.R. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697, 501-513, 1995.

[8] RAEISSI, S., DIAZ, S., ESPINOSA, S., PETERS, C.J., BRIGNOLE, E.A. Ethane as an alternative solvent for supercritical extraction of orange peel oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 45, 306–313, 2008.

[9] BOUSBIA, N., ABERT VIAN, M., FERHAT, M. A., MEKLATI, B. Y., CHEMAT, F. A new process for extraction of essential oil from citrus peels: microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of food Engineering*, 90, 409-413, 2009.

[10] LOTA, M-L., SERRA, D-L., TOMI, F., CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 61-78, 2000.

[11] VERZERA, A., TROZZI, A., COTRONEO, A., LORENZO, D., DELLACASSA, E. Uruguayan essential oil. 12. Composition of Nova and Satsuma mandarin oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2903-2909, 2000.

[12] LOTA, M-L., SERRA, D-L., TOMI, F., CASANOVA, J. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 77-104, 2001.

[13] FRIZZO, C. D., LORENZO, D., DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of Southern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3036-3041, 2004.

[14] NJOROGE, S. M., UKEDA, H., AWAMURA, M. Changes of the volatile profile and artifact formation in Daidai (*Citrus aurantium*) cold-pressed peel oil on storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4029-4035, 2003.