



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**EFFECTO EN LA VIDA ÚTIL DE
ACEITE DE OLIVA VIRGEN POR
MEDIO DE OXIDACIÓN FORZADA
PARA TRES VARIEDADES
DIFERENTES.**

Alumno/a: Dulce María Rogel Estrada,

Tutor/a: Prof. Dña. Adoración Mozas Moral
Dpto: Organización de Empresas, Marketing Y
Sociología

Director: Prof. D. Gabriel Beltrán Maza
Centro: IFAPA Venta Del Llano, Mengíbar.

Julio, 2018



EFFECTO EN LA VIDA UTIL DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN POR MEDIO DE OXIDACIÓN FORZADA PARA TRES VARIEDADES DIFERENTES. Esta memoria constituye el Trabajo Fin de Máster y se presenta a la Comisión Evaluadora en Jaén a 05 de 07 del año 2018.

Fdo. Dulce Maria Rogel Estrada

Dña. ADORACIÓN MOZAS MORAL, COORDINADORA Y PROFESOR TITULAR DEL MASTER DE ACEITE DE OLIVA Y OLIVAR UNIVERSIDAD DE JAÉN.

Como **TUTOR** de D. Dulce Maria Rogel Estrada, en el Máster Universitario en Olivar, Aceite de Oliva y Salud, durante el curso 2017-2018

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, *EFFECTO EN LA VIDA UTIL DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN POR MEDIO DE OXIDACIÓN FORZADA PARA TRES VARIEDADES DIFERENTES*, ha sido realizado en los Laboratorios del Centro de investigación IFAPA VENTA DE LLANO, por la Ingeniero Dña. Dulce Maria Rogel Estrada, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar, Aceite de Oliva y Salud por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de D. BELTRAN MAZA GABRIEL INVESTIGADOR TITULAR DEL CENTRO IFAPA VENTA DEL LLANO.

Jaén, Julio 2018

Fdo.: D. Gabriel Beltran Maza

AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento a los apoyos recibidos por parte del personal y para el uso de sus instalaciones y equipos del Instituto De Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Por el apoyo y capacitación recibida en el centro por parte de Gabriel Beltrán y por parte de Gloria, a mis compañeros del Master y a los Profesores; y todas las personas que amablemente compartieron sus conocimientos, consejos y apoyo durante mi estancia en España y en especial en Jaén.

A mis padres por su apoyo y comprensión en esta experiencia, por animarme a cumplir mis objetivos en cualquier parte del Mundo, a mis hermanos por su apoyo incondicional incluso estando lejos y a todas las personas que de algún modo u otro contribuyeron de alguna forma para lograr objetivo.

INDICE GENERAL

1	RESUMEN Y ABSTRACT.....	9
2	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	11
3	ANTECEDENTES.....	14
3.1	CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	15
3.1.1	Fracción mayoritaria.....	15
3.1.1.1	Trigliceridos.....	15
3.1.1.2	Ácidos grasos.....	16
3.1.1.3	Mono y diglicéridos.....	16
3.1.1.4	Ácidos grasos libres.....	17
3.1.1.5	Fosfolípidos.....	17
3.1.1.6	Ceras.....	17
3.1.2	Componentes Minoritarios.....	17
3.1.2.1	Hidrocarburos.....	18
3.1.2.2	Alcoholes grasos y alcoholes diterpenos.....	18
3.1.2.3	Tocoferoles.....	18
3.1.2.4	Esteroles.....	18
3.1.2.5	Compuestos fenólicos.....	19
3.1.2.6	Pigmentos.....	19
3.1.2.7	Compuestos volátiles.....	20
3.2	TIPOS DE ACEITE DE OLIVA.....	21
3.2.1	Aceite De Oliva Virgen Extra.....	21
3.2.2	Aceite De Oliva Virgen.....	21
3.2.3	Aceite De Oliva Lampante.....	21
3.2.4	Aceite De Oliva Refinado.....	22
3.2.5	Aceite De Oliva.....	22
3.2.6	Aceite De Orujo Crudo.....	22
3.2.7	Aceite De Orujo Refinado.....	22
3.2.8	Aceite De Orujo De Oliva.....	22
3.3	PROCESO DE OXIDACIÓN.....	22
3.3.1	Autooxidación.....	23
3.3.2	Oxidación Fotosensible.....	24
3.3.3	Productos De Oxidación.....	25

3.4 MÉTODOS DE MEDIDA O ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE OLIVA.....	26
3.5 ANTIOXIDANTES.....	27
3.6 PARADOJA POLAR.....	28
4 MATERIAL Y METODOS.....	30
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
4.1.1 ‘Picual’	31
4.1.1.1 Características Agronómicas.....	31
4.1.1.2 Sensibilidad A Plagas Y Estrés Hídrico.....	32
4.1.1.3 Zona De Distribución.....	32
4.1.1.4 Características Del Aceite.....	32
4.1.2 ‘Hojiblanca’	32
4.1.2.1 Características Agronómicas.....	32
4.1.2.2 Sensibilidad A Plagas Y Estrés Hídrico.....	33
4.1.2.3 Zona De Distribución.....	33
4.1.2.4 Características Del Aceite.....	33
4.1.3 ‘Blanqueta’	34
4.1.3.1 Características Agronómicas.....	34
4.1.3.2 Sensibilidad A Plagas Y Estrés Hídrico.....	34
4.1.3.3 Zona De Distribución.....	35
4.1.3.4 Características Del Aceite.....	35
4.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE.....	36
4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
4.3.1 Relación superficie/volumen de las muestras.....	36
4.3.2 Toma de las muestras y periodicidad.....	37
4.4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	38
4.4.1 Determinaciones de Calidad.....	38
4.4.1.1 Grado de acidez.....	38
4.1.1.2 Índice de peróxidos.....	39
4.1.1.3 Absorbancia UV K232 y K270.....	41
4.4.2 Determinaciones de Composición	41
4.4.2.1 Compuestos Volátiles y Aromáticos.....	42
4.4.2.2 Pigmentos.....	43
4.4.2.3 Tocoferoles.....	44

4.4.2.4 Amargor K225.....	45
4.4.2.5 Polifenoles Totales.....	46
4.4.2.6 Polifenoles Cualitativos.....	47
4.4.2.7 Ácidos Grasos.....	48
5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
5.1 GRADO DE ACIDEZ.....	51
5.2 ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	53
5.3 ABSORBANCIA UV K232 Y K270.....	54
5.4 COMPUESTOS VOLÁTILES Y AROMÁTICOS.....	55
5.5 PIGMENTOS.....	61
5.6 TOCOFEROLES.....	62
5.7 AMARGOR K225.....	65
5.8 POLIFENOLES TOTALES.....	67
5.9 POLIFENOLES CUALITATIVOS.....	69
5.10 ÁCIDOS GRASOS.....	74
6 CONCLUSIONES.....	78
7 NOMENCLATURA.....	81
8 BIBLIOGRAFÍA	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Contenido de ácidos grasos en el aceite de oliva.	16
Tabla 3.2 Compuestos volátiles encontrado en el aceite de oliva.	20
Tabla 5.1 Variación en índice de acidez para las tres variedades durante el tratamiento térmico	53
Tabla 5.2 Variación del perfil de volátiles de las variedades ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´ evaluadas durante los 4 tiempos.....	59
Tabla 5.3 Variación del contenido de tocoferoles (alfa, beta y gamma) para las variedades analizadas, ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´, con relación al tiempo de oxidación.....	64
Tabla 5.4 Variación del índice de amargor K225 para las variedades analizadas, ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´, con relación al tiempo de oxidación.....	65

Tabla 5.5 Compuestos fenólicos contenidos en las tres variedades analizadas y su variación durante el tratamiento térmico.....	72
Tabla 5.6 Variación en ácidos grasos para las tres variedades durante el tratamiento térmico.....	74

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1 Mecanismo de auto oxidación.	25
FIGURA 3.2 Ruta general de la formación de productos secundarios de oxidación.	26
FIGURA 3.3 Principales polifenoles presentes en el aceite de oliva.....	28
FIGURA 4.1 Cortes Variedad ´ Picual ´	31
FIGURA 4.2 Cortes Variedad ´Hojiblanca´	32
FIGURA 4.3 Cortes Variedad ´Blanqueta´	34
FIGURA 4.4 Muestras con la relación espacio de cabeza.....	37
FIGURA 4.5 Esquema del número de muestras y periodicidad para su análisis.....	38
FIGURA 5.1 Variación de acidez en las variedades ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´,	51
FIGURA 5.2 Variación de índice de peróxidos en las variedades ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´	53
FIGURA 5.3 Variación en el índice de absorbancia 232 (oxidación primaria) en las variedades ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´	54
FIGURA 5.4 Variación en el índice de absorbancia 270 (oxidación secundaria) en las variedades ´Blanqueta´, ´Hojiblanca´ y ´Picual´	55
FIGURA 5.5 Variación del perfil de volátiles de la variedad ´Blanqueta´ evaluada durante los 4 tiempos.....	56
FIGURA 5.6 Variación del perfil de volátiles de la variedad ´Hojiblanca´ evaluada durante los 4 tiempos.....	57
FIGURA 5.7 Variación del perfil de volátiles de la variedad ´Picual´ evaluada durante los 4 tiempos.....	57
FIGURA 5.8 Variación del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides de los aceites durante el ensayo de oxidación forzada.....	61

FIGURA 5.9 Evolución del contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Blanqueta'	62
FIGURA 5.10 Evolución del contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Hojiblanca'	62
FIGURA 5.11 Evolución del contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Picual'	63
FIGURA 5.12 Variación en el índice de absorbancia 225 nm (Amargor) en las variedades analizadas 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual'	65
FIGURA 5.13 Variación del contenido de polifenoles totales en las tres variedades analizadas con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.	68
FIGURA 5.14 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad 'Blanqueta', con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.....	69
FIGURA 5.15 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad 'Hojiblanca', con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.....	70
FIGURA 5.16 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad 'Picual', con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.....	71
FIGURA 5.17 Variación en ácidos grasos para la variedad 'Blanqueta' durante el tratamiento térmico.....	75
FIGURA 5.18 Variación en ácidos grasos para la variedad 'Hojiblanca' durante el tratamiento térmico.....	75
FIGURA 5.19 Variación en ácidos grasos para la variedad 'Picual' durante el tratamiento térmico.....	76

1. RESUMEN

La información sobre el la relación tiempo-temperatura de almacenamiento en los alimentos no es solo de importancia comercial y económica también es de gran significancia en la salud humana, muchos productores e investigadores consideran que 12-18 meses son el periodo máximo comercial para el consumo de los aceites envasados dependiendo de las variedades.

Sin embargo, no se ha podido determinar el tiempo de vida útil del aceite de oliva virgen extra, en el presente trabajo se pretende establecer un protocolo para la estimación de la vida útil.

La resistencia oxidativa está relacionada con el desarrollo de la ranciedad la cual podría depender de la oxidación de los ácidos grasos (Goncalves *et. al*, 2018). Y el contenido de antioxidantes como los compuestos fenólicos, estos se encuentran presentes inicialmente en el AOVE y forman una compleja mezcla de diferentes clases (alcoholes simples y alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos y flavonas) (Lozano *et al.* ,2013).

En base a lo anterior se realizó el estudio de los índices de oxidación primaria y secundaria (K232 Y K270) mediante un diseño experimental de oxidación forzada con una relación superficie/volumen (botellas de vidrio de 250 mL, con un radio interno de 5.5 cm, con 36.9 g de aceite ,para un área de contacto de 23.74 cm²) evitando la disponibilidad de oxígeno para el proceso de autooxidación, y en oscuridad; y la caracterización de los perfiles de compuestos fenólicos y ácidos grasos y así obtener las bases para un modelo predictivo para la vida útil en los aceites de oliva virgen extra.

ABSTRACT

Information on the time-temperature relationship of storage in food is not only of commercial and economic importance is also of great significance in human health, many producers and researchers consider that 12-18 months are the maximum commercial period for consumption of packaged oils depending on the varieties.

However, it has not been possible to determine the useful life of the extra virgin olive oil, in the present work we intend to establish a protocol for the estimation of the useful life.

Oxidative resistance is related to the development of rancidity which could depend on the oxidation of fatty acids (Goncalves et al., 2018). And the content of antioxidants such as phenolic compounds, these are present initially in the EVOO and form a complex mixture of different classes (simple alcohols and phenolic alcohols, secoiridoids, lignans and flavones) (Lozano et al., 2013).

Based on the above, the study of the primary and secondary oxidation rates (K232 and K270) was carried out using an experimental design of forced oxidation with a surface / volume ratio (glass bottles of 250 mL, with an internal ratio of 5.5 cm , with 36.9 g of oil, for a contact area of 23.74 cm²) avoiding the availability of oxygen for the autooxidation process, and in darkness; and the characterization of the profiles of phenolic compounds and fatty acids and in this way to obtain the bases for a predictive model for the useful life in extra virgin olive oils.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Para los consumidores, una de las características más importantes en el Aceite de oliva virgen es la frescura, ya que la frescura se asocia típicamente con la alta calidad y garantiza la seguridad alimentaria. El término vida útil comúnmente se hace referencia a la determinación de frescura que está dentro del rango de aceptabilidad del consumidor; específicamente, en el aceite de oliva virgen extra la vida útil podría definirse como el periodo de tiempo en condiciones normales de almacenamiento dentro del cual no hay defectos organolépticos y los parámetros químicos de calidad están dentro de los límites aceptados en la normativa para esta categoría comercial.

Los consumidores confían en la vida útil de las determinaciones para diferenciar entre productos que son aptos para su consumo y los que no lo son, y es obligatorio para la industria del aceite de oliva controlar todos los parámetros de calidad en la producción para poder proporcionar información fiable sobre la vida útil de este, teniendo en cuenta los cambios de temperatura, luz y exposición durante el transporte y las actividades comerciales (Li & Wang, 2018).

En este sentido, la única medida analítica que se ha utilizado para predecir el tiempo de conservación del aceite de oliva virgen es la medida de la estabilidad oxidativa mediante Rancimat, que bajo condiciones de oxidación forzada permite tener una estimación del tiempo necesario para que al aceite alcance la rancidez. Sin embargo, se ha descrito que no da la información necesaria para la estimación de la vida útil ya que no determina el punto en el que el aceite no cumple las características sensoriales y los parámetros de calidad establecidos en la reglamentación. El tiempo de inducción se correspondería con el estado oxidativo muy avanzado muy por encima de los límites establecidos en la reglamentación específica del aceite de oliva.

En general en el aceite de oliva no se lleva a cabo un análisis de la vida útil. Se suele indicar en la etiqueta un consumo preferente de entre 12 y 18 meses de forma genérica, sin que este periodo de tiempo se base en los datos analíticos o experimentales ya que se emplean de forma indistinta sin tener en cuenta la composición del aceite.

El coeficiente entre los compuestos fenólicos y sus derivados formados por la hidrólisis /oxidación puede ser utilizada para determinar la frescura: relación envejecimiento del aceite de oliva virgen (Bendini *et al.* ,2009 citado en Lozano-Sánchez *et. al* ,2013).

Ante la carencia de datos sobre la vida útil de los aceites de oliva vírgenes y como puede afectar su composición en función de la variedad, se han planteado los siguientes objetivos:

- Se pretende establecer bases para el estudio de la vida útil de los aceites virgen extra en condiciones de oxidación forzada.
- Medir los efectos en los parámetros de calidad y composición en aceite de oliva virgen extra de tres variedades con diferente composición ´Hojiblanca´, ´Blanqueta´ y ´Picual´ sometidos a una oxidación forzada a 60 °C.

3. ANTECEDENTES

3.1 CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

El aceite de oliva virgen es obtenido de olivas recogidas en su estado de maduración adecuado y libres de cualquier tipo de daño por manipulación o plagas que, además, debe ser obtenido únicamente por procesos físicos. La presencia natural de compuestos antioxidantes como tocoferoles y otros compuestos minoritarios como compuestos fenólicos con acción antioxidante son los responsables de las principales características del aceite virgen extra, lo cual le da una ventaja en comparación con otros aceites vegetales que también los poseen naturalmente, pero en contenidos menores o en su caso, son removidos durante los procesos de refinación de estos aceites (Rizzo *et al.* 2014 citado en Stoll *et al.* 2016).

Composición, el aceite de oliva comprende:

- Fracción mayoritaria de la cual Triglicéridos representan el 97-99% y ácidos grasos libres, fosfolípidos y ceras el 1-3%.
- Componentes minoritarios (hidrocarburos, alcoholes grasos, alcoholes diterpenos, tocoferoles, esteroides, compuestos fenólicos, pigmentos y compuestos volátiles).

3.1.1 Fracción Mayoritaria

3.1.1.1 Triglicéridos

Están constituidos principalmente por ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) una proporción menor de ácidos grasos polinsaturados (linoleico y α -linolénico) y una fracción mínima de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y una molécula de glicerol que es un alcohol de cadena corta con tres carbonos que sirve como puente de unión entre los tres ácidos grasos y el enlace éster.

3.1.1.2 Ácidos Grasos

Algunos ácidos grasos tienen dobles enlaces que se derivan de la eliminación de dos átomos de hidrogeno, cuando esto sucede se denominan insaturados y el ácido insaturado más importante en el aceite de oliva es el ácido oleico siendo el que en mayor proporción se encuentra (Peri, 2014).

Tabla 3.1 Contenido de ácidos grasos en el aceite de oliva.

Ácidos Graso	Nomenclatura	Porcentaje en los Aceites de Oliva Vírgenes Codex	Porcentaje en los Aceites de Oliva Vírgenes EU
<i>Mirístico</i>	<i>C 14:0</i>	0,0-0,05	≤0,03
<i>Palmítico</i>	<i>C 16:0</i>	7,5-20,0	7,50-20,0
<i>Palmitoleico</i>	<i>C 16:1</i>	0,3-3,5	0,30-3,50
<i>Margárico</i>	<i>C 17:0</i>	0,0-0,3	≤0,40
<i>Margaroleico</i>	<i>C 17:1</i>	0,0-0,3	≤0,60
<i>Esteárico</i>	<i>C 18:0</i>	0,5-5,0	0,50-5,00
<i>Oleico</i>	<i>C 18:1</i>	55,0-83,0	55,0-83,00
<i>Linoleico</i>	<i>C 18: 2</i>	3,5-21,0	2,50-21,00
<i>Linolénico</i>	<i>C 18:3</i>	**	≤1,00
<i>Aráquico</i>	<i>C 20:0</i>	0,0-0,6	≤0,60
<i>Eicosenoico</i>	<i>C 20:1</i>	0,0-0,4	≤0,50
<i>Behénico</i>	<i>C 22:0</i>	0,0-0,2	≤0,20
<i>Lignocérico</i>	<i>C 24:0</i>	0,0-0,2	≤0,20

** no se establecen límites.

Fuente: elaboración propia de acuerdo a los datos obtenidos del reglamento de Codex Alimentarius y la legislación Europea.

3.1.1.3 Mono y Diglicéridos

Son compuestos que se generan mayormente durante la hidrólisis de los triglicéridos y por la biosíntesis incompleta, los 1-2 diglicéridos son los generados durante la biogénesis incompleta y los 1-3 diglicéridos

por la hidrólisis del aceite y representan una fracción de entre el 1 y 2% de la fracción.

3.1.1.4 Ácidos Grasos Libres

Son los ácidos grasos que han sido liberados del enlace de glicerol durante la hidrólisis del aceite lo cual permite saber cuál es el grado de degradación del aceite ya que estos son los compuestos que determina el índice de acidez.

3.1.1.5 Fosfolípidos

El contenido en fosfolípidos es mayor en el aceite de oliva fresco, entre 40-150 ppm; cuando el aceite tiene un mayor tiempo de almacenamiento estos disminuyen. Los principales fosfolípidos que podemos encontrar son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (Boskou,1996).

3.1.1.6 Ceras

Constituidos por ésteres de alcoholes grasos con ácidos grasos, en el aceite de oliva el contenido es bajo no excediendo los 35 mg/100 mg las ceras más detectadas en aceite de oliva son C36, C38, C40, C42, C44 y C46 (Boskou,1996); según el reglamento europeo el contenido de ceras en aceite virgen de C42, C44 y C46 debe ser inferior a 150 ppm (Reglamento 2568/91(2016)). Estas se encuentran principalmente en las pieles de los frutos para evitar pérdidas de agua en el mesocarpio formando una capa impermeable.

3.1.2 Componentes Minoritarios

Constituidos por una mezcla de sustancias polares, no polares y anfifílicas: hidrocarburos, tocoferoles, compuestos fenólicos, esteroides, clorofilas, carotenoides, ácidos terpenicos, monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres y otros compuestos volátiles.

3.1.2.1 Hidrocarburos

Son compuestos orgánicos que están formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, el mayor hidrocarburo en el aceite de oliva es el escualeno, es un triterpeno hidrocarbonado que tiene un efecto antioxidante y que reacciona con los radicales libres de oxígeno y con las especies oxígeno -reactivas, tiene un efecto protector en la piel de los rayos UV, y también tiene efectos estimulantes en el sistema inmune.

El aceite de oliva virgen contiene entre 200-700 mg de escualeno por 100 g de aceite, cuando se refina pierde hasta un 25 % (Peri, 2014).

3.1.2.2 Alcoholes Grasos y Alcoholes Diterpenicos

Son compuestos minoritarios que permiten una diferenciación de los diferentes tipos de aceite, principalmente se encuentran en el aceite de oliva el doconasol, tetracosanol, hexaconasol y octaconasol, no suelen exceder de 35 mg/100 g de aceite.

Existen dos diterpenoides acíclicos en la fracción aislada del aceite de oliva son el fitol probablemente proveniente de la clorofila y geranilgeraniol no sobrepasan los 120-180 ppm la concentración de fitol en el aceite de oliva (Boskou,1996).

3.1.2.3 Tocoferoles

Son alcoholes solubles en g.asa conocidos como la vitamina E, especialmente el alfa tocoferol, que es un importante antioxidante, el alfa tocoferol es el único capaz de interceptar a los radicales libres y prevenir las principales reacciones de la destrucción de las membranas celulares. También protege a la LDL de la oxidación. El aceite de oliva virgen puede contener de 150 a 250 mg/kg de alfa tocoferol (Boskou,1996).

3.1.2.4 Esteroles

Son alcoholes insaturados y son los que menor presencia tienen en los lípidos y grasas vegetales por lo que su presencia permite establecer el origen del aceite vegetal del que se trate y se utiliza para detectar

adulteraciones. El β -sitoesterol representa entre un 90- 95 % de la fracción en aceite de oliva virgen extra, mientras que el colesterol se encuentra ausente (Boskou,1996).

3.1.2.5 Compuestos Fenólicos

Entre los más importantes se encuentran el 5-*hidroxitirosol*, y su éster de ácido elenólico junto con la oleuropeína, compuestos exclusivos del aceite de oliva.

La oleuropeína es un metabolito del hidroxitirosol que tiene un potente efecto antioxidante y antiinflamatorio, otro compuesto presente en menor proporción es el ácido cafeico, ácido vanílico y ferúlico que tiene un efecto protector como el α -tocoferol y lignanos, una clase de fenoles con efecto protector contra el cáncer de colon y pulmón.

En recientes estudios a los polifenoles se les atribuye efectos de actividad antioxidante directa, actividad de protección de α -tocoferol y favorece los enlaces iónicos para la formación de radicales, inhibición de agregación de plaquetas, reducción de los niveles de colesterol en plasma, inhibición de la oxidación de los LDL, incremento de la actividad inmune, antialérgica y de protección en la piel (Boskou,1996).

3.1.2.6 Pigmentos

El color verde de los aceites de oliva es debido a las clorofilas, estas son moléculas muy sensibles a la luz, por lo que una pérdida de color verde muy rápida es indicadora de las condiciones de almacenamiento y se requiere un cuidado especial para mantener el color un mayor tiempo posible.

Los carotenos son los responsables de la coloración amarilla entre ellos los de mayor importancia son la luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina. Al igual que las clorofilas tienen un decrecimiento durante los periodos de almacenamiento en condiciones no resguardadas de la luz y calor (Boskou,1996).

3.1.2.7 Compuestos Volátiles

Los compuestos volátiles identificados en los aceites de oliva son un conjunto de compuestos que dan las notas de olor a los aceites y son una gama de compuestos como aldehídos, alcoholes, ésteres, hidrocarburos, cetonas, furanos entre otros. Unos de los responsables del olor a hierba verde es el *hexanal*, el característico verde amargo es el *trans- 2- hexanal* y el responsable de la sensación a banano, *1- hexanol* y el dulce afrutado *3-metilbutano-1* que es el principal compuesto volátil en el aceite de oliva. Otros compuestos en menor proporción son los responsables de las características notas de los aceites los cuales están directamente relacionados con los diferentes tipos de variedades y zonas de cultivo. Éstos son los compuestos más apreciados por el aspecto culinario (Peri, 2014). En la Tabla 3.2 se muestra para cada volátil la sensación organoléptica que origina.

Tabla 3.2 Compuestos volátiles encontrado en el aceite de oliva.

Tipo de compuesto	Nombre del compuesto volátil	Sensación
Alcohol	<i>Hexanol</i>	<i>Fruta, plátano</i>
	<i>Etanol</i>	<i>Alcohol</i>
	<i>Butanol</i>	<i>Avinado</i>
	<i>Cis-3 -hexanol</i>	<i>Verde</i>
	<i>Pentanol</i>	<i>Balsámico</i>
	<i>2-metil butanol</i>	<i>Avinado</i>
	<i>3- metil butanol</i>	<i>Dulce frutado</i>
	<i>Trasn -2 -hexanol</i>	<i>Hierba verde, hojas</i>
Aldehído	<i>Acetaldehído</i>	<i>Picante dulce</i>
	<i>Metanal</i>	
	<i>2 -metil- butanal</i>	<i>Malta</i>
	<i>3 -metil- butanal</i>	<i>Malta</i>
	<i>Pentanal</i>	<i>Madera, amargo,aceitoso</i>
	<i>Hexanal</i>	<i>Verde</i>
	<i>Benzaldehído</i>	
Cetonas	<i>Butanona</i>	<i>Éter, frutado</i>

Esteres	<i>Pentona</i>	<i>Éter, frutado</i>
	<i>Heptona</i>	<i>Verde picante</i>
	<i>Etilacetato</i>	<i>Dulce</i>
	<i>Etíl propionato</i>	<i>Frutado intenso</i>
	<i>Metil butanato</i>	<i>Frutado</i>
Éter	<i>Metoxibenzeno</i>	
Fenoles	<i>1-2 dimetoxibenzeno</i>	
	<i>Fenil etanol</i>	
Ácidos	<i>Guaiaacol</i>	<i>Fenólico, quemado</i>
	<i>Ácido acético</i>	<i>Vinagrado</i>

Fuente: Elaboración propia en base (Boskou,1996).

3.2.1 Calidad y Tipos de aceites de oliva

La legislación en la Unión Europea en el reglamento 2568/91 (2016) , Anexo 1 establece ocho categorías en el aceite de oliva:

3.2.1.1 Aceite de oliva virgen extra: representa la más alta categoría y máxima calidad, se obtiene directamente de aceitunas en buen estado y únicamente por procesos físicos, con un perfil organoléptico cuya mediana de defecto es igual a cero y la mediana de frutado es mayor a 0 y cuyo porcentaje de acidez es menor a 0.8.

3.2.1.2 Aceite de oliva virgen: los métodos de preparación son los mismo que el virgen extra solo que en este caso los limites ara acidez y defecto son más altos siendo el límite superior para acidez 2.0 y la mediana del defecto menor a 3.5.

3.2.1.3 Aceite de oliva lampante: cuando el aceite de oliva sobrepasa los límites máximos de acidez y la mediana de los defectos supera el 3.5 el aceite se vuelve no apto para el consumo humano y requiere ser refinado para su consumo.

3.2.1.4 **Aceite de oliva refinado:** es el aceite obtenido de la refinación de un aceite “lampante” cuyo índice de acidez es menor al 0.3 debido a que ha sido neutralizado químicamente pero no posee ningún tipo de olor o sabor por lo que requiere ser mezclado con aceite de oliva virgen extra.

3.2.1.5 **Aceite de oliva:** consiste en una mezcla de aceite de oliva que ha sido refinado por que presentaba defectos y no era apto para el consumo humano por lo que al ser tratado químicamente en la refinación ya no puede ser llamado “virgen” y una porción de entre 10 y 20 % de aceite virgen extra para aportarle color y sabor y cuya acidez no debe superar el 1.0.

3.2.1.6 **Aceite de orujo de oliva crudo:** es el producto obtenido de la extracción química o física de los orujos provenientes de la molturación de la aceituna que no ha sido refinado y, por lo tanto, no puede ser consumido.

3.2.1.7 **Aceite de orujo de oliva refinado:** es el producto refinado obtenido de los orujos procedentes de la molturación de la aceituna cuyo porcentaje de acidez debe ser menor a 0.3 puesto que al ser tratado químicamente y realizado una neutralización el porcentaje de ácidos libres es mínimo.

3.2.1.8 **Aceite de orujo de oliva:** es la mezcla de los aceites de orujo de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes cuya acidez debe ser menor a 1,0.

3.3 PROCESO DE OXIDACIÓN DE LIPIDOS

La oxidación lipídica concierne tanto a productores como a consumidores porque no solo altera los atributos de calidad del aceite de oliva como su vida útil, la apariencia y sabor, sino que también decrece su valor nutricional y biológico (Krinchene *et al.*, 2015).

Los principales factores de riesgo en la degradación oxidativa de los aceites (Peri, 2014) son:

- Abuso en la temperatura: durante el proceso de extracción y a posteriori, durante el proceso de transporte y almacenamiento; se han realizado estudios donde se ha observado que en temperaturas mayores a 14- 16 °C se aceleran las reacciones de degradación con consecuencia importantes para la calidad del aceite de oliva estas temperaturas son considerablemente superadas durante el proceso, transporte y almacenamiento.
- Exposición al oxígeno: durante los procesos de batido y a posteriori, la presencia de aire en el espacio de cabeza en los contenedores de aceite ya sea durante en el almacenamiento pre envasado o después de este sin la utilización de atmósferas protectoras como inyección de nitrógeno u otros gases inertes.
- Exposición a la luz: debido a la foto-oxidación que se lleva a cabo en los pigmentos fotosensibles como la clorofila y carotenos aceleran el fenómeno de oxidación en los aceites.

Muchos estudios están focalizados en la posible degradación oxidativa e hidrolítica de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra durante su almacenamiento para poder entender las rutas y diferentes condiciones de estrés a las que pueden ser sometidos.

Las reacciones de oxidación tienen diferentes rutas de generación de acuerdo a los compuestos que las catalizan. Boskou (1996) define las reacciones de oxidación en los siguientes tipos:

3.3.1 Autooxidación: la reacción que se lleva a cabo entre los lípidos y el oxígeno es una reacción en la cadena de radicales libres que consta de tres etapas que son la iniciación, propagación y terminación donde:

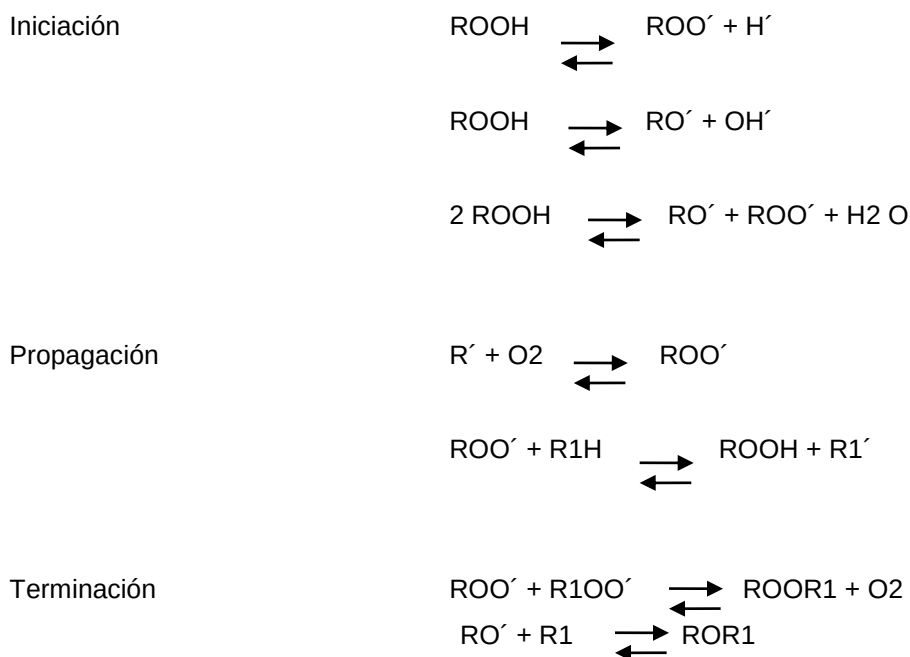


FIGURA 3.1 Mecanismo de auto oxidación.

Fuente: Boskou,1996.

En la Figura 3.1 se observa que el mayor proceso de iniciación involucra la descomposición de los hidroperóxidos, siendo que la formación de un hidroperóxido con la molécula de oxígeno en estado triplete es improbable debido a que la cantidad de energía que se requiere es mucho mayor. Una vez formados los hidroperóxidos las reacciones de iniciación son más fáciles, pueden formarse durante la etapa de propagación cuando el oxígeno en estado excitado reacciona con una molécula de lípidos por acción de enzimas catalizadoras y metales como catalizadores.

La transmisión de metales como el hierro o cobre también pueden catalizar la descomposición de los hidroperóxidos cuya reacción va acompañada de la formación de radicales libres, la oxidación de las moléculas con uno o más enlaces resulta en la formación de compuestos que afectan la estabilidad y las características organolépticas.

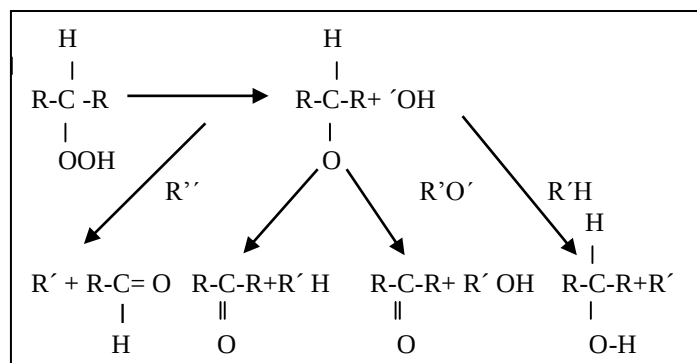


FIGURA 3.2 Ruta general de la formación de productos secundarios de oxidación

Fuente: Boskou,1996.

3.3.2 Oxidación Fotosensible: los pigmentos existentes en los aceites vegetales son considerados sensibilizantes para la foto-oxidación como las clorofilas, porfirinas y flavinas absorbiendo luz en la región visible. Cuando este exceso de energía se transfiere a la molécula de oxígeno, este se excita produciendo reacciones con la molécula lipidica y un hidroperóxido es formado; esta reacción no puede ser prevenida ni retrasada por la adición de antioxidantes.

Esta reacción es proporcional al contenido de clorofilas del aceite de oliva, se han realizado varios estudios donde se ha analizado el efecto del α -tocoferol y β -caroteno, donde las clorofilas y feofitinas actúan como promotores de oxidación en los aceites de oliva y se observó que el β -caroteno reduce el radio de oxidación mientras que el α -tocoferol en presencia de clorofilas tiene un efecto pro-oxidante. Ambos son destruidos mucho más rápido en presencia de clorofilas actuando los productos de la foto-oxidación de β -caroteno como prooxidantes en la oscuridad (Boskou,1996).

3.3.3 Productos De Autooxidación:

La rancidez es asociada con la presencia de ciertos productos de oxidación como el 2- *pentanal*, *hexanal*, *heptenal*, *heptanal*, *2-octanal* y con predominación del *octanal* y *nonanal*.

Los aldehídos insaturados que resultan de la peroxidación de lípidos de acilo pueden someterse a una autooxidación rápida de los ácidos grasos

insaturados de los que se derivan así es como el *2,4-decacienal*, *hexanal* y *2-octenal* pueden formarse.

3.4 MÉTODOS DE MEDIDA O ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE OLIVA

Los factores químicos y físicos que pueden ser utilizados para incrementar las reacciones de oxidación lipídica son la temperatura, inyección oxígeno, catálisis metálica, inyección de oxígeno en presión parcial, agitación, etc. La temperatura la que es mayormente utilizada para acelerar el proceso de oxidación, y se utiliza en aquellos métodos empleados para estimar la estabilidad oxidativa del producto o el tiempo de inducción para el periodo de autooxidación en tiempos relativamente periodos cortos (Frankel,1998 citado en Gómez-Alonso, 2004).

Esta metodología se ha empleado recientemente (Lerma-García, 2009) citado en Lozano-Sánchez *et al.* (2013) realizaron un estudio de almacenamiento para aceite de oliva virgen extra en condiciones de 60 °C por 7 semanas, Valli *et al.* (2010) citado en Lozano-Sánchez *et al.* (2013) sometieron a muestras de aceite de oliva virgen extra a tratamiento de calor con un horno convencional para evaluar el efecto de diferentes tipos de envases en la calidad del aceite con respecto al tiempo. Ambos trabajos permitieron tener información sobre la valoración de las características del aceite durante su almacenamiento en un tiempo significativamente menor gracias a la utilización de temperaturas de 60 °C.

Establecer las condiciones para una prueba de vida útil acelerada (ASLT) no es una tarea fácil, desde el hecho que se debe conocer cuáles son las condiciones que pueden incrementar el grado de oxidación y las determinaciones analíticas para el seguimiento del progreso de la reacción, preferentemente midiendo tanto los productos de oxidación primaria como secundaria.

En el caso del aceite de oliva virgen extra el EU (2568/91 (2016), Anexo 1) establece los valores límites para los diferentes índices de oxidación (índice de peróxidos ≤ 20 meq /kg; K_{232} 2.50 y K_{270} 0.22) los cuales pueden ser empleados para establecer los puntos finales para el estudio de vida útil acelerada. Pero el paso más difícil es el de correlacionar el periodo de inducción obtenido en condiciones

aceleradas para la vida útil del producto alimenticio en términos del periodo máximo de almacenamiento (Gómez-Alonso *et al.* 2004).

Gómez-Alonso *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre la reacción de autooxidación de los triacilgliceroles en aceites de oliva almacenados en la oscuridad con rangos de temperaturas de 25-75 °C para medir los rangos de formación de hidroperóxidos y la descomposición de sus productos en ausencia de compuestos antioxidantes y pro-oxidantes para evitar efectos contradictorios.

Mancebo-Campos *et al.* (2008) realizó un estudio de aceleración de la oxidación con rangos de temperatura entre 40-60 °C con almacenamiento en oscuridad para medir la estabilidad oxidativa y estimar la potencial vida útil de este. Observaron que es posible establecer una prueba de estabilidad oxidativa que permita determinar la potencial vida útil por debajo de las condiciones normales de almacenamiento de los aceites de oliva virgen extra.

3.5 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes pueden prevenir o retrasar el proceso de oxidación al eliminar los radicales libres, inactivando peróxidos y otras especies de oxígeno reactivo o inhibiendo las enzimas prooxidativas entre otros (Shahidi & Zhong, 2007 citado en Stoll *et al.*, 2016).

La estabilidad oxidativa de los aceites de oliva está relacionada con la influencia que tiene los compuestos fenólicos como el hidroxitirosol, oleuropeína y el tirosol como antioxidantes junto con la vitamina E presentes en este.

Varios estudios realizados en el aceite de oliva apuntan a la actividad de barrido que presentan los compuestos fenólicos contra el anión superóxido y los hidroperóxidos con capacidad de prevenir la generación de especies reactivas de oxígeno de ahí la función antioxidante de los compuestos fenólicos que a diferencia del α -tocoferol y el β -caroteno no se ven bloqueadas por el efecto que las clorofilas ejercen en estos (Boskou, 2006).



Fuente: Boskou,2006

3.6 PARADOJA POLAR

La teoría de la paradoja polar afirma que los antioxidantes polares ,hidrofílicos o afílicos con valores elevados del parámetro conocido como balance hidrófilo-lipófilo (HLB: hydrophylic-lipophylic balance) son más efectivos en los sistemas lipídicos de baja relación superficie /volumen (lípidos de fase continua como gases y aceites) mientras que en los pocos polares lipofílicos o con bajo valor de HLB son más efectivos en sistemas con la relación superficie/volumen (emulsiones, micelas y membranas) (Porter,1980 citado en Velasco *et al.*, 2002). Posteriormente se observó que la descarboxilación o esterificación de Trolox C (un ácido carboxílico derivado del α -tocoferol: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametil-2-cromanocarboxílico) con su respectiva disminución de polaridad, aumentaba su actividad en emulsión y la disminución en aceite continuo (Cort *et al.* citado en Velasco *et al.*, 2002), así mismo para los tocoferoles se ha encontrado que la efectividad relativa en emulsión y liposomas ($\alpha > \beta > \gamma > \delta$), que corresponde a su potencia como vitamina *in vivo*, es inversa a la encontrada en fase continua (Cillard & Cillard, 1980; Fukuzawa *et al.*, 1982 citado en Velasco *et al.*, 2002) el efecto de la paradoja polar es más pronunciado en series homólogas.

Frankel *et al.* (citado en Velasco *et al.* 2002) han realizado varios estudios sobre esta afinidad entre los antioxidantes hacia las interfases aire-aceite en fase continua y agua-aceite en emulsión, de esta forma que los antioxidantes más hidrofílicos

serían más efectivos por concentrarse en la interfase aire-aceite mientras que los lipofílicos serían menos protectores por permanecer en la fase oleosa. En cambio, en los lipofílicos se orienta a la fase agua/aceite gracias a su actividad tensoactiva y serían más protectores que los hidrofílicos, que se disolverán y diluirán en la fase acuosa.

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

En este trabajo se han utilizado tres variedades en función de la composición del aceite previamente descrita: 'Picual', 'Hojiblanca' y 'Blanqueta' procedentes de la finca experimental del centro IFAPA Mengíbar Venta del Llano de la campaña 17-18 las cuales fueron recogidas en el mes de Diciembre.

4.1.1 'Picual'

4.1.1.1 Características Agronómicas

Este árbol es de vigoroso porte y de fácil cultivo, es muy productivo y poco vecero, aunque no es muy resistente a los terrenos calizos; sin embargo, se considera una variedad auto fértil, se multiplica con facilidad mediante estacas semileñosas, tiene un tiempo de maduración medio de 41 días. Con olivas de entrada precoz de 3,2 g de peso, con un elevado contenido en oleico y rendimiento g aso entre el 21 y 25 %.



© Universidad de Córdoba

FIGURA 4.1 Cortes Variedad ' Picual '
Fuente: Aceites de Oliva España, Universidad de Córdoba.

4.1.1.2 Sensibilidad a Plagas y Estrés Hídrico

Es reconocida por su resistencia a las heladas y humedad, aunque no es muy resistente a prolongadas sequías; es tolerante a la tuberculosis, pero muy sensible al repilo y a la cochinilla, la mosca y a la verticilosis.

4.1.1.3 Zona De Distribución

Representa la variedad con más extensión de cultivo en la comunidad Andaluza principalmente en las provincias de Jaén, Granada y Córdoba, recibe este nombre por el apéndice en forma de pico.

4.1.1.4 Características Del Aceite

Es mundialmente reconocida como una de las variedades con mayor contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes además de un alto contenido de clorofilas.

Además de un característico afrutado amargo y picante, atributos positivos en la evaluación sensorial para la clasificación de los aceites virgen extra debido a su alto contenido de oleuropeína responsable del amargo e hidroxitirosol cuyo retrogusto picante se ve altamente potenciado por su alto contenido (Ávila, 2000).

4.1.2 'Hojiblanca'

4.1.2.1 Características Agronómicas

Recibe este nombre por la coloración del envés de la hoja del olivo se encuentra entre las variedades con más contenido de polifenoles, pero por debajo de la variedad picual además que es menos estable, además tiene un doble aprovechamiento para almazara y para mesa; tiene uno de los tiempos de maduración más rápidos 28 días, es tempranera y tiene gran resistencia al desprendimiento.



© Universidad de Córdoba

FIGURA 4.2 Cortes de variedad ´ Hojiblanca ´

Fuente: Aceites de Oliva España, Universidad de Córdoba.

4.1.2.2 Sensibilidad a Plagas y Estrés Hídrico

Tiene una resistencia media alta a las heladas y se adapta a los terrenos calizos, es muy susceptible al ataque de repilo, de la tuberculosis, de la mosca y del verticilosis.

4.1.2.3 Zona de distribución

Es particularmente cosechada en zonas de Sevilla, el sur de Córdoba y norte de Málaga, aproximadamente 220 000 ha.

4.1.2.4 Características del aceite

Obteniendo unos aceites menos astringentes más suaves de afrutado como almendra y al ser alto el contenido de carotenos le da una coloración más amarilla.

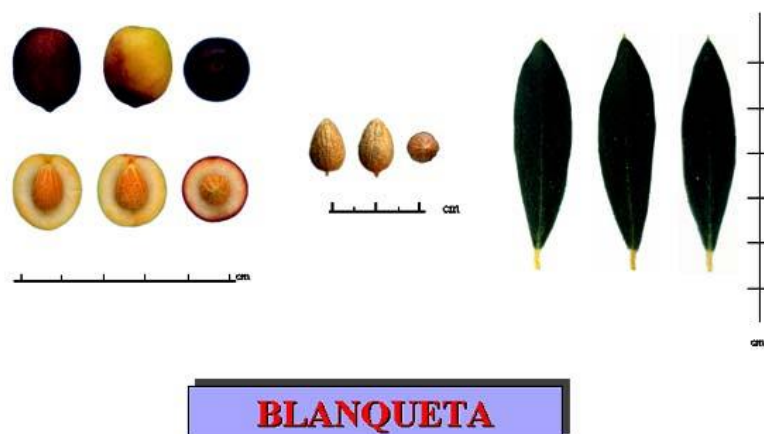
4.1.3 ´ Blanqueta ´

4.1 .3.1 Características Agronómicas

Árbol de tamaño medio, poco vigoroso, de porte erguido, y media densidad de copa, de aspecto blanco grisáceo, con hoja pequeña de forma elíptico-lanceolada mate en el brillo del haz y verde oscuro en el color del haz; la inflorescencia ofrece una estructura corta y compacta,

con flores supernumerarias presentes y pequeñas, del grosor de los botones. El fruto de tamaño medio-pequeño (1,8-2,3 g), de color rojo-vinoso virando a negro en la completa madurez, esferoidal, de sección circular, aparece en racimos; hueso pequeño, ovoidal, liso, de ápice redondeado, con mucrón, y base apuntada, dándole un aspecto abombillado (Íñiguez,1999).

Es la una de las variedades valencianas más productiva. Entra precozmente en producción 3 años aprox. de capacidad rizogena alta, siendo esta muy regular. De maduración media-tardía y escalonada (Avila,2000).



BLANQUETA

FIGURA 4.3 Cortes de la variedad´ Blanqueta ´.

Fuente: <https://valencia.slowfood.es/alimentos/oli-de-blanqueta-de-muro-dalcoil/>

4.1.3.2 Sensibilidad a Plagas y Estrés Hídrico

Sensible a repilo (*Spilocaea oleagina*), tuberculosis, (*Pseudomonas syringae* pv.*savastanoi*), caparreta, (*Saissetia olea* Bern.) y mosca (*Bactrocera oleae* Gmel.).

Se debe realizar una recolección temprana para evitar las heladas, a que es muy sensible el fruto, el árbol sin embargo es resistente. Fruto con una fuerza de retención elevada que dificulta la recolección

mecanizada. Su resistencia a sequia es menor que la media (Íñiguez,1999).

4.1.3.3 Zona de distribución

La variedad blanqueta es autóctona de la comunidad Valenciana, se cultiva principalmente en la Foia de Castalla, El Comtat, La Valla D´Albaida y La Canal de Navarres.

En Cataluña se introdujo a principios del siglo XX ocupando 150 ha aproximadamente de cultivo (Granados,2000).

4.1.3.4 Características del aceite

A partir de la cual se obtienen aceites amarillo verdoso con un contenido medio bajo de ácido oleico al igual que su estabilidad es media baja, las características organolépticas de este aceite son de afrutado fresco como alcachofa, hojas, almendras y plátano y un amargo y picante de intensidad media.

Rendimiento g aso muy alto, llegando a superar el 50% sobre materia seca, y de 21-24% sobre materia natural o fresca (Íñiguez,1999).

Es la una de las variedades valencianas más productiva. Entra precozmente en producción, siendo esta muy regular. De maduración media-tardía y escalonada.

Es autóctona de la comunidad valenciana, se cultiva principalmente en la Foia de Castalla, El Comtat, La Valla D´Albaida y La Canal de Navarres.

Rendimiento g aso muy alto, llegando a superar el 50% sobre materia seca, y de 21-24% sobre materia natural o fresca (Íñiguez,1999). A partir de la cual se obtienen aceites amarillo verdoso con un contenido medio bajo de ácidos oleico al igual que su estabilidad es media baja, las características organolépticas de este aceite son de afrutado fresco como alcachofa, hojas, almendras y plátano y un amargo y picante de intensidad media.

4.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE

La extracción del aceite se realizó a través del sistema ABENCOR (Martínez *et al.*,1975) constituido por un molino de martillo donde se obtiene una pasta homogenizada inmediatamente; y posteriormente un batido a 27 °C durante 30 min., para su posterior centrifugación a 3500 r.p.m. El aceite es recogido junto con el agua de vegetación en probetas graduadas hasta su decantación, se filtró y almacenó a 24 °C hasta su análisis en frascos de vidrio de 1 L con tapa de rosca en los que el espacio de cabeza se redujo al mínimo volumen posible. El espacio de cabeza se ocupó con nitrógeno.

4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

4.3.1 Relación Superficie / Volumen de las muestras

Las muestras se envasaron en botellas vidrio transparente de 125 mL, con un radio interno de 5.5 cm, la cantidad de aceite por cada muestra fue 36.9 g medidos en báscula de precisión de ± 0.001 g de tal forma que el área de contacto con la atmosfera (espacio de cabeza figura 4.4) fuese de 23.74 cm² y así limitar la disponibilidad de oxígeno para el proceso de autooxidación (Krichene *et al.*,2015).

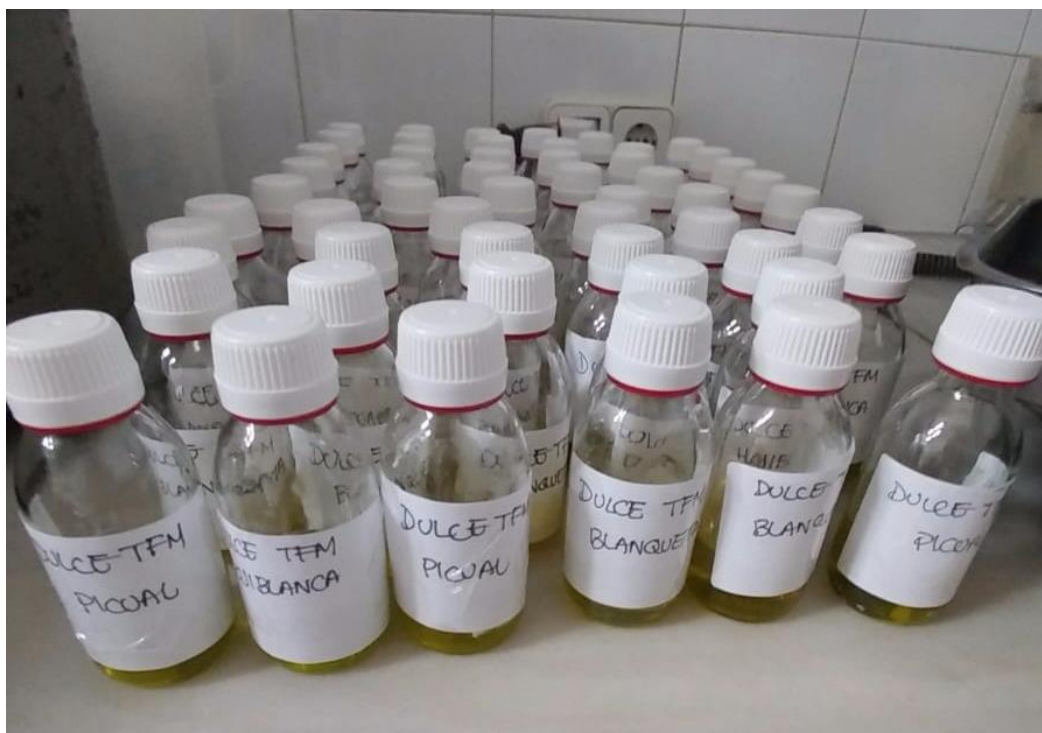


FIGURA 4.4 Muestras en envases de 250 mL para la relación de espacio de cabeza descrita.

Fuente: Foto tomada en el laboratorio IFAPA Venta del Llano, Mengíbar.

4.3.2 Toma de muestras y periodicidad

De los aceites de las tres variedades almacenados, se obtuvieron 18 muestras por variedad en frascos de vidrio con tapa de rosca, las cuales se colocaron en la estufa Marca Binder Mod. FD115-230V programada a 60 °C. Las muestras fueron rotadas de manera aleatoria 1 vez por semana para evitar cualquier efecto de la posición en la estufa. Con una periodicidad de 2 semanas se retiraron 3 envases de cada variedad que fueron seleccionados al azar del conjunto. En la Figura 4.5 se muestra cómo se repartieron las muestras para su análisis.

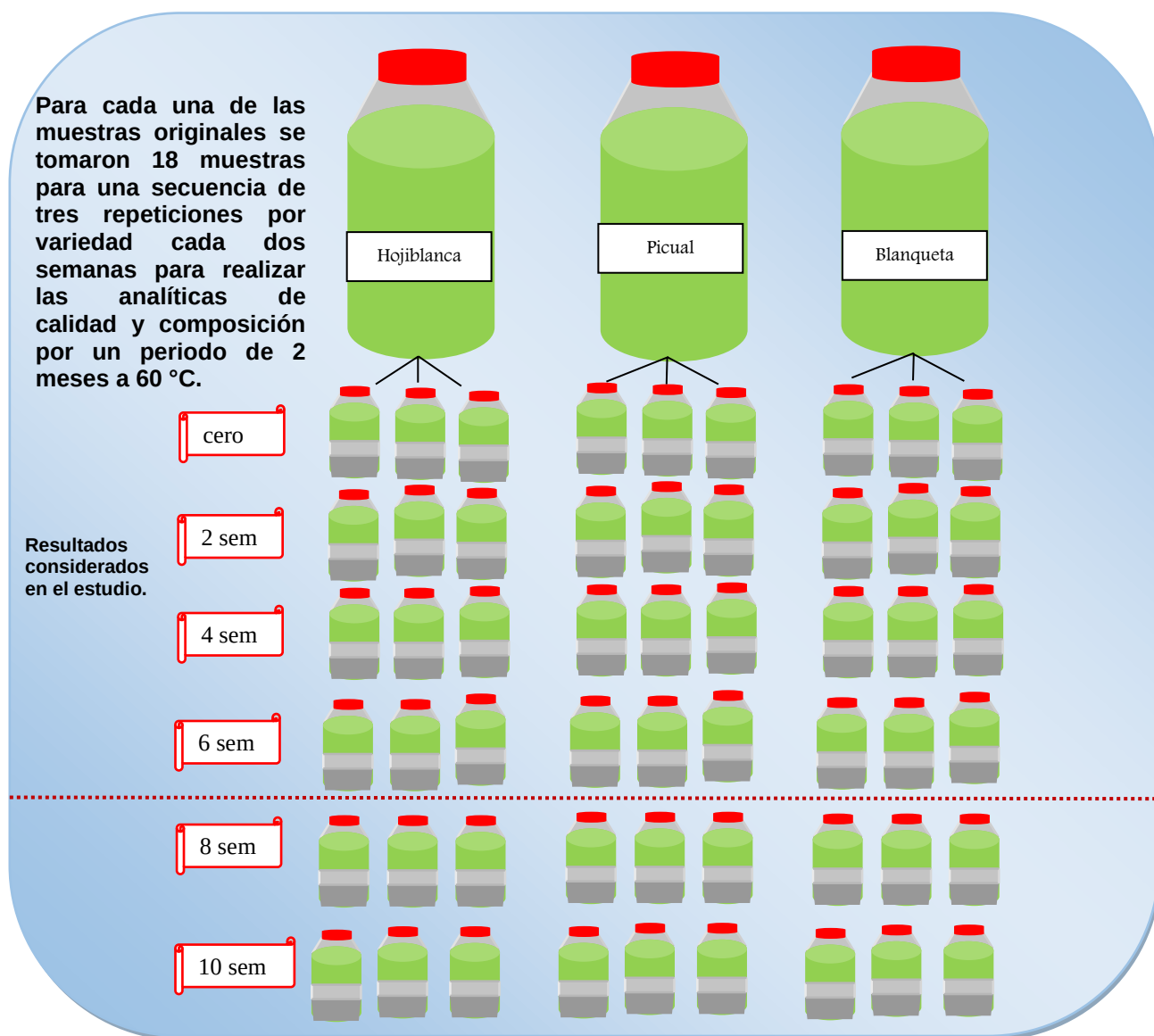


FIGURA 4.5 Esquema del número de muestras y periodicidad para su análisis.
Fuente: Elaboración propia.

4.4 DETERMINACIONES ANALITICAS

4.4.1 Determinaciones De Calidad

4.4.1.1 Grado de acidez

Se expresa como la cantidad de ácidos grasos libres, determinados mediante una valoración ácido-base con una solución de KOH y

fenolftaleína como indicador, y etanol/éter etílico 1:1 como disolvente, todos los agentes utilizados son de grado analítico Panreac.

a) Valoración del Hidróxido Potásico

En un matraz de 10° mL se colocan 10 mL tomado con pipeta de rosca de ácido oxálico de la marca Panreac y se añadieron 3 gotas de fenolftaleína y se procedió a valorar el KOH.

b) Valoración de La Muestras

De las muestras obtenidas se utilizó un cero para cada variedad y posteriormente se realizó la medición para cada una de las series de muestras sometidas al calor se pesaron 5 g de cada muestra y se añadió 50 mL de la mezcla etanol éter, agitando hasta disolver la g asa y se añade la fenolftaleína, valorando hasta que se obtiene una coloración naranja pálida a rosa. Anotando la cantidad gasta para los cálculos correspondientes.

$$\text{grado de acidez} = \frac{V_{KOH \text{ GASTADO}} \times N_{KOH} \times 28,2}{P_{ACEITE}}$$

Donde:

VKOH GASTADO= volumen de hidróxido de potásico

NKOH= normalidad del hidróxido potásico

28,2= peso molecular del ácido oleico

P ACEITE= peso del aceite

Los resultados se expresaron en % de ácido oleico libre.

4.4.1.2 Índice de Peróxidos

Productos de oxidación primaria en los aceites ,indica el grado de conservación del mismo y se representa como meq del oxígeno activo por Kg de muestra ya que su formación es por la función del oxígeno absorbido cuya velocidad es determinada por otros factores como la luz, calor y otros catalizadores orgánicos, de modo que si un 1 mol de

oxígeno peróxido libera el I^2 en un medio ácido este será proporcional a la cantidad de peróxidos existentes en la muestra valorando con tiosulfato sódico, se utiliza como indicador el almidón que tiene una reacción con el yodo de coloración azul que desaparecerá cuando el I se reduce, como disolvente para la grasa se utiliza cloroformo y se añade ácido acético glacial en relación (40:60) para aportar la acidez necesaria al medio y se produce la reacción, todos los reactivos son de grado analítico y marca Panreac.

a) Preparación del Blanco

En un matraz balón de 250 mL se colocaron 25 mL de la mezcla cloroformo ácido acético 40:60 y 1 mL de la disolución de yoduro potásico agitando suavemente por 1 min y se colocó en la oscuridad por 5 min para dar tiempo a que se lleve a cabo la reacción, transcurrido el tiempo se agregó 75 mL de agua destilada y 3 gotas de almidón se repitió el procedimiento hasta obtener el blanco garantizando así la pureza de los reactivos.

b) Valoración de las muestras

Se pesaron $1,5 \pm 0,01$ g de la muestra de aceite, tanto para el cero como para las muestras de cada serie tratada con calor donde se añadió el cloroformo y ácido acético (40:60) para disolver la muestra y 1 mL de la disolución de yoduro potásico agitando suavemente por 1 min y se colocó en la oscuridad por 5 min para dar tiempo a que se lleve a cabo la reacción, transcurrido el tiempo se agregó 75 mL de agua destilada y 3 gotas de almidón y se valoraron con el tiosulfato anotando la cantidad para realizar el cálculo de índice de peróxidos.

$$IP = \frac{V - V_o \times N}{P_{aceite}} \times 1000$$

Donde:

V= volumen gastado de tiosulfato en la muestra

V_o= volumen gastado en el blanco

N= normalidad del tiosulfato

P= peso exacto del aceite

Los resultados se expresaron en meq de oxígeno activo por Kg de aceite.

4.4.1.3 Absorbancia UV (K232 y K270)

Son parámetros que indican los componentes de oxidación primaria y secundaria respectivamente siendo el k232 más general que el índice de peróxido y el k270 mide compuestos secundarios de oxidación como aldehídos, cetonas y trienos conjugados presentes en los aceites de oliva virgen y virgen extra.

Se realizó la lectura por medio de una espectrofotometría ultravioleta con el programa Cary WinUV Advanced Reads.

a) Preparación de la Muestra

En un matraz de 10 mL se pesaron 0.1 g de la muestra en la misma secuencia que los análisis anteriores y se anotó el peso exacto con una precisión de ± 0.0001 g, posteriormente se enrasó con ciclohexano para análisis y agitó hasta lograr la homogenización de la muestra, posteriormente en cubetas de cuarzo para lectura UV se vertió la disolución de la muestra y un blanco con el ciclo hexano para realizar la lectura en la longitud de onda 232 y 270.

Los cuales fueron calculados aplicando las siguientes fórmulas:

$$k_{232} = \frac{abs\ 232\ nm}{P\ aceite \times 10}$$

$$k_{270} = \frac{abs\ 270\ nm}{P\ aceite \times 10}$$

Donde:

Abs 232 nm= lectura del espectrofotómetro

Abs 270 nm= lectura del espectrofotómetro

P aceite = peso en g del aceite

4.4.2 Determinaciones De Composición

4.4.2.1 Compuestos Volátiles y Aromáticos

Son los responsables de los atributos en los aceites de oliva y están determinados por varios factores como la variedad el grado de maduración y los procesos de extracción empleados. Principalmente se pueden identificar hidrocarburos, alcoholes, aldehídos. La fracción volátil se lleva a cabo por la técnica de micro extracción en fase sólida y cromatografía de gases.

a) Preparación de la muestra

En viales para cromatografía de gases de 10 mL con rosca se pesaron 1.00 ± 0.001 g de aceite de cada una de las muestras, y con la bomba de nitrógeno UN (1066) se inyectaron los frascos con nitrógeno para eliminar el oxígeno del espacio de cabeza.

b) Inyección y lectura de la muestra

Tras un acondicionamiento en el bloque calefactor a 40 °C, los compuestos volátiles del espacio de cabeza son absorbidos durante 50 min por las fibras de SPME del tipo DVB/ Carboxen /PDMS 50/30 nm. Los compuestos obtenidos volátiles obtenidos son desorbidos directamente por el inyector de del equipo Bruker SCION 456 GC-TQ (Bruker, Billerica, MA). La identidad de los volátiles fue confirmada mediante utilización de helio como gas transportador, la columna se mantuvo a 40 °C durante 5 min y se programó un incremento de 4°C por min hasta alcanzar 200 °C. La identidad de los compuestos volátiles fue confirmada mediante el espectrómetro de masas Bruker SCION 456 TQ-SQ (Bruker, Billerica, MA) trabajando en modo EI (70 eV) y el empleo de la librería NIST y los tiempos de retención de los patrones puros. El espectro de masas se obtuvo en modo full-scan. La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo mediante rectas de calibrado individuales para cada compuesto identificado.

Los resultados se expresan en mg/kg cuantificados con el software Bruker Chemical Analysis.

4.4.2.2 Pigmentos

Los hidrocarburos presentes en el aceite de oliva como los pigmentos entre ellos la clorofila y los carotenos son los responsables de la apariencia de los aceites que además representa uno de los atributos más apreciables en la evaluación sensorial de este y que también tienen modificaciones durante los plazos de almacenamiento del aceite de oliva y la degradación de este o por los medios de extracción y el punto de maduración en el que se encuentra la aceituna, por lo que su medición es un referente para la composición de los aceites en su vida útil. Se utilizó el método descrito por Minquez *et al.*, (1991)

a) Preparación de la muestra

Para cada una de las muestras se pesó 1.5 ± 0.01 g de aceite y se agregó 10 mL de ciclohexano como disolvente del mismo, para posteriormente tomar de la disolución en una cubeta desechable PMMA/759105, de cada una de las muestras de la serie y como blanco se utilizó el ciclohexano se realizó la lectura en un espectrómetro con el programa Cary Win UV Advanced Reds.

Y posteriormente se realizaron los cálculos con las siguientes formulas:

$$Carotenos = \frac{abs\ 472\ nm \times 50}{P\ aceite}$$

$$Clorofilas = \frac{abs\ 670\ nm \times 163,13213}{P\ aceite}$$

Donde:

Abs 472 nm= lectura del espectrofotómetro para carotenos

Abs 670 nm= lectura del espectrofotómetro para clorofilas

P aceite =peso de la muestra de aceite en gramos

50= coeficiente para la relación del peso de la muestra y la absorbancia específica para una disolución al 1 % de carotenos.

163,13213= coeficiente para la relación del peso de la muestra en gramos y la específica para una disolución al 1 % de clorofilas.

Los resultados se expresaron en mg/Kg.

4.4.2.3 Tocoferoles

Son los antioxidantes presentes en el aceite de oliva de manera natural son un conjunto de sustancias que dan la capacidad de protección de oxidación de los cuales el alfa, beta y gama son los compuestos que se miden por medio de una cromatografía líquida, su presencia en el aceite de oliva depende principalmente de la forma de extracción del aceite, del tiempo y tipo de almacenamiento de los aceites ya que son los primeros en degradarse en otros compuestos como la quinona debido a sus función protectora en el alimento en este caso del aceite de oliva lo cual les da la razón de importancia ya que entre mayor contenido de tocoferoles tenga un aceite mayor será su resistencia a la oxidación y por tanto, su vida útil. Se emplea el método de la IUPAC (1992).

a) Preparación de la muestra

Se pesan 1.50 ± 0.01 g de aceite en matraz de 10 mL aforando con la fase móvil, la cual estaba constituida con 99,5 % de hexano y 0,5 % de 1-propanol, se agita hasta disolver el aceite y posteriormente se traspa a viales para su análisis en HPLC.

b) Inyección y lectura de la muestra

El HPLC se encuentra constituido por una bomba isocátrica, Agilente Technologies 1200 series, un tipo de detector UV de

longitud de onda programable la columna utilizada es tipo Lichrosphere Si60 (Merck) de 250 mm de longitud de diámetro interno de un tamaño de partícula de 5 μ m. La detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 260 nm y a una temperatura de 25°C el volumen de muestra es de 20 mL y con una duración de 20 min por muestra.

La identificación de los tocoferoles se realiza comparando los tiempos de retención con los patrones puros (Sigma). La cuantificación de las áreas de cada pico se realiza con ayuda del software Agilent ChemStation y su equivalencia a mg/kg se lleva a cabo mediante ecuaciones obtenidas de rectas de calibrado.

4.4.2.4 Amargor K225

Es un parámetro relevante por su influencia en su valoración sensorial y su relación con la presencia de los antioxidantes polifenoles en el aceite. La determinación se realiza por medio del método desarrollado por Gutiérrez & Perdiguero (1992).

En una columna de extracción en fase sólida SPE C18 JT Baker con un volumen de 6 mL y un peso de fase estacionaria de 500 mg con un máximo no. de usos de 4 veces.

a) Preparación de la muestra y las columnas

Se pesan 1.0 ± 0.01 g de aceite en un vial, se disuelve en 5 mL de hexano y se vierte en las columnas las cuales han sido previamente activadas con 5 mL de metanol grado HPLC LiChrosolv y 5 mL de hexano grado HPLC LiChrosolv, colocadas sobre la base para bomba de vacío, posteriormente se enjuagan los frascos con 5 mL hexano tres veces más.

Finalmente se añaden 5 mL de hexano directo sobre la columna para eliminar todos los restos de g asa en la columna.

Los compuestos que han quedado en la columna se eluyen con cuatro volúmenes de 5 mL de solución metanol/agua (50:50). La elución se recoge en matraz de 25 mL y se afora con el metanol agua, para vaciar en cubetas desechables para UV.

b) Lectura de las Muestras

En un espectrofotómetro PMMA/759105 tipo Varían 50 Bio UV-visible, a la longitud de onda de 225 nm, empleando la mezcla metanol: agua como blanco, con el programa Cary Win UV Advanced Reds.

4.4.2.5 Polifenoles Totales

Forma parte de la fracción polar de los aceites de oliva y la cantidad de polifenoles depende de la variedad, etapa de maduración y tipo de cultivo seco, regadío.

El contenido de polifenoles se determina siguiendo el método de Vázquez-Roncero *et al.* (1973) modificado.

- a) Se pesó en tubo falcón para centrifuga de 15 mL 1.0 ± 0.01 g de aceite, y se añaden 5 mL de hexano PA marca LiChrosolv, y se agitan durante 15 min. para disolver el aceite.

b) Extracción de las muestras

extracción líquido-líquido que se lleva a cabo por la adición de 2 mL de dilución metanol: agua (60:40) y agitando por 90 segundos. se procede a introducir la muestras en la centrifuga a 400 r.p.m durante 6 min. Para la separación de las fases. Con pipeta Pasteur larga se extrae la fase más densa y se vierte en un matraz de 10 mL, la operación se lleva a cabo 3 veces más y se afora el matraz con agua destilada, se deja decantar por un día para separar los restos de aceite que puedan quedar en el extracto.

c) Lectura de las muestras

Se realiza una dilución en un matraz de 50 mL al cual se agrega una fracción del extracto dependiendo de los resultados del amargor (véase tabla 4.5) y 35 mL de agua destilada además 2.5 mL de Fólín como reactivo. Se agita y se deja reposar para que se desarrolle la reacción, adicionando 5 mL de Na OH al 5%(p/v) para

crear el medio básico llevando a un volumen final de 50 mL con agua destilada y agitando para homogenizar la muestra.

Valor k225 amargor

Lectura	Fracción	Factor
0.0-0.23	5 mL	F=100
0.20-0.33	4 mL	F=125
0.33-0.43	3 mL	F=167
0.43-0.53	2 mL	F=250
0.53 >	1 mL	F= 500

En un espectrofotómetro tipo Varían 50 Bio UV-visible, empleando una mezcla de los reactivos sin el aceite como blanco, con el programa Cary Win UV Advanced Reds se realiza la lectura y los resultados se expresan en mg/kg de ac. Cafeico los cuales se multiplican por el factor de acuerdo a la cantidad de extracto empleado.

4.4.2.6 Polifenoles Cualitativos

Se trata de la cuantificación individual de cada uno de los polifenoles presentes en el aceite de oliva. Se empleo el método descrito en Beltrán (2000).

- a) Preparación de la muestra se pesan 1.5 ± 0.01 g de aceite en tubos falcón y se añaden 100 μ L de ácido siringico como patrón interno que es evaporado con nitrógeno. y se añade 1 mL de hexano HPLC y se agita por 15 segundos. Posteriormente se añaden 1.25 mL de Me OH/agua (60:40) para ser agitado por 30 segundos más. Con pipetas Pasteur largas se extrae la fase y se coloca en matraz aforado de 2.5 mL, esto se repite dos veces mas.se enrasa con metanol /agua se elimina los restos de aceites y se traspasa a viales para cromatografía.

b) Inyección y lectura de las muestras

Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo Hewlet Packard 1110 con Bomba Cuaternaria y termotización de columna y muestreador automático con diodearray y fluorescencia.

La separación se realizó con una columna de RP18 Pecosphere de 83 mm, 4,6 mm de un tamaño de partícula 3 μm . La detección se llevó a cabo a 280 nm y a una temperatura de 25 °C para el muestreador y el equipo de termotización de la columna. La velocidad de flujo fue de 0,45 mL /min. La fase móvil empleada fue ácido acético al 2% en agua(A) y ácido acético al 2% en Metanol(B) para un tiempo de análisis de 70 min con el siguiente gradiente de 90 % a 10 % B durante 10 min., 80% A 20 % durante 2 min, 60 % A /40 % B durante 10 min. ,50% A /50 %B en 10 minutos y 0% A /100% B en 10 min. Hasta el final del análisis.se inyectaron 20 mL del extracto. Y se determinaron los espectros UV-Visible para la caracterización de cada uno de los compuestos fenólicos separados durante el análisis, en el rango de 190 a 400 nm, por medio del detector diodearray del cromatógrafo líquido.

La detección se llevó a cabo a 280 nm para los compuestos de carácter fenólico. La identificación de los polifenoles se realiza comparando los tiempos de retención con los patrones puros (Sigma). La cuantificación de las áreas de cada pico se realiza con ayuda del software Agilent ChemStation y su equivalencia a mg/kg se lleva a cabo mediante ecuaciones obtenidas de rectas de calibrado.

4.4.2.7 Ácidos Grasos

El 99% de la composición de la composición del aceite de oliva corresponde a diferentes ácidos grasos, como el oleico que es un ácido g aso monoinsaturado, y es el mayoritario y otros en menor proporción como el palmítico, esteárico y palmitoleico linoleico y linolénico.

La determinación se realiza por cromatografía gaseosa siguiendo el método descrito en el reglamento Europeo 2568/91 (2016). Por medio de una metilación para lograr su separación del enlace glicérido y tener mejores condiciones en la cromatografía.

a) Preparación de la muestra

en un matraz aforado para destilación de 50 mL se añaden 0.3 g de aceite y se añaden 2.5 mL de metilato sódico al 0.5 % (p/v) y se coloca en ebullición con un refrigerante de reflujo abierto. Tras 10 min en ebullición se adicionan 2.5 mL de metanol sulfúrico al 5%(v/v), se deja enfriar tapado para evitar evaporaciones y posteriormente ese lleva el contenido a un tubo de 25 mL. Se enjuaga el matraz donde se ha llevado a cabo la metilación hasta tres veces con 2 mL heptano para facilitar la separación de fases se añade una solución de salmuera al tubo agitando suavemente ara conseguir la homogenización se deja en el refrigerador por un día y al día siguiente cuando las dos fases se encuentren claramente separadas con una pipeta Pasteur corta se toma la fase superior y se vierte en viales para cromatografía.

b) Inyección y lectura de las muestras

Empleando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem equipado con un detector de ionización de llama (FID)y un inyector automático. La columna empleada es una columna capilar BPX70 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 25 µm de película (SGE Scientific Pty Ltd Australia) el gas portador es helio y a temperatura mantenida en el horno es de 198 °C (isoterma) la temperatura del inyector (modo Split /splitless) es de 235 °C y la del detector es de 245°C. el volumen de muestra inyectada es de 2 µL y el tiempo necesario para el análisis de cada muestra es de 40 min.

El área de cada pico se cuantifica con ayuda del software Star Varian Interactive Graphics y los resultados se expresan como porcentajes relativos respecto del total.

5.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los análisis realizados para cada una de las muestras durante los distintos tiempos de exposición al tratamiento térmico arrojaron los siguientes para los parámetros tanto de calidad como composición:

CALIDAD

5.1 GRADO DE ACIDEZ

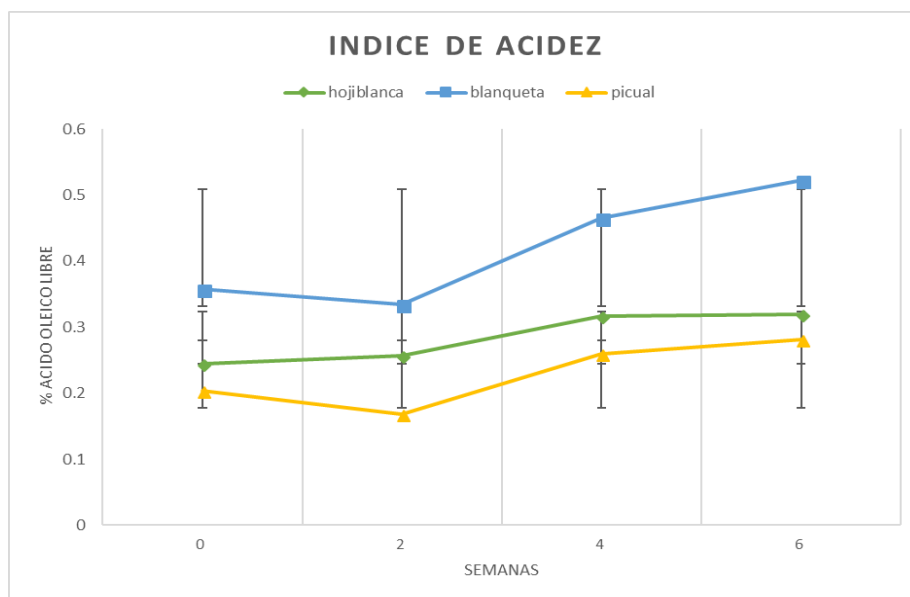


FIGURA 5.1 Variación de acidez en las variedades ‘Blanqueta’, ‘Hojiblanca’ y ‘Picual’, analizadas desde el tiempo cero hasta 6 semanas en estufa a 60 °C.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis de índice de acidez, con el programa paquete Windows Office Excel 2013.

Durante el periodo de oxidación se observó en general, un incremento de la acidez del aceite si bien, para todas las variedades los valores permanecieron por debajo de los límites establecidos para la categoría virgen extra. Este incremento de la acidez, fue diferente en función de la variedad de la que procede el aceite, siendo más marcado en los aceites de ‘Blanqueta’ y de menor importancia en ‘Picual’. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Papaseit *et al.* (1988). Para las variedades estudiadas siendo que ‘Picual’ tiene un comportamiento más estable en la acidez libre debido a su alto contenido en ácido oleico (monoinsaturado) (Boskou, 2002) con respecto a la variedad ‘Blanqueta’ cuyo menor porcentaje de ácido oleico lo vuelve más inestable con un mayor porcentaje de ácidos grasos

saturados que siendo expuestos a los factores de oxidación genera la hidrólisis de los mismo aumentando el contenido de acidez libre.

Para el caso de la variedad 'Hojiblanca' la tendencia es a estabilizarse debido a que aunque su contenido de oleico tambien es alto los compuestos minoritarios que dan una estabilidad oxidativa mayor a los acidos grasos se encuentran en menor concentración (Íñiguez,1999).

Tabla 5.1 Variación de acidez en las variedades 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual', analizadas desde el tiempo cero hasta 6 semanas en estufa a 60 °C.

Variedad	Tiempo (semanas)	%Acidez
'Hojiblanca'	0	0.24±0.03
	2	0.25±0.06
	4	0.31±0.03
	6	0.31±0.03
'Blanqueta'	0	0.35±0.03
	2	0.33±0.05
	4	0.46±0.03
	6	0.52±0.02
'Picual'	0	0.20±0.03
	2	0.16±0.00
	4	0.25±0.03
	6	0.28±0.00

Valores medios ± SD (n=3)

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis de índice de acidez, con el programa paquete Windows Office Excel 2013.

5.2 ÍNDICE DE PERÓXIDOS

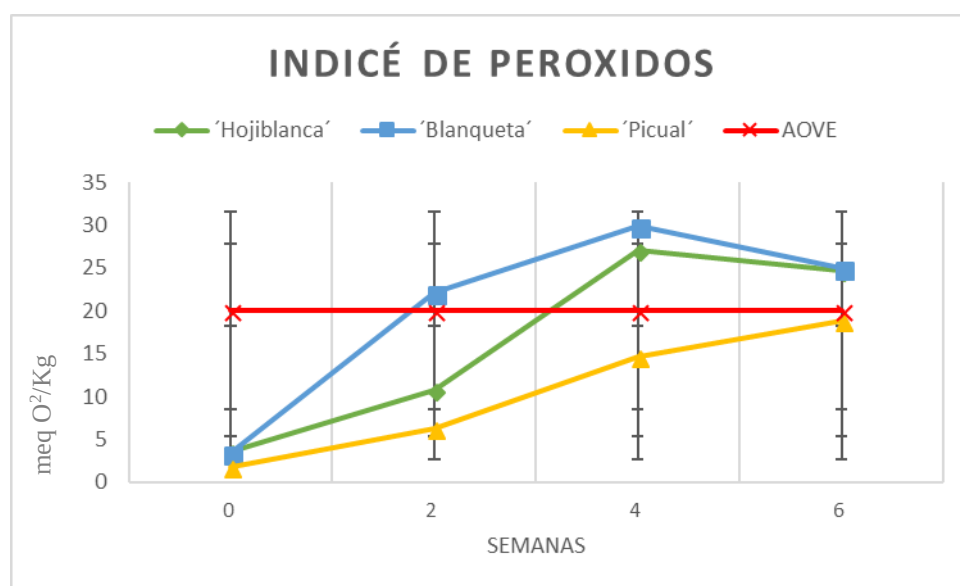


FIGURA 5.2 Variación del índice de peróxidos en las variedades 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual', analizadas desde el tiempo cero hasta 6 semanas en estufa a 60 °C.

Fuente: Elaboración propia apartir de los datos obtenidos del analisis para indice de peroxidos, con el programa paquete Windows Office Excel 2013.

El índice de peróxidos se utiliza como indicador de oxidación primaria como se muestra en la Figura 5.2, tiene un incremento exponencial hasta las 4 semanas de tratamiento térmico para las variedades 'Hojiblanca' y 'Blanqueta' superando los límites para la categoría virgen extra. Sin embargo, la curva muestra un claro descenso a partir de la semana 5 debido a la degradación de los hidroperóxidos y la formación de productos de oxidación secundaria (Boskou, 2002). Sin embargo, la variedad 'Picual' muestra una mayor estabilidad oxidativa hasta un tiempo de tratamiento térmico de 6 semanas sin que sobrepase los límites superiores para la categoría virgen extra. Por tanto, el proceso de oxidación secundaria no se lleva a cabo hasta tiempos superiores a las 6 semanas de tratamientos de oxidación forzada con temperaturas superiores a los 50 °C siendo estos datos acordes a lo desarrollado por Mancebo-Campos (2008) y posteriormente Lozano-Sánchez (2013). El menor contenido de ácido oleico y mayor porcentaje de ácido linoleico y linoleico hacen de los aceites de la variedad 'Blanqueta' más susceptible a la oxidación lo que explicaría el incremento más rápido del índice de peróxidos. Por el contrario, el elevado contenido de ácido oleico y el muy bajo porcentaje de ácido

linoleico serían los responsables de la mayor resistencia del aceite de la variedad 'Picual' a la oxidación.

En cualquier caso, parece que el índice de peróxidos podría ser un indicador adecuado a la hora de establecer un modelo de predicción de vida útil.

5.3 Absorbancia K232 y K270

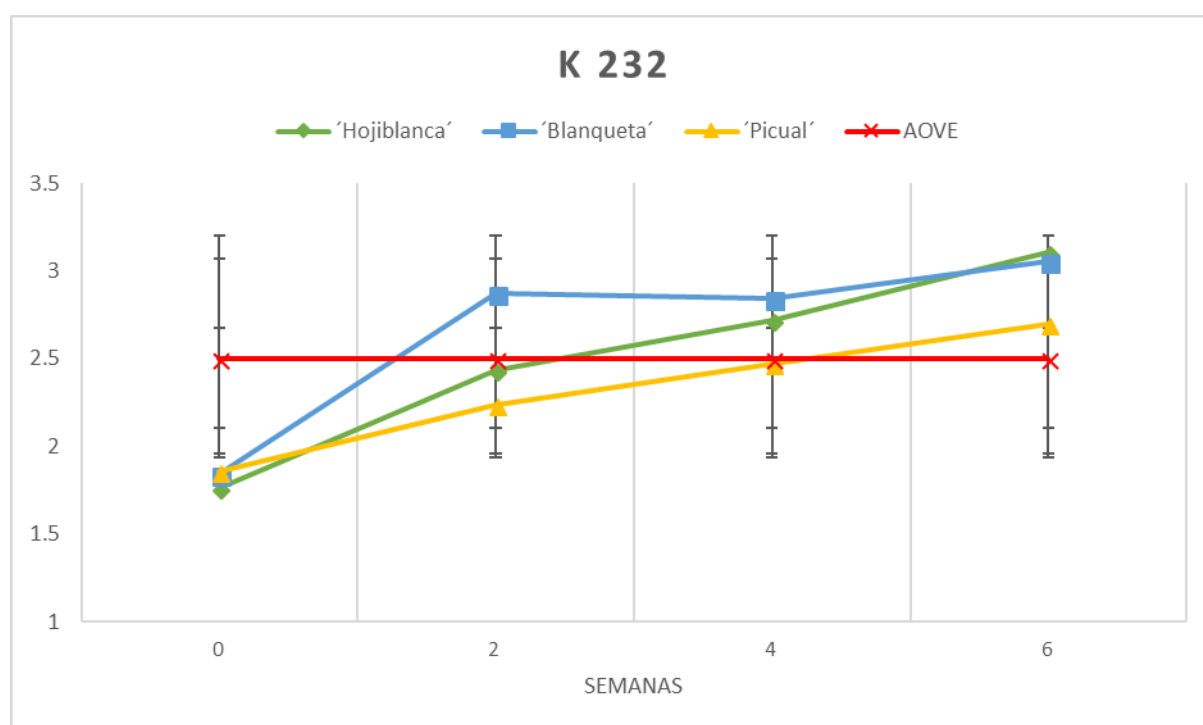


FIGURA 5.3 Variación en el índice de absorbancia 232 (oxidación primaria) en las variedades 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual', analizadas desde el tiempo cero hasta 6 semanas en estufa a 60 °C.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis para índice de refracción 232 nm, con el prog ama paquete Windows Office Excel 2013.

La formación de los productos de oxidación primaria K232 muestra una tendencia a aumentar exponencialmente (Figura 5.3) con respecto al tiempo de oxidación en las tres variedades. Sin embargo, los incrementos son mayores en la variedad 'Blanqueta' desde el tiempo 2 incluso por encima del límite superior para la categoría virgen extra, contrario a lo observado en 'Picual' cuyo incremento no supera los límites para virgen extra hasta las 6 semanas de exposición al

tratamiento térmico. Estos resultados coinciden con lo presentado en el índice de peróxidos Figura 5.2.

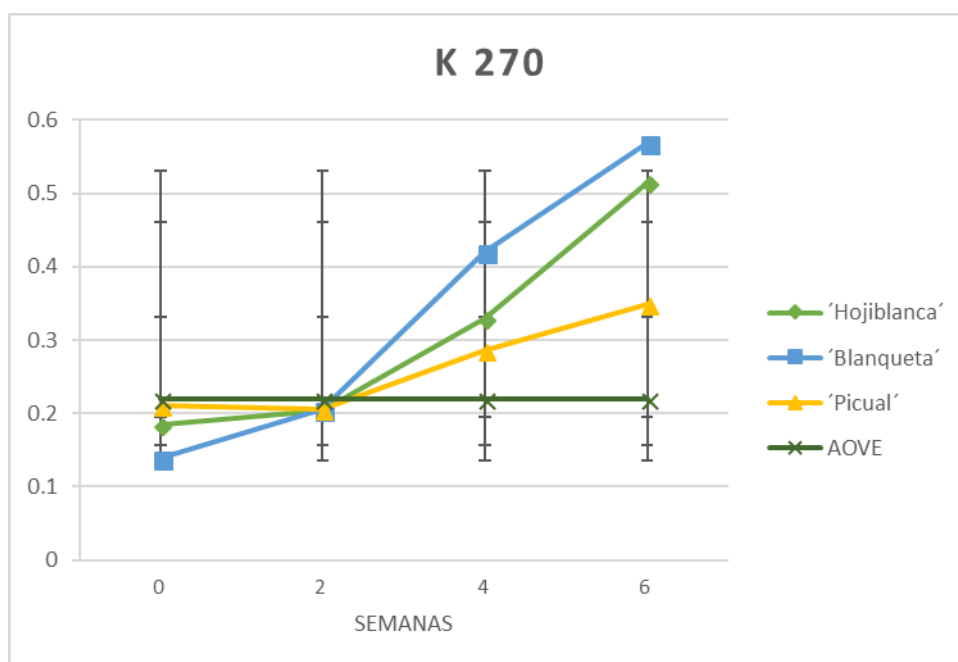


Figura 5.4. Variación en el índice de absorbancia 23 (oxidación primaria) en las variedades 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual', analizadas desde el tiempo cero hasta 6 semanas en estufa a 60 °C.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis para índice de refracción 270 nm, con el programa paquete Windows Office Excel 2013.

Los resultados para el índice de absorbancia K270 permiten apreciar que la generación de compuestos de oxidación secundaria a partir del tiempo 2 es muy cercana al límite superior para la categoría virgen extra en las tres variedades analizadas, siendo que una vez formados los hidroperóxidos, productos de oxidación primaria que requieren mayor energía para formarse, la generación de productos de degradación secundaria es mucho más rápida (Boskou,1996). Por tanto, los datos obtenidos en las Figuras 5.2 y 5.3 confirma que es el tiempo 2 el que detona estos cambios en las rutas de oxidación y degradación lipídica para las tres variedades. Sin embargo, la reacción se lleva a cabo con mayor velocidad en las variedades 'Blanqueta' y 'Hojiblanca' respectivamente. Este comportamiento es posiblemente es debido a la composición de ácidos grasos como se ha indicado anteriormente y al efecto antioxidante que presentan las altas concentraciones de compuestos fenólicos en la variedad 'Picual'.

COMPOSICIÓN DEL ACEITE

5.4 VOLÁTILES

En las Figuras 5.5- 5.7 se muestra la evolución de los perfiles volátiles en las tres variedades analizadas durante el tratamiento térmico para oxidación forzada.

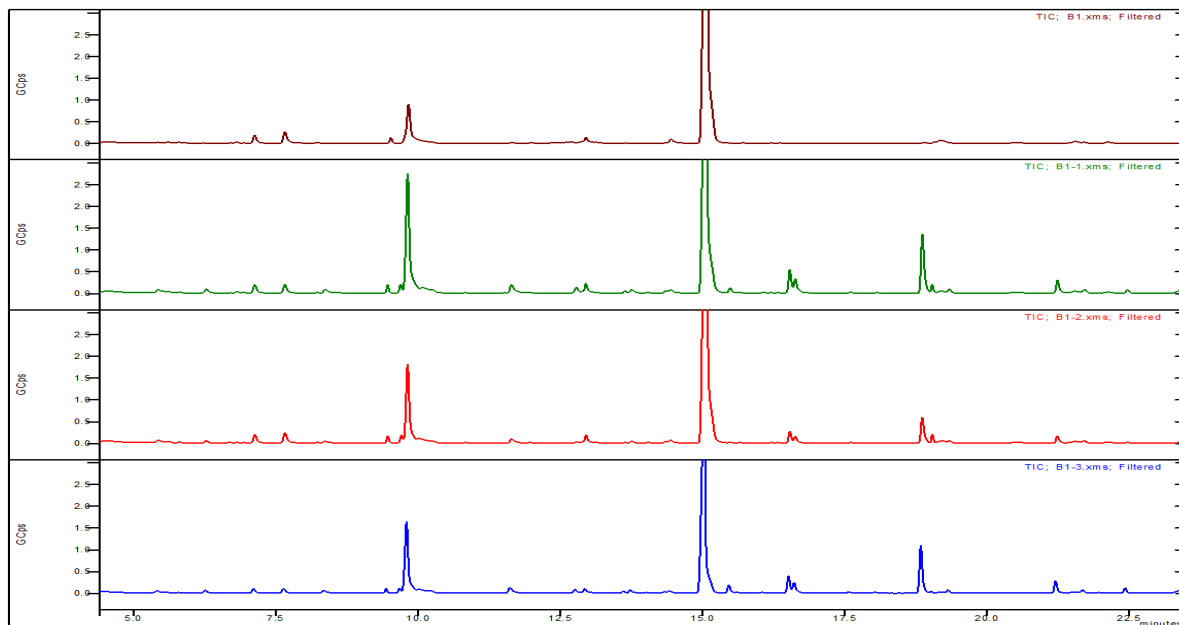


FIGURA 5.5 Variación del perfil de volátiles de la variedad 'Blanqueta' evaluada durante los 4 tiempos.

Fuente: Obtenidos del análisis cromatografico, con el software Bruker Chemical Analysis.

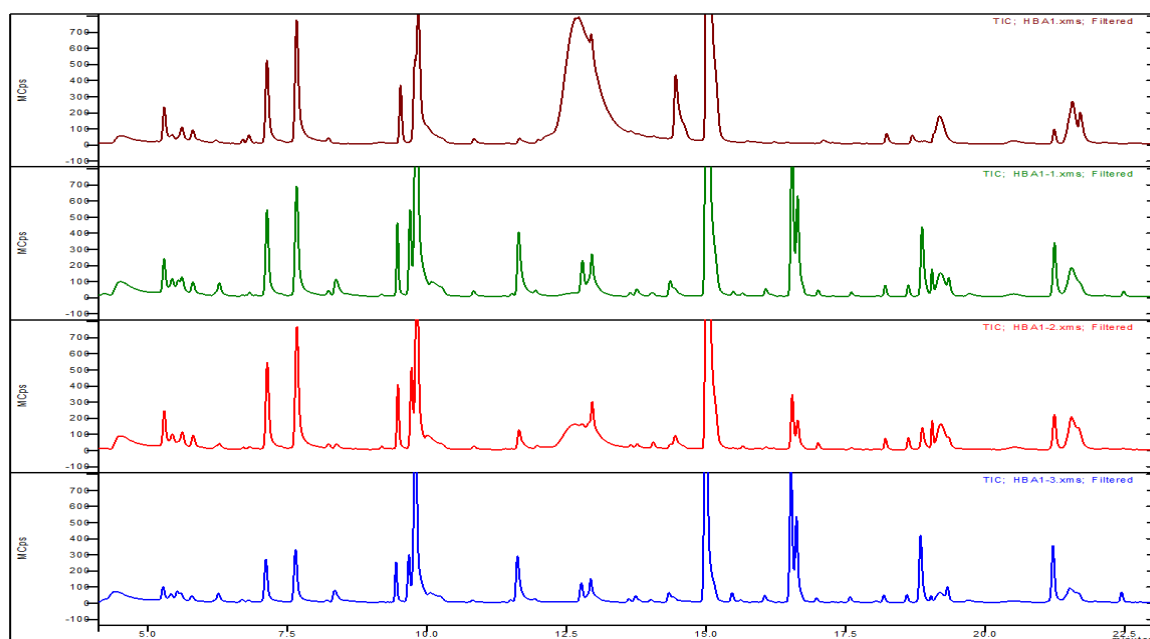


FIGURA 5.6 Variación del perfil de volátiles de la variedad 'Hojiblanca' evaluada durante los 4 tiempos.

Fuente: Obtenidos del análisis cromatografico, con el software Bruker Chemical Analysis

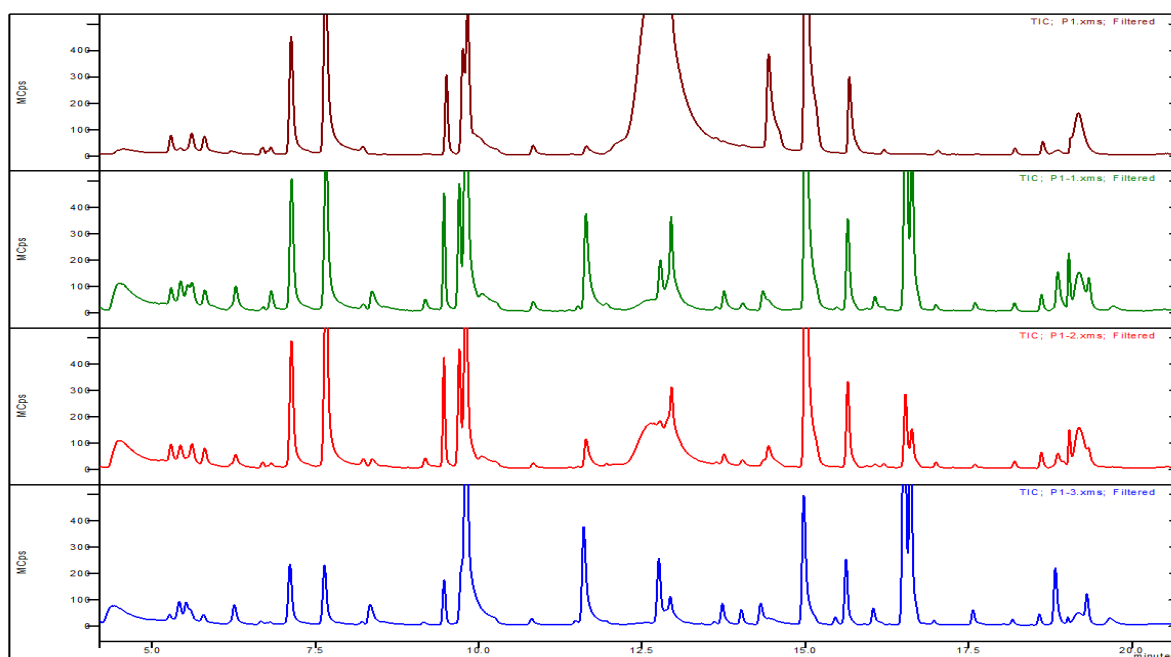


FIGURA 5.7 Variación del perfil de volátiles de la variedad 'Picual' evaluada durante los 4 tiempos.

Fuente: Obtenidos del análisis cromatográfico, con el software Bruker Chemical Analysis.

Tabla 5.2 Variación del perfil de volátiles de las variedades 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual' evaluadas durante los 4 tiempos.

Compuesto	T0			T2			T4			T6		
	'Blanqueta'	'Hojiblanca'	'Picual'	'Blanqueta'	'Hojiblanca'	'Picual'	'Blanqueta'	'Hojiblanca'	'Picual'	'Blanqueta'	'Hojiblanca'	'Picual'
2-Butanona	n.d	n.d	n.d	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.d	n.d	n.d	n.d
Alcohol metílico	1896.22±78.1 0	2544.78±81.49	1092.78±3 5.96	2.81±0.14	5.05±0.14	6.27±0.35	3.58±0.58	5.06±0.79	5.86±0.03	2.28±0.06	3.92±0.07	4.76±0.35
Hexano,1-metoxi	133.47±231.1 7	5009.35±14.87	1601.25±1 4.40	0.00±0.00	5.04±0.01	1.59±0.03	0.00±0.00	4.90±0.27	1.55±0.02	0.00±0.00	1.74±0.08	0.59±0.00
Octadieno-3-etil-1,5	901.34±32.80	2757.45±41.05	2151.31±2 5.41	1.56±0.03	3.93±0.12	3.55±0.17	1.54±0.03	3.83±0.06	3.63±0.17	0.98±0.01	2.59±0.11	2.16±0.19
Octadieno-3-etil-1,5 trans	2592.35±14.0 2	7046.28±78.90	5933.69±7 3.57	1.19±0.08	6.16±0.19	4.45±0.20	1.12±0.08	5.16±0.05	4.63±0.29	1.39±0.01	3.85±0.18	3.07±0.03
3-etil-metil-penteno	173.15±2.62	434.52±2.68	497.86±8.1 7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2-etil, Furan,	n.d	n.d	n.d	0.11±0.00	0.28±0.00	0.30±0.01	0.04±0.00	0.09±0.01	0.09±0.00	0.08±0.00	0.23±0.01	0.26±0.01
Octadieno-1,5-3-etil	1375.61±37.9 8	3676.46±137.1 4	3136.18±8 9.09	2.50±0.03	6.83±0.14	6.13±0.22	2.52±0.04	6.76±0.13	6.23±0.09	1.51±0.06	4.07±0.21	3.57±0.16
Pentalanal	n.d	n.d	n.d	0.13±0.00	0.10±0.00	0.13±0.01	0.07±0.00	0.03±0.00	0.06±0.00	0.09±0.00	0.07±0.00	0.09±0.00
Octadieno-1,5-3-etil	11173.12±72. 59	15589.68±387. 49	10872.72± 262.51	2.50±0.03	6.83±0.14	6.13±0.22	2.52±0.04	6.76±0.13	6.23±0.09	1.51±0.06	4.07±0.21	3.57±0.16
trans Sin reconocimien to	n.d	n.d	n.d	0.09±0.00	0.32±0.00	0.36±0.01	0.12±0.01	0.40±0.01	0.47±0.01	0.04±0.00	0.14±0.01	0.12±0.00
Hexanal	1559.73±11.2 0	1659.20±392.2 1	830.07±13. 01	3.87±0.17	3.01±0.10	1.87±0.09	2.25±0.22	1.69±0.14	1.18±0.01	2.40±0.05	2.11±0.07	1.45±0.26
2-Pentalnal, (E)-	10.25±0.24	34.40±1.98	35.48±0.66	0.01±0.00	0.04±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
2-Butenal, (E)-	n.d	n.d	n.d	0.10±0.01	0.12±0.01	0.09±0.01	0.06±0.00	0.04±0.00	0.03±0.00	0.07±0.00	0.10±0.00	0.09±0.00
2,3-Pentanediona	n.d	n.d	n.d	0.00±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	n.d	n.d	0.01±0.00
Etil bencina	19.31±0.65	24.04±0.07	17.83±0.38	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2-Pentalnal, (E)--Dup1	21.60±0.57	43.38±4.24	41.03±0.84	0.23±0.00	0.46±0.01	0.42±0.01	0.11±0.00	0.14±0.01	0.13±0.00	0.14±0.00	0.31±0.02	0.37±0.02
3-Penten-2-ona	n.d	n.d	n.d	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Dimetil-1,3-benceno	64.13±3.97	92.47±2.30	49.04±1.41	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2-Hexenal, (E)--Dup1	238.48±14.97	1177.83±61.41	987.50±6.3 4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2-Hexenal, (E)--Dup1	18872.50±65. 14	8300.00±127.5 7	2861.67±6 0.48	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
3-Tetradecenal, (E)-beta.-Ocimene	85.09±7.23	59.51±26.67	2152.20±2 03.94	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
p-xileno	137.01±5.99	75.43±1.34	137.87±4.2 6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ácido acético éster hexil	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.07±0.00	0.00±0.00	n.d	n.d	n.d	n.d
Heptadieno-4-metil-1,5	2.91±2.75	84.43±3.34	44.20±0.69	0.00±0.00	0.09±0.00	0.05±0.00	0.00±0.00	0.10±0.00	0.05±0.00	n.d	n.d	n.d
	16.47±0.52	222.63±3.94	79.96±4.08	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Acetato ,3- hexen-1-ol	6.92±0.09	136.54±3.20	108.07±0.8 3	0.01±0.00	0.14±0.01	0.12±0.00	0.01±0.00	0.14±0.00	0.13±0.01	0.01±0.00	0.10±0.00	0.09±0.00
2-Penten-1-ol, (Z)-	23.70±0.26	38.11±0.34	42.75±0.17	0.10±0.00	0.39±0.00	0.38±0.00	0.13±0.01	0.41±0.02	0.41±0.00	0.05±0.00	0.17±0.01	0.14±0.02
2-Penten-1-ol, (Z)--Dup1	176.40±5.00	452.23±2.06	423.33±4.5 0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Heptanal	n.d	n.d	n.d	2.38±0.21	1.26±0.09	1.93±0.04	1.13±0.00	0.54±0.06	1.05±0.01	1.89±0.02	1.27±0.13	1.90±0.07
2, pentil, Furan	n.d	n.d	n.d	2.42±0.07	0.58±0.03	0.20±0.00	0.36±0.03	0.09±0.01	0.06±0.01	3.67±0.16	1.29±0.04	0.52±0.08
Octanal	n.d	n.d	n.d	0.00±0.00	0.14±0.02	0.20±0.00	0.00±0.00	0.06±0.01	0.09±0.01	0.16±0.01	0.16±0.00	0.26±0.00
Nonanal	14.97±25.92	0.00±0.00	0.00±0.00	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
3-Hexen-1-ol, (Z)-	152.46±4.10	824.20±4.16	453.20±6.1 6	0.00±0.00	0.65±0.01	0.36±0.01	0.15±0.01	0.72±0.02	0.41±0.01	n.d	n.d	n.d
2,4- Hexadienal, (E,E)-	1233.16±122. 47	8473.96±1099. 85	5791.67±1 14.94	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
alfa. - Copaene	0.00±0.00	942.77±103.21	69.62±13.4 6	0.00±0.00	0.94±0.06	0.10±0.00	0.00±0.00	0.96±0.05	0.11±0.03	n.d	0.64±0.04	0.07±0.24
(E)-4-Oxohex- 2-enal	1.00±1.73	62.45±13.21	60.76±5.69	0.04±0.01	1.43±0.02	1.00±0.06	0.03±0.01	1.16±0.06	0.77±0.01	0.03±0.00	0.81±0.07	0.96±0.02
1-Hexanol	87.66±0.38	68.78±1.65	18.42±1.10	0.10±0.00	0.07±0.00	0.03±0.00	0.09±0.00	0.07±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.02±0.00
2-etenil-1, Ciclohexano,	n.d	n.d	n.d	0.01±0.00	0.16±0.01	0.07±0.00	0.01±0.00	0.15±0.01	0.07±0.01	0.01±0.00	0.10±0.01	0.05±0.00
2-Heptenal, (Z)-	n.d	n.d	n.d	39.92±0.82	13.28±0.27	4.47±0.18	18.37±0.91	3.79±0.13	1.72±0.06	32.04±0.51	13.47±0.59	6.16±0.35
6-metil, 5- Hepten-2-ona	n.d	n.d	n.d	0.02±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00
2-Octenal, (E)-	n.d	n.d	n.d	0.51±0.01	0.20±0.01	0.08±0.00	0.12±0.01	0.04±0.00	0.03±0.00	0.52±0.03	0.31±0.03	0.15±0.02
2,4- Heptadienal, (E,E)-	n.d	n.d	n.d	13.76±0.39	23.64±1.05	18.61±0.3 3	5.13±0.28	5.65±0.09	4.63±0.56	13.22±0.30	27.37±2.13	27.68±0.67
5,9- Dodecadien- 2-ona, 6,	n.d	n.d	n.d	0.01±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.03±0.00	0.05±0.00
2,4- Heptadienal, (E,E)--	n.d	n.d	n.d	8.11±0.17	12.56±0.63	9.12±0.21	2.38±0.15	2.49±0.04	2.09±0.26	10.18±0.30	20.03±1.58	17.97±0.00
3,5-Octadien- 2-ona, (E,E)	n.d	n.d	n.d	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
Ácido acético	n.d	n.d	n.d	0.00±0.00	41583E5±108 1E5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	n.d	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

Valores medios ± SD (n=3)

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico con el software con el software Bruker Chemical Analysis y utilizando el Paquete Microsoft Office Excel 2013.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis cromatografico (Figuras 5.4-5.6) y considerando que las muestras fueron almacenadas con tapa, de modo que la disponibilidad del oxígeno fue limitada y por lo cual existía una recirculación de los compuestos volátiles y estos permanecían en el espacio de cabeza, al realizar la comparación de los picos obtenidos para las mismas variedades en distintos tiempos se puede observar un descenso en los compuestos volátiles de seis y cinco átomos de carbono (Tabla 5.2) como *hexanal*, *hexenal*, *cis-3 hexenal* y *trans -2-hexenal*, *hexanol*, *cis-3-hexanol* y *trans- 2-hexenol*; y sus ésteres, todos estos responsables de los atributos positivos en el aceite de oliva virgen y virgen extra (Espínola, 2015).

Debido al proceso de autooxidación, se generan una alta concentración de radicales OH° y O°, rompiendo así los dobles enlaces y formando moléculas oxidadas como aldehídos y cetonas tales como *heptanal*, *octanal*, *trans-2-heptenal*, *1-octen-3-ona* y *nonanal* (Espínola, 2015), siendo estos presentes desde un T2 para las tres variedades, lo cual es similar a lo presentado por Gomez-Alonso *et al.* (2004) durante el tratamiento térmico a 60 °C en un tiempo de 18 días.

Habría que destacar que el heptanal y heptenal se encuentran en una mayor concentración en los aceites de la variedad 'Blanqueta' a T0. Desde T2 desciende su contenido para los siguientes tiempos debido a su degradación.

Y para los casos de *cis-2-pentenal* y *cis-3- hexenol* responsables de los atributos positivos para las descripciones sensoriales de verde y verde hoja (Espínola, 2015) su permanencia es mayor en la variedad 'Picual' hasta un T6. Por lo que podemos considerar que los atributos positivos en 'Picual' en condiciones de oxidación forzada son más estables hasta tiempos superiores a las 5 semanas.

En cualquier caso, no se aprecia que haya un volátil o grupos de volátiles que puedan ser utilizados para como indicador de la vida útil en un modelo de estimación.

5.5 PIGMENTOS

En la Figura 5.8 se muestra la concentración de los pigmentos clorofílicos y carotenoides contenidos en las tres variedades y sus evoluciones a través del tratamiento térmico para oxidación forzada.

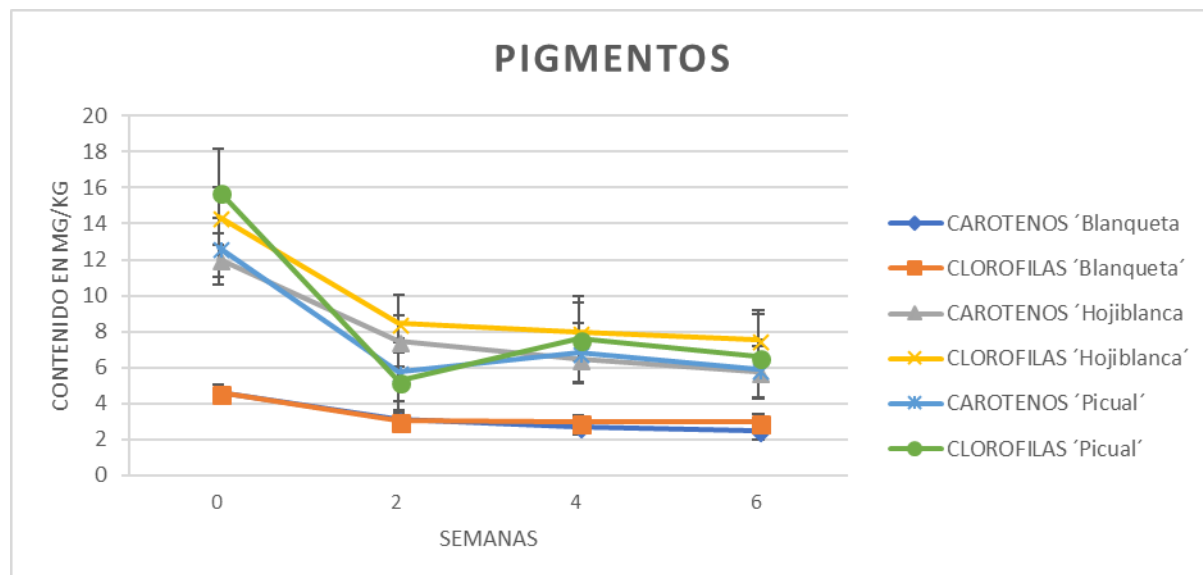


FIGURA 5.8 Variación del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides de los aceites durante el ensayo de oxidación forzada.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos por lectura de espectrofotometría con el software Cary WinUV y utilizando el paquete Microsoft Office Excel 2013.

La presencia de pigmentos como clorofilas y carotenos tiene relación con los procesos de oxidación fotosensible, sin embargo, se ha descrito en Oueslati *et al.* (2009) que en la oscuridad estos compuestos tienen actividad antioxidante. En la Figura 5.7 se aprecia el descenso de estos compuestos con relación al tiempo de exposición de las muestras al tratamiento térmico. Debido a que las muestras fueron almacenadas en tratamiento térmico, pero en la oscuridad la disponibilidad de estos se verá disminuida por el efecto antioxidante que tiene sobre los aceites.

También se debe considerar que los antioxidantes como α -tocoferol y β -caroteno son destruidos mucho más rápido en presencia de clorofilas disminuyendo esto también su concentración (Boskou, 1996); además se puede apreciar que la disminución es proporcional a la cantidad de pigmentos inicial por lo que en variedades como 'Picual' y 'Hojiblanca' el descenso es mayor con respecto a 'Blanqueta'. A partir de un T6 existe una tendencia a estabilizarse la concentración de pigmentos para las tres variedades.

5.6 TOCOFEROLES

En las Figuras 5.9-5.11 se observa como varia el perfil de tocoferoles durante la oxidación forzada.

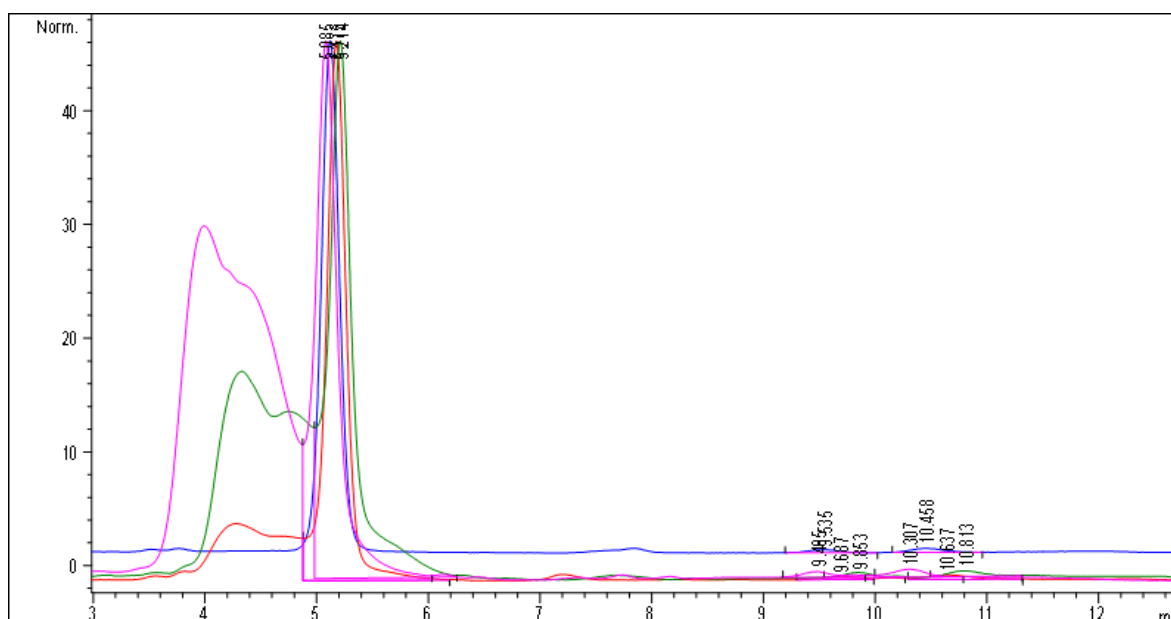


FIGURA 5.9 Evolución del contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Blanqueta' línea azul tiempo cero, línea roja tiempo dos, línea verde tiempo cuatro y línea rosa tiempo seis de tratamiento térmico oxidación forzada.

Fuente: Obtenido a partir del análisis cromatográfico con el software Agilent ChemStation.

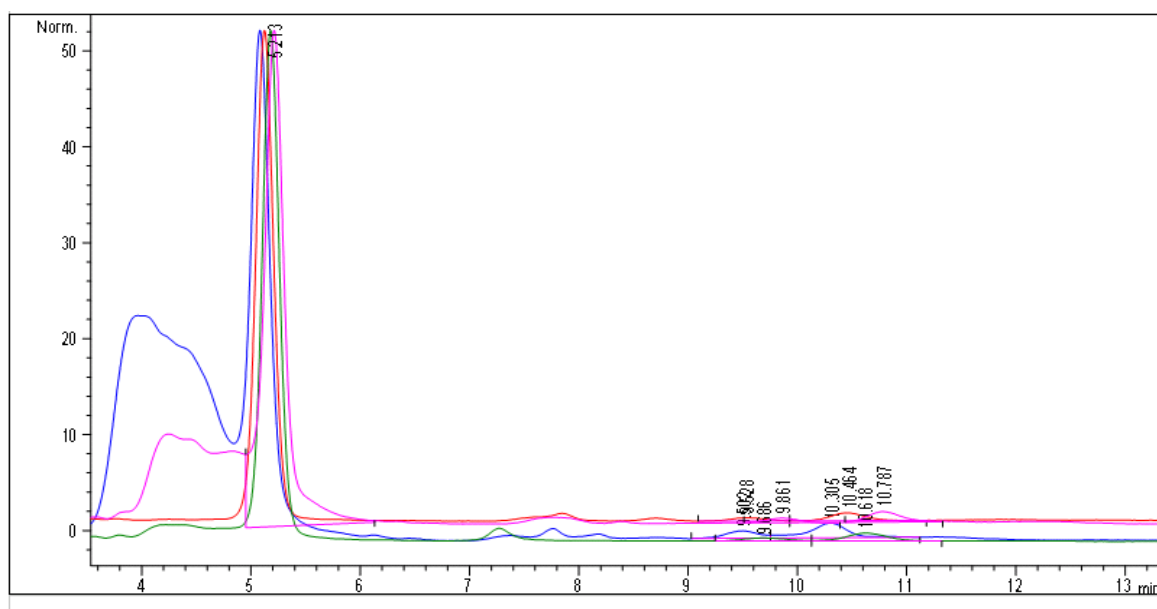


FIGURA 5.10 Evolución en el contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Hojiblanca' línea roja tiempo cero, línea verde tiempo dos, línea rosa tiempo cuatro y línea azul tiempo seis de tratamiento térmico oxidación forzada.

Fuente: Obtenido a partir del análisis cromatográfico con el software Agilent ChemStation.

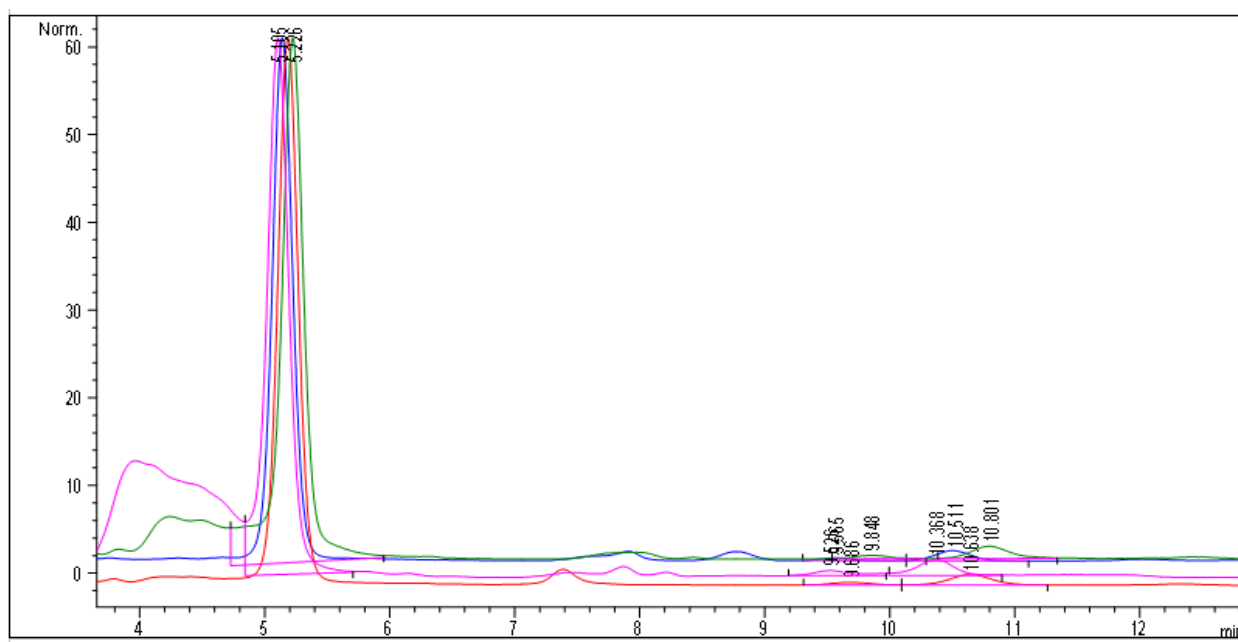


FIGURA 5.11 Evolución en el contenido de tocoferoles y productos de degradación en la variedad 'Picual' línea azul tiempo cero, línea roja tiempo dos, línea verde tiempo cuatro y línea rosa tiempo seis de tratamiento térmico oxidación forzada.

Fuente: Obtenido a partir del análisis cromatográfico con el software Agilent ChemStation.

Tabla 5.3 Variación del contenido de tocoferoles (alfa, beta y gamma) para las variedades analizadas, 'Blanqueta', 'Hojiblanca' y 'Picual', con relación al tiempo de oxidación.

Variedades	Tiempo (Semanas)	α	β	γ	$\Sigma(\alpha+\beta+\gamma)$
'Blanqueta'	0	363.30±14.39	3.46±0.12	18.41±0.10	385.19±14.35
	2	636.24±70.36	6.67±0.40	23.52±0.45	666.58±70.14
	4	352.22±21.59	3.58±0.68	18.59±0.33	374.43±22.46
	6	400.96±28.25	2.26±0.43	19.80±0.92	423.12±27.71
'Hojiblanca'	0	449.15±14.12	5.25±0.38	23.89±0.29	478.29±14.78
	2	752.85±87.24	10.34±1.10	33.64±2.27	796.85±90.60
	4	403.70±8.32	5.47±0.30	24.81±0.12	433.98±8.57
	6	378.28±31.26	7.79±0.59	25.56±0.93	411.65±32.67
'Picual'	0	453.89±11.43	3.38±0.17	25.51±0.20	482.78±11.77
	2	771.93±35.65	7.17±0.40	36.65±1.32	815.75±37.30
	4	385.87±52.43	4.16±0.32	25.98±0.49	416.22±51.87
	6	385.19±1.14	4.28±0.11	19.87±8.95	410.26±10.20

Valores medios $\pm$ SD (n=3)

Fuente: Elaboración propia a partir del análisis cromatográfico con el software Agilent ChemStation utilizando paquete Microsoft Office Excel.

En la Tabla 5.3 se muestra la concentración de tocoferoles de los aceites durante el ensayo de oxidación forzada. En tendencia general existe un ligero incremento de alfa tocoferol y tocoferoles totales tras dos semanas de almacenamiento, para un posterior descenso, esto coincide con los estudios realizados por Gómez-Alonso *et al.* (2004) para el estudio de muestras de aceite de oliva virgen con tratamientos térmicos principalmente en las muestras que se sometieron a temperaturas mayores a los 50 °C, también en condiciones de oscuridad.

Esto es debido al proceso de degradación de los antioxidantes y sus reacciones con otros compuestos presentes en el aceite de oliva virgen, lo cual genera la formación de compuestos como quinonas, siendo exponencial el incremento con respecto al tiempo de tratamiento térmico para las tres variedades analizadas, sin embargo al realizar la comparación de las tres variedades la generación de los compuestos de degradación del alfa-tocoferol (quinona) es significativamente mayor y más rápida en la variedad 'Blanqueta' a partir de un T2 y la estabilidad de los compuestos antioxidantes es más persistente hasta un T6 en la variedad 'Picual'.

Por lo que el contenido de alfa, beta y gamma tocoferol es mucho mayor aun en condiciones de oxidación forzada en tiempos superiores a las 5 semanas para 'Picual', lo cual representa una ventaja con respecto a los tiempos y procesos de almacenamiento en relación a la vida útil de los aceites de oliva virgen y vírgenes extra de esta variedad.

5.7 AMARGOR

Tabla 5.4 Variación en índice de amargor en las variedades analizadas ‘Blanqueta’, ‘Hojiblanca’ y ‘Picual’, con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.

Variedades	Tiempo	Amargor
‘Hojiblanca’	0	0.57±0.04
	2	0.45±0.04
	4	0.41±0.03
	6	0.38±0.01
‘Blanqueta’	0	0.50±0.03
	2	0.32±0.01
	4	0.34±0.04
	6	0.33±0.00
‘Picual’	0	0.61±0.01
	2	0.53±0.02
	4	0.50±0.06
	6	0.43±0.05

Valores medios ± SD (n=3)

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos por lectura de espectrofotometria con el software Cary WinUV y utilizando el paquete Microsoft Office Excel 2013.

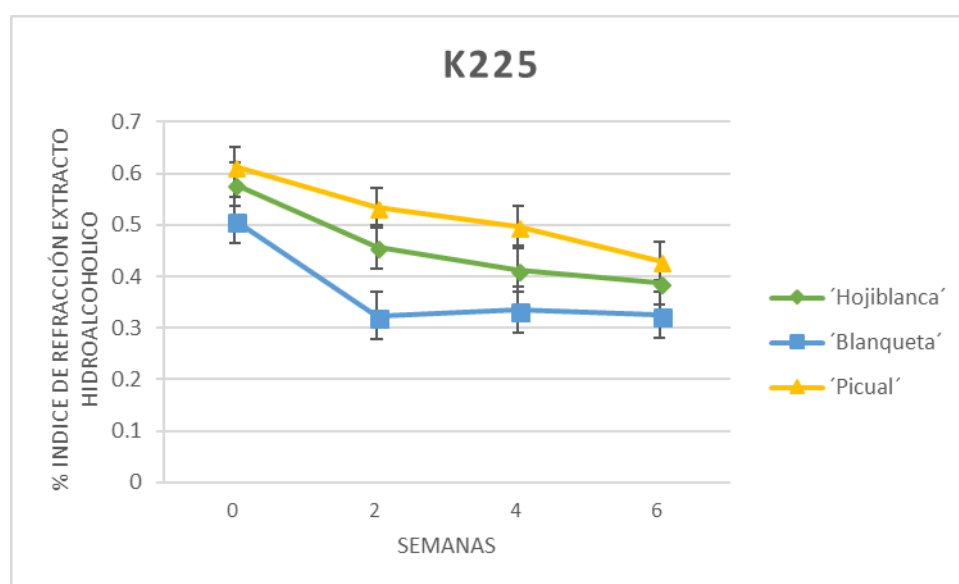


FIGURA 5.12 Variación en el índice de absorbancia 225 nm (Amargor) en las variedades analizadas ‘Blanqueta’, ‘Hojiblanca’ y ‘Picual’, con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos por lectura de espectrofotometria con el software Cary WinUV y utilizando el paquete Microsoft Office Excel 2013.

El amargor además de ser un parámetro para la caracterización del aceite de oliva en la evaluación sensorial funciona como indicador de concentración de polifenoles en los aceites de oliva. En la Figura 5.10 se muestra un descenso en el índice de absorbancia 225 nm a partir del T2 para todas las variedades analizadas; este descenso resulto ser de mayor magnitud en proporción al valor inicial (T0) para la variedad 'Blanqueta' y menor para la variedad 'Picual' hasta un T4, a partir del cual la disminución es significativamente mayor. Esta variación se relaciona con la estabilidad oxidativa de los aceites de oliva ya que los polifenoles son agentes antioxidantes que bloquean las reacciones de oxidación al eliminar los radicales libres, inactivando peróxidos y otras especies de oxígeno reactivo o inhibiendo las enzimas pro-oxidativas de acuerdo a trabajos realizados por Shahidi & Zhong (2007), logrando así extender la vida útil de los aceites de oliva. Estos resultados coinciden con los descritos por Lozano-Sánchez *et al.* (2013) en condiciones de almacenamiento a altas temperaturas.

5.8 POLIFENOLES TOTALES

El contenido de polifenoles como se mencionó anteriormente, está relacionado con la prolongación de la vida útil de los aceites de oliva en las investigaciones realizadas por Boskou (2006). Posteriormente Bendini *et al.* (2009) y más recientemente Lozano-Sánchez *et al.*, (2013) comprueban que las concentraciones de compuestos fenólicos como antioxidantes se ven directamente reflejadas en el alargamiento de la vida útil de los aceites de oliva. En el caso de las muestras analizadas (Figura 5.11), podemos observar como el descenso de la concentración de polifenoles es lineal en las tres variedades, pero para casos individuales el promedio de contenido de polifenoles resulta mucho menor a partir del T4 para las variedades 'Hojiblanca' y 'Blanqueta' mientras que en 'Picual' el descenso resulta ser de menor magnitud, manteniéndose estable hasta el T6 donde la disminución de compuestos fenólicos se ve afectada de manera significativa para equipararse al contenido de polifenoles de las otras variedades analizadas.

Debido a las reacciones de oxidación, que se desencadenan a partir de las siguientes semanas por la influencia de las altas temperaturas y las reacciones de autooxidación se observa que la pérdida de los compuestos fenólicos se produce a una mayor velocidad.

Habría que destacar el hecho de que en el caso de la variedad 'Picual' el descenso más lento del contenido de polifenoles podría ser explicado por la menor susceptibilidad del ácido oleico, presente en mayor porcentaje en sus aceites, y el muy bajo contenido de ácido linoleico característico de esta variedad lo que la haría menos susceptible a la oxidación y, por tanto, los antioxidantes no tendrían que actuar de forma tan activa.

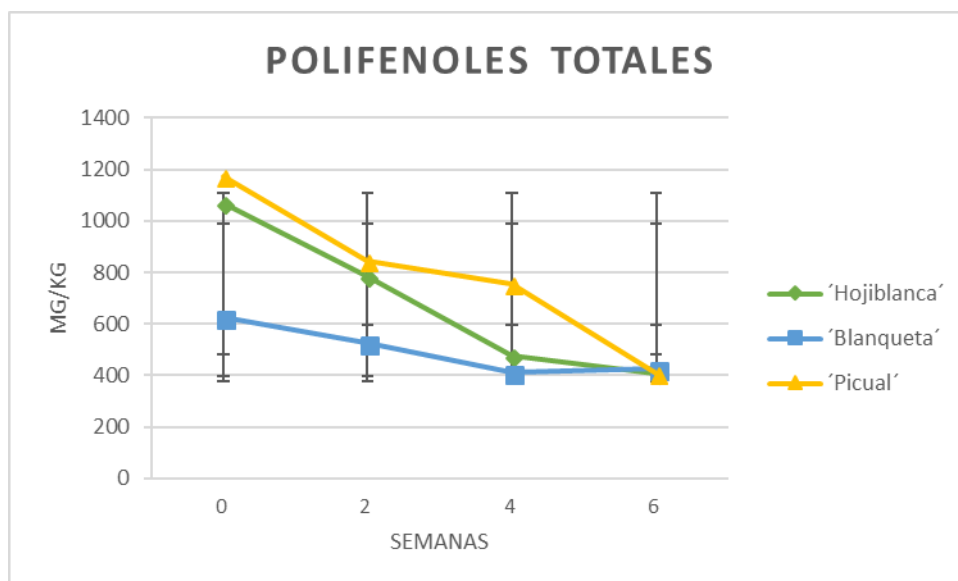


FIGURA 5.13 Variación del contenido de polifenoles totales en las tres variedades analizadas con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada.

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos por lectura de espectrofotometria con el software Cary WinUV y utilizando el paquete Microsoft Office Excel 2013.

5.9 POLIFENOLES CUALITATIVOS

En las Figuras 5.14-5.16 se muestra el perfil de compuestos fenólicos en las tres variedades analizadas durante el tratamiento térmico para el proceso de oxidación forzada identificándose los picos de los compuestos del hidroxitirosol, tirosol y sus derivados.

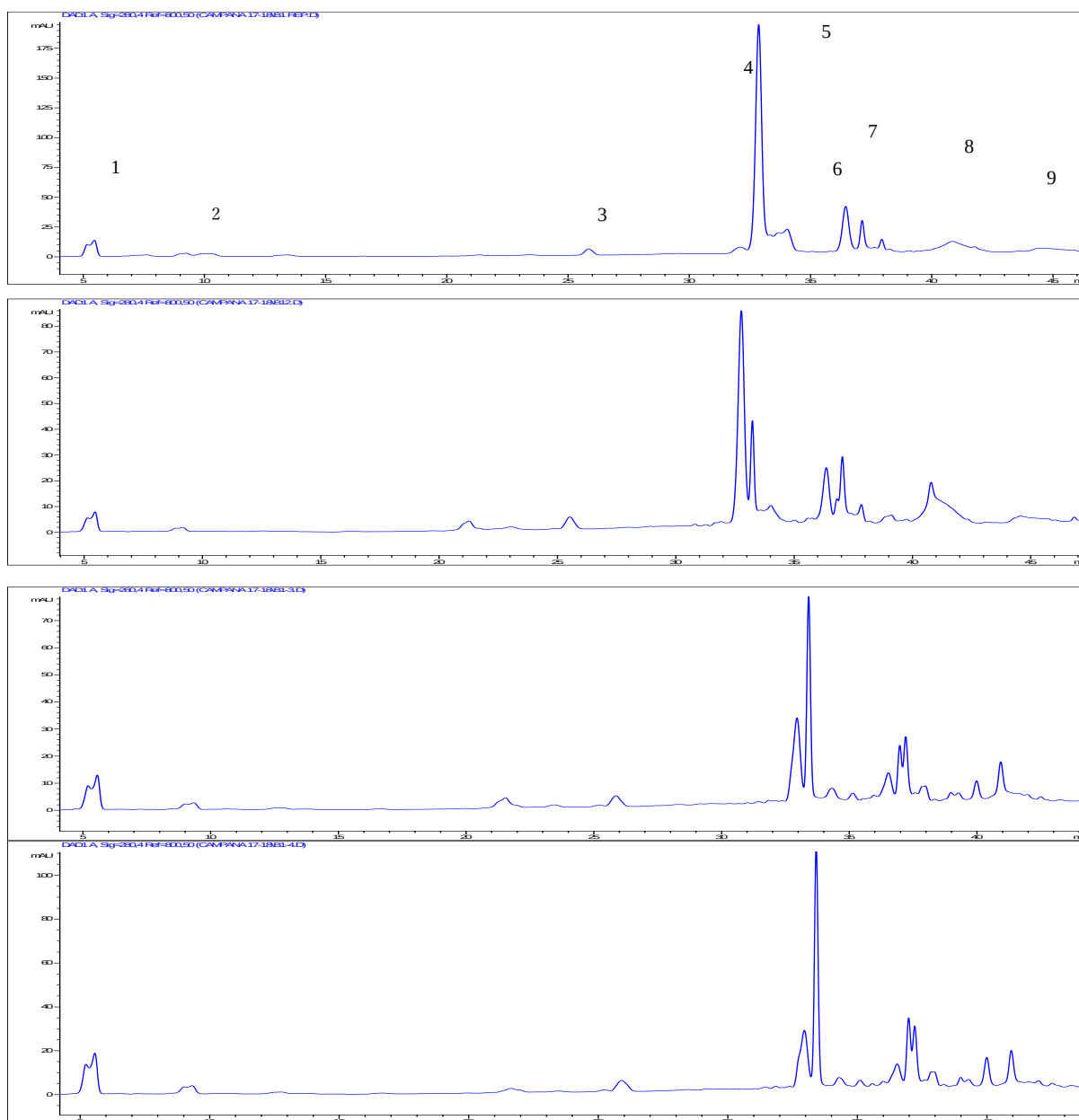


FIGURA 5.14 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad 'Blanqueta', con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada. (1) HIDROXITIROSON (2), AC. SIRINGICO PATRON, (3) TIROSON, (4) 3, 4-DHPEA-EDA, (5) PHPEA-EDA, (6) PINORESINOL, (7) ACETO-PINORESINOL, (8) 3, 4-DHPE-AEA Y (9) PHPE-AEA.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos, con el software Agilent ChemStation.

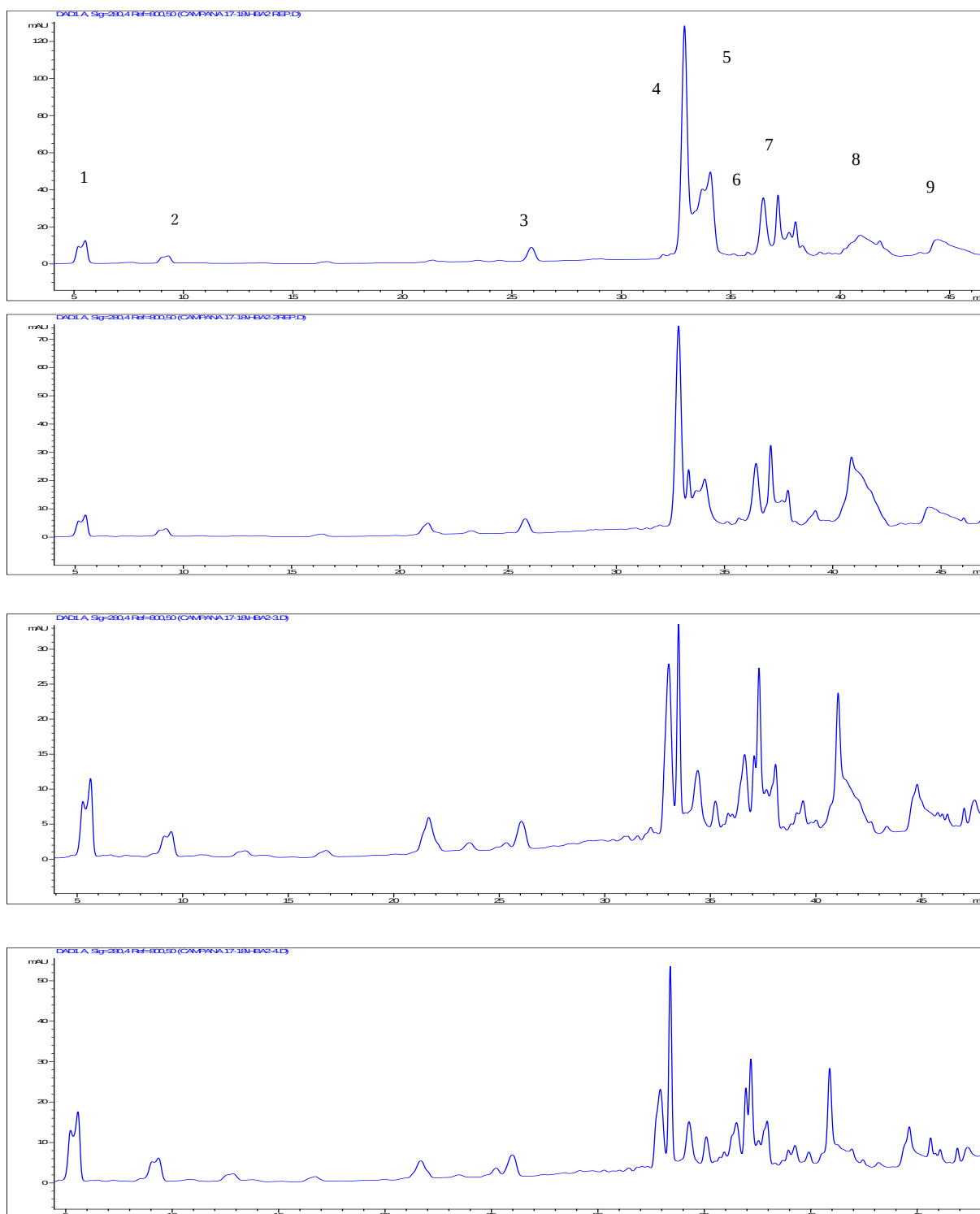


FIGURA 5.15 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad ‘Hojiblanca’, con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada. (1) HIDROXITIRO SOL (2), AC. SIRINGICO PATRON, (3) TIROSOL, (4) 3, 4-DHPEA-EDA, (5) PHPEA-EDA, (6) PINORESINOL, (7) ACETO-PINORESINOL, (8) 3, 4-DHPE-AEA Y (9) PHPE-AEA.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos, con el software Agilent ChemStation.

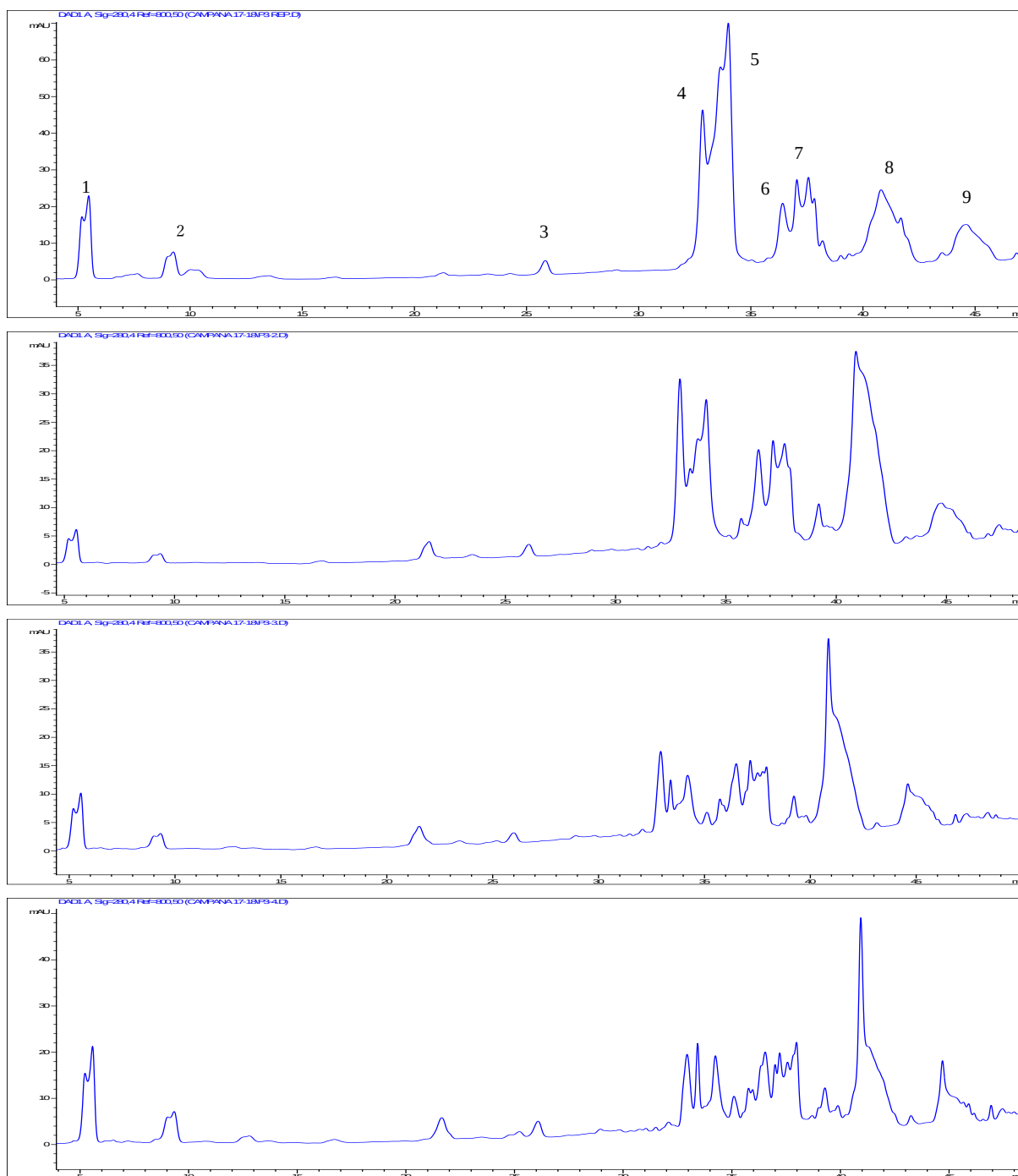


FIGURA 5.16 Evolución en el perfil de polifenoles en la variedad 'Picual', con respecto al tiempo de tratamiento térmico para oxidación forzada. (1) HIDROXITIRO SOL (2), AC. SIRINGICO PATRON, (3) TIROSOL, (4) 3, 4-DHPEA-EDA, (5) PHPEA-EDA, (6) PINORESINOL, (7) ACETO-PINORESINOL, (8) 3, 4-DHPE-AEA Y (9) PHPE-AEA.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos, con el software Agilent ChemStation.

Tabla 5.5 Compuestos fenólicos contenidos en las tres variedades analizadas y su variación durante el tratamiento térmico.

COMPUESTOS FENOLICOS	BLANQUETA				HOJIBLANCA				PICUAL			
	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6
<i>HIDROXITIRO SOL</i>	13.71±1.11	9.37±0.18	15.47±0.57	20.31±3.19	12.65±4.62	8.43±0.08	9.49±0.53	18.72±0.03	35.22	9.79±0.30	15.33±2.52	19.93±2.17
<i>TIROSOL</i>	5.38±4.42	2.60±0.04	4.14±0.06	5.96±0.85	6.87±5.61	4.36±0.04	5.20±0.70	10.06±0.59	25.76	3.90±0.04	7.01±3.76	11.80±1.23
<i>3, 4-DHPEA-EDA</i>	395.70±7.5 7	221.25±5.2 1	137.60±6.9 6	1.55.58±6.97	317.21±63. 91	199.46±6.85	60.27±13.37	92.62±23.17	111.389054	232.06±4.75	132.43±20.24	75.80±2.21
<i>PHPEA-EDA</i>	98.92±2.45	59.85±1.20	37.53±17.7 9	49.51±7.04	62.80±0.79	69.22±7.20	84.07±22.70	86.46±18.56	113.941824	106.80±44.28	58.33±12.89	71.79±32.77
<i>PINORESINOL</i>	0.83±0.01	1.07±0.11	0.65±0.00	0.67±0.09	0.82±0.01	0.86±0.35	0.55±0.14	0.95±0.26	1.56984021	1.28±0.28	0.79±0.07	0.77±0.12
<i>ACETO- PINORESINOL</i>	1.41±0.45	0.91±0.13	0.90±0.11	1.11±0.24	2.45±0.43	2.19±0.06	1.10±0.27	1.61±0.31	7.50803308	7.48±1.50	3.47±0.30	3.44±0.99
<i>3, 4-DHPE-AEA</i>	65.66±4.50	93.27±2.87	37.57±0.84	35.69±9.40	71.92±8.55	173.08±11.61	64.80±2.07	66.77±5.69	263.701586	381.96±32.00	154.69±76.32	134.09±45.88
<i>PHPE-AEA</i>	4.44±0.98	4.31±0.07	3.05±0.41	2.82±0.24	9.86±0.82	9.56±0.69	5.97±0.51	10.40±0.65	27.3664396	17.79±1.18	10.85±2.29	10.72±1.85

Valores medios ±SD (n=3) **Fuente:** Elaboración propia a partir de los datos obtenidos en el análisis cromatográfico con el software Agilent ChemStation y utilizando el Paquete Microsoft Office Excel 2013.

El análisis de los compuestos fenólicos de manera individual muestra un patrón de degradación claro principalmente en el caso de los compuestos como el hidroxitirosol y los derivados secoiridoides que lo contienen, así como la generación de derivados como consecuencia del tratamiento térmico a partir de la segunda semana de exposición a altas temperaturas. Como se había comentado antes los polifenoles tienen un efecto antioxidante protegiendo a los lípidos por lo que su disponibilidad se verá afectada durante el proceso de oxidación debido a su función antioxidante como recubrimiento de las partículas lipídicas (Velasco *et al.* 2002). A partir de la segunda semana se aprecia un aumento en el contenido de hidroxitirosol que procede de la hidrólisis de los derivados de la oleuropeína (3,4 DHPEAEDA y 3,4 DHPEEAEA).

De manera general se registró un descenso de la concentración de los derivados secoiridoides del hidroxitirosol. El 3,4 DHPEAEDA fenol mayoritario (Tabla 5.6), mostró el descenso más rápido. Sin embargo, el tirosol y los derivados secoiridoides del tirosol (pHPEAEDA y pHPEAEA) mostraron una mayor estabilidad, mientras que el pinosínol no se vio afectado de manera importante, por las condiciones de oxidación forzada. Estos resultados coinciden con los observados por Dhouha *et al.* (2015) donde también se observó mayor estabilidad para muestras que permanecieron cerradas. De entre las variedades analizadas, los aceites de la variedad 'Blanqueta' fueron los que se registraron las pérdidas de compuestos fenólicos más importantes.

El 3, 4-DHPEA-EDA es la forma dialdehídica del ácido descarboximetilo elenólico, unida al hidroxitirosol, cuya degradación unida a los otros productos derivados secoiridoides del hidroxitirosol, es un indicador del índice del estado de autooxidación de las grasas, esto previo a la degradación de ácidos grasos, según los estudios realizados por Di Maio *et al.* (2012).

5.10 ÁCIDOS GRASOS

Tabla 5.6 Variación en ácidos grasos para las tres variedades durante el tratamiento térmico.

ÁCIDOS GRASOS	BLANQUETA				HOJIBLANCA				PICUAL			
	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6	T0	T2	T4	T6
C16:0	16.56±0.04	16.45±0.00	16.62±0.05	16.83±0.1	10.84±0.12	11.01±0.27	11.17±0.42	11.02±0.46	11.50±0.10	11.49±0.07	10.81±0.04	11.89±0.19
C16:1	1.64±0.00	1.62±0.00	1.79±0.05	1.86±0.03	0.89±0.01	0.93±0.10	0.96±0.07	0.99±0.03	1.20±0.01	1.19±0.00	1.26±0.14	1.35±0.09
C17:0	0.18±0.00	0.17±0.00	0.16±0.01	0.18±0.01	0.22±0.00	0.23±0.01	0.21±0.01	0.23±0.01	0.07±0.00	0.07±0.00	0.06±0.00	0.07±0.00
C17:1	0.29±0.00	0.29±0.00	0.30±0.01	0.32±0.01	0.34±0.00	0.36±0.03	0.32±0.03	0.36±0.01	0.09±0.00	0.09±0.00	0.08±0.01	0.10±0.01
C18:0	2.09±0.01	2.09±0.00	1.88±0.08	1.93±0.06	3.07±0.01	2.97±0.22	2.73±0.20	2.86±0.05	2.80±0.00	2.79±0.02	2.56±0.05	2.58±0.04
C18:1	57.99±0.23	58.27±0.00	56.18±1.20	56.72±0.51	73.97±0.25	73.22±1.72	74.35±0.52	73.02±1.27	78.45±0.07	78.63±0.07	78.94±1.14	77.86±1.38
C18:2	19.26±0.04	18.99±0.00	19.93±0.29	20.34±0.36	8.06±0.06	8.23±0.55	8.66±0.28	8.19±0.22	3.83±0.03	3.81±0.06	4.18±0.00	3.91±0.10
C18:3	1.05±0.00	1.02±0.00	1.13±0.03	1.10±0.10	1.30±0.06	1.24±0.01	1.25±0.13	1.16±0.07	1.16±0.05	1.15±0.05	1.13±0.06	1.07±0.15
C20:0	0.21±0.00	0.21±0.00	0.19±0.02	0.14±0.03	0.25±0.00	0.22±0.05	0.17±0.03	0.16±0.01	0.21±0.00	0.21±0.00	0.08±0.01	0.15±0.00
C22:0	0.11±0.00	0.11±0.00	0.07±0.00	n.d	0.09±0.00	0.09±0.00	n.d	n.d	0.08±0.00	0.09±0.00	n.d	n.d
C24:0	0.26±0.02	0.29±0.00	1.12±1.15	n.d	0.37±0.13	0.87±1.19	n.d	n.d	0.46±0.06	0.42±0.01	n.d	n.d

Valores medios ± SD (n=3)

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico con el software Star Varian Interactive Graphics y utilizando el Paquete Microsoft Office Excel 2013.

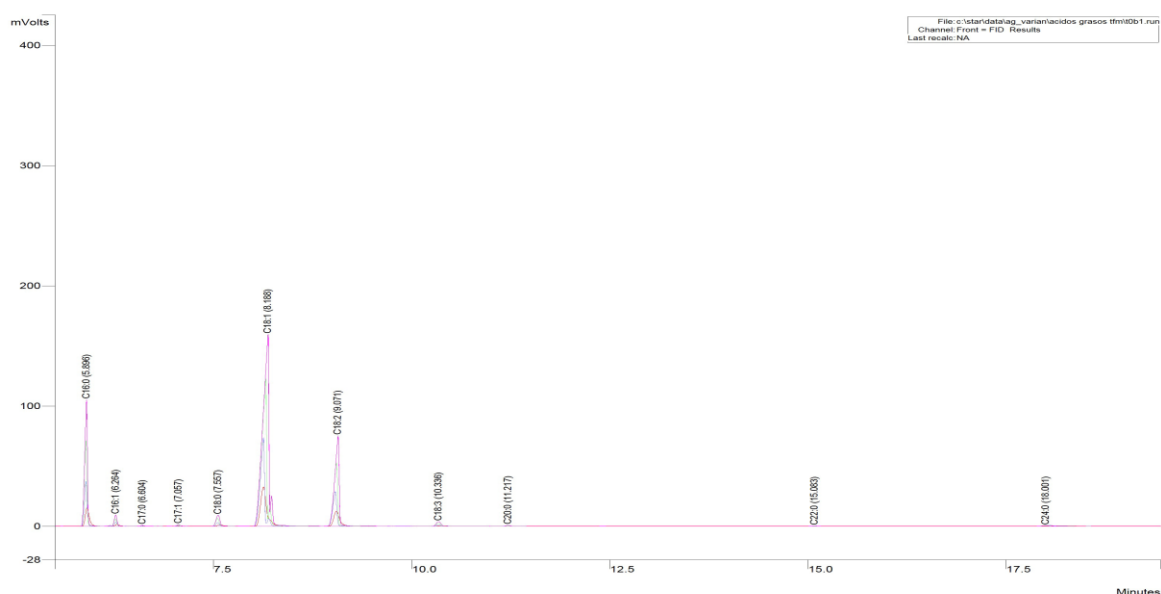


FIGURA 5.17 Variación en ácidos grasos para la variedad 'Blanqueta' durante el tratamiento térmico.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los ácidos grasos mediante el software Star Varian Interactive Graphics.

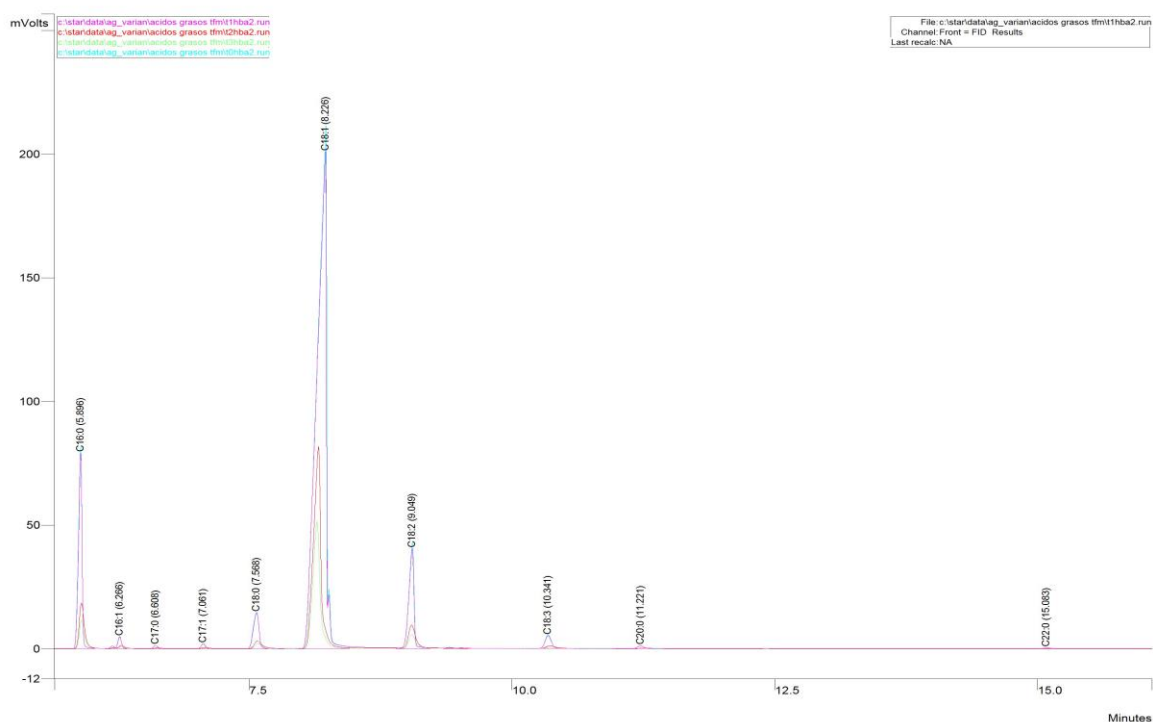


FIGURA 5.18 Variación en ácidos grasos para la variedad 'Hojiblanca' durante el tratamiento térmico.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los ácidos grasos mediante el software Star Varian Interactive Graphics.

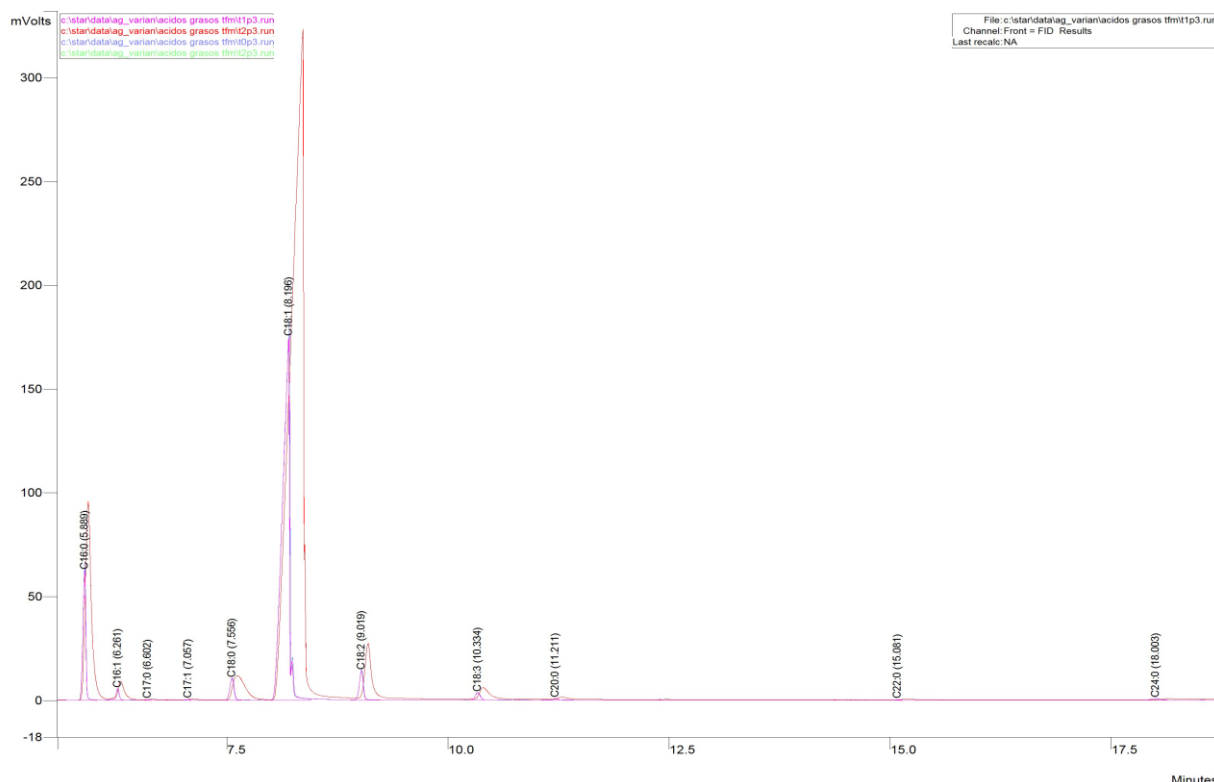


FIGURA 5.19 Variación en ácidos grasos para la variedad ‘Picual’ durante el tratamiento térmico.

Fuente: Generadas a partir de los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los ácidos grasos mediante el software Star Varian Interactive Graphics.

En general se aprecia importantes diferencias en la composición de ácidos grasos de los aceites analizados con un porcentaje bajo de ácido oleico y elevado de linoleico para los aceites de la variedad ‘Blanqueta’ mientras que en el caso del aceite de la variedad ‘Picual’ este contiene un porcentaje muy alto de ácido oleico y muy bajo de linoleico lo que determina en grandes medidas, junto con la presencia de antioxidantes naturales, la susceptibilidad de cada aceite a la oxidación.

Los análisis realizados para la composición en ácidos grasos (Tabla 5.6) no mostraron un cambio importante en las concentraciones de los ácidos grasos mayoritarios C16:0 y C18:1 por la degradación como efecto de la autooxidación, para las variedades analizadas durante las seis semanas, sin embargo en el caso de la variedad ‘Blanqueta’ debido a que presenta un menor porcentaje de ácido oleico en su composición inicial, con respecto a las otras variedades analizadas su

degradación fue mayor en el porcentaje total, considerando la compensación de los demás ácidos grasos, además que su contenido en ácidos grasos polinsaturados es mayor y estos son más sensibles a la oxidación y por lo tanto presentan menor estabilidad. Todo esto en base lo expresado por Gómez-Alonso *et al.* (2004) siendo que el decremento del ácido oleico será mayor cuanto mayor sea la disminución en ácido linoleico y ácido linolénico.

Cabe resaltar que en el caso de la variedad 'Picual' tanto la composición en ácidos grasos (alto contenido en oleico) como el alto contenido de fenoles y su efecto antioxidante provocó una mayor estabilidad en la composición de ácidos grasos, principalmente para el (C18:3) y (C18:2) cuya degradación da lugar a compuestos como *2,4-decadienal* y *3-nonenal* (Tabla 5.5) a partir del ácido linoleico y *hexanal* y *pentanal* como producto del 13-hidroperóxido linoleico y algunos otros compuestos como mezclas de aldehídos y algunos ácidos grasos de cadena corta (Boskou, 1996).

6. CONCLUSIONES

1.-Durante el proceso de oxidación forzada a 60 °C se observa un ligero incremento de la acidez de los aceites siendo este más importante en los aceites de la variedad 'Blanqueta'. No se supera los límites para la categoría virgen extra.

2.- El índice de peróxidos aumento de forma exponencial durante la oxidación forzada de los aceites siendo este incremento más marcado en los aceites de la variedad 'Blanqueta' y en menor medida en los de 'Picual'. Se observa un descenso final por la degradación final de los peróxidos.

3.- Los valores de K232 y K270 aumentaron de forme exponencial durante las dos primeras semanas en la variedad 'Blanqueta' y cuatro semanas en la variedad 'Hojiblanca' superando los límites para la categoría virgen extra.

4.- En los perfiles de compuestos volátiles los picos obtenidos para las mismas variedades en distintos tiempos se puede observar un decenso en los compuestos volatiles de seis y cinco atomos responsables de los atributos positivos en el aceite de oliva virgen y virgen extra

5.- Durante la oxidación forzada se sintetizan compuestos volatiles de oxidación secundaria como heptanal, octanal, trans-2-heptenal, 1-octen-3-ona y nonanal siendo estos presentes desde un T2 para las tres varieades.

6.- En la concentracion de pigmentos se puede apreciar una disminución mayor con respecto a 'Blanqueta'. A partir de un T6 existe una tendencia a estabilizarse la concentración de pigmentos para las tres variedades.

7.- Los contenidos de tocoferoles mostraron un ligero incremento en el alfa tocoferol y tocoferoles totales tras dos semanas de almacenamiento para las tres variedades, para un posterior descenso, para la variedad 'Picual' el contenido de alfa tocoferol fue mayor hasta aun T6.

8.- El descenso de la concentración de polifenoles fue lineal en las tres variedades, siendo más marcado en los aceites de las variedades 'Hojiblanca' y 'Blanqueta'.

9.- Los derivados secoiridoides del hidroxitirosol mostraron un descenso durante la oxidación forzada, siendo el 3,4 DHPEAEDA, el que mostro el descenso más rápido. Los derivados secoiridoides del tirosol (pHPEAEDA y pHPEAEA) mostraron una mayor estabilidad, mientras el pinoresinol no se vio afectado de manera importante.

10.-La composición en ácidos grasos, que fue muy diferente para las tres variedades analizadas, donde ´Picual ´ fue la que más alto contenido en oleico presento, provocando así una mayor estabilidad en la composición de ácidos grasos y las variedades con un porcentaje bajo de ácido oleico y elevado de linoleico como ´Blanqueta´ fueron la que mayor degradación oxidativa sufrieron.

11.-La metodología de oxidación forzada propuesta resulto útil para establecer diferencias en cuanto a tiempos de oxidación de los aceites de las tres variedades.

12.- Los compuestos fenólicos como hidroxitirosol y la oleuropeina (y sus derivados) y el análisis de los parámetros de calidad como K232 y K270 podrían ser utilizados para el desarrollo de un modelo predictivo que permita la determinación de la vida útil de los aceites de oliva virgen extra en condiciones de oxidación forzada.

7. NOMENCLATURA

Abreviatura y/o Símbolos	Completo	Abreviatura	Completo
mL	Militros	AOVE	Aceite de oliva virgen extra
µL	microlitros	AOV	Aceite de oliva virgen
Kg	kilogramo	AO	Aceite de oliva
g	gramos	IUPAC	UNIÓN INTERNACIONAL DE QUIMÍCA PURA Y APLICADA (por sus siglas en ingles).
p.p.m	Partes por millón (mg/Kg)	UE	Unión Europea
meq	Miliequivalentes	et al.	Varios
L	Litros	pp.	Paginas
min.	Minutos		
r.p.m	Revoluciones por minuto		
°C	Grados Centígrados		
SD	Desviación estándar		
°T	Temperatura		
nm	nanómetros		
mg	miligramos		
UV	Ultra violeta		

8.-BIBLIOGRAFÍA

1. Boskou D. (2006). SOURCES OF NATURAL PHENOLIC ANTIOXIDANTS. *Trends In Food Science & Technology*, 17, 505–512.
2. Boskou D. (1996). *Olive Oil. Chemistry and Technology*. AOCS PRESS, Champaign Illinois, pp.52-70 y 98-100.
3. Di Maio, Esposto., Staticchi A., Selvaggi R., Veneziani G., Urbani S., Servili M. (2012). Characterization of 3,4-DHPEA-EDA OXIDATION PRODUCTS IN VIRGIN OLIVE OIL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY. *Food Chem*, 2013 Jun 1;138(2-3):1381-91.
4. Espínola F. (2015). COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y SU RELACIÓN CON EL ANÁLISIS SENSORIAL. AMV Ediciones, Universidad de Jaén. pp11-21.
5. Granados J. (2000). ENCICLOPEDIA DEL ACEITE DE OLIVA, *Historias y Leyendas del Aceite de Oliva*. Editorial Planeta, BARCELONA ESPAÑA. pp 71-72.
6. Gómez- Alonso S., Mancebo-Campos V., Salvador M., Fregapane G.. (2004). OXIDATION KINETICS IN OLIVE OIL TRIACYGLICEROLS UNDER ACCELERATED SHELF-LIFE TESTING (25-75°C). *European Journal Lipid Science Technology*, 106, 369-375.
7. Gonçalves R., Rosa L., Gonçalves R., Sánchez A., Março P., Marques S., Matsushita M. & Valderrama P. (2018). MONITORING THE OXIDATIVE STABILITY OF MONOVARIETAL EXTRA VIRGIN OLIVE OILS BY UV–VIS SPECTROSCOPY AND MCR–ALS. *Food Analytical Methods*, 11, 1936-1943.
8. J. Velasco, M.C. Dobarganes y G. Márquez-Ruiz. (2002). OXIDACIÓN EN SISTEMAS LIPÍDICOS HETEROFÁSICOS: EMULSIONES ACEITE EN AGUA. *Grasas Y Aceites*, 53, 239-247.

9. Jebeur H., Zribi A., Ridha Abdelhedi & Bouaziz M. (2015). EFFECT OF OLIVE OIL STORE CONDITIONS ON CHEMLALI OLIVE OIL QUALITY AND THE EFFECTIVE ROLE OF FATTY ACIDS ALKYL ESTERS IN CHECKING OLIVE OILS AUTENTICITY. *Food Chemistry*, 169, 289-296.

10. Krichene D., Salvador M., Fregapane G. (2015). STABILITY OF VIRGIN OIL PHENOLIC COMPOUNDS DURING LONG-TERM STORE (18 MONTHS) AT TEMPERATURES 5-50 °C. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 63, 6779-6786.

11. Li X.& Wang S. (2018). SHELF LIFE OF EXTRA VIRGIN OLIVE OIL AND ITS PREDICTION MODELS. *Journal Of Quality*, 2018,1-15.

12. Lozano-Sánchez J., Bendini A., Quirantes-Piné R., Cerretani L., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A. (2013). MONITORING THE BIOACTIVE COMPOUNDS STATUS OF EXTRA-VIRGEN OLIVE OIL AND STORAGE BY PRODUCTS OVER THE SHELF LIFE. *Food Control*, 30, 606-615.

13. Mancebo-Campos V., Fregapane G., Salvador M. (2008). KINETIC STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF AN ACCELERATED OXIDATIVE STABILITY TEST TO ESTIMATE VIRGIN OLIVE OIL POTENTIAL SHELF LIFE. *European Journal Lipid Science Technology*, 110, 969-976.

14. J. Papaseit T., Roger de Beiiort, P. Cabré. (1988) RELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS DE CALIDAD Y LAS MEDIDAS DE ESTABILIDAD RANCIMAT EN ACEITES DE OLIVA. *ARXIU de l Ex. Sup d Ag icultura de Barcelona*, Num 11 Pag 33 pag 42.

15. PERI C. (2014). THE EXTRA-VIRGIN OLIVE OIL HANDBOOK. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 21-31.

16. Reglamento Europeo No. 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2016/2095 DE LA COMISIÓN de 26 de septiembre de 2016. Anexo 1.

17. Stoll L., Martins A., Oliveira De Silva A., Haas T., Hickmann S. & de Oliveira A. (2016). ACTIVE BIODEGRADABLE FILM WITH ENCAPSULATED ANTHOCYANINS: EFFECT ON THE QUALITY ATTRIBUTES OF EXTRA-VIRGIN OLIVE OIL DURING STORAGE. *Wiley Journal Food Processing And Preservation*, 10.1111, 13218.
18. Oueslati, J., Anniva, C., Daoud, D., Tsimidou, M., Z. & Zarrouk M, (2009). Virgin Olive Oil (VOO) production in Tunisia. THE COMMERCIAL POTENTIAL OF THE MAJOR OLIVE VARIETIES FROM THE ARID TATAOUINE ZONE. *Food Chemistry*, 112, 733-741.