



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

**DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE LA
ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE OLIVA
VIRGEN DE LA VARIEDAD “PICUAL”**

Alumno: Carmen Expósito Fernandez

Tutor/a: Gabriel Beltrán y Antonio Jiménez
Dpto.: Centro IFAPA de Mengibar

22/11/2021



GABRIEL BELTRAN MAZA Y ANTONIO JIMENEZ MARQUEZ, INVESTIGADORES TITULARES DEL IFAPA CENTRO VENTA DEL LLANO DE MENGIBAR,

Como **TUTORES** de D^a Carmen Expósito Fernandez, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2020-2021.

INFORMAN: Que el presente trabajo fin de máster, “DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE PICUAL” ha sido realizado por D^a Carmen Expósito Fernandez, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. D. Gabriel Beltrán y Antonio Jiménez.

Jaén, a 22 de noviembre de 2021

Fdo.: Carmen Expósito Fernandez

Fdo.: Gabriel Beltrán

Fdo.: Antonio Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A D. Gabriel Beltrán Maza y D. Antonio Jiménez por su disponibilidad, dedicación y orientaciones.

A todos los compañeros del Máster en Olivicultura y Elaiotecnia, por todas las experiencias que hemos compartido y que siempre recordaré.

A mis hijos, padres, hermana, y en especial a mi compañero de vida, sin el cual nunca hubiera podido realizar este master.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2. ANTECEDENTES.

2.1. CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

2.1.1. Fracción mayoritaria(saponificable)

2.1.2. Fracción minoritaria (insaponificable)

2.2. PROCESO DE OXIDACION

2.2.1. Auto oxidación

2.2.2. Oxidación Fotosensible

2.2.3. Productos de Auto-oxidación

2.3. LA ESTABILIDAD OXIDATIVA. ANTIOXIDANTES

2.4. COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS ACEITE DE LA VARIEDAD “PICUAL”

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.2. EXTRACCIÓN ACEITE

3.3. DETERMINACIONES ANALITICAS

3.3.1. Determinación Poli fenoles Totales

3.3.2. Determinación Amargor (k225)

3.3.3. Determinación Estabilidad

3.3.4. Determinación Tocoferoles

3.3.5. Determinación pigmentos (clorofilas y carotenos)

3.3.6. Determinación de los componentes de ácidos grasos

3.4. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

3.4.1. Tratamiento de datos.

3.4.2. Modelos Multivariantes

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES

4.2. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

4.3. REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

4.4. REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARADOS (PLS1)

5. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos medios de la composición acídica. Fuente: “Venta del Llano” en Mengibar, Jaen.

Tabla 2: Composición en ácidos grasos del aceite de oliva. Fuente: FAO Codex Alimentarias (2015).

Tabla 3: Datos calculados a partir de las muestras tomadas. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4: Datos de correlación y validación. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5: Coeficientes de regresión de MLR. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6: Coeficientes de regresión de PLS. Fuente: Elaboración propia.

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Olivo Centenario. Fuente: Internet.

Ilustración 2: Corte transversal. Fuente: Aceites Oliva España Universidad de Córdoba.

Ilustración 3: Fruto de la variedad Picual. Fuente: Mundo Plantas

Ilustración 4: Clases de polifenoles. Fuente: Lozano Sanchez J, 2009

Ilustración 5: Olores y sabores de la variedad Picual. Fuente: Directo del Olivar

Ilustración 6: Mecanismo de auto oxidación. Fuente: Boskou, 1996.

Ilustración 7: Sistema Abencor. Fuente: Intaex.

Ilustración 8: Rancimat. Fuente: Web oficial metrohm.

Ilustración 9: Cromatógrafo de gases. Fuente: Web oficial de Huazheg.

Ilustración 10: Imagen de programa descrito. Fuente: Camo.

Ilustración 11: Grafico del análisis de componentes principales para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 12: Grafico de PCA sin normalizar para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 13: Grafico de MLR (regresión lineal múltiple) para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 14: Grafica de MLR normalizado mean. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 15: Grafico de PLS1 (regresión por mínimos cuadrados parados) para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 16: Grafico de PLS1 normalizado mean. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 17: Imagen de datos para realizar la tabla MLR. Fuente: Elaboración propia.

Ilustración 18: Imagen de datos para realizar la tabla PLS 1. Fuente: Elaboración propia.

ABREVIATURAS

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

K225: Coeficiente de absorbancia a 225 nm

K232: Coeficiente de absorbancia a 232 nm

K270: Coeficiente de absorbancia a 270 nm

mL: Mililitro

N: Normalidad

nm: Nanómetro

mg: miligramo

Kg: kilogramo

ppm: partes por millón

g: gramos

rpm: revoluciones por minuto

L: litro

ml: mililitro

NaOH: hidróxido potásico

PCA: Análisis de Componentes Principales

PLS1: Regresión por mínimos cuadrados

MLR: Regresión Lineal Mínima

RMSE: Error cuadrático medio

Pol Tot: Polifenoles Totales

Tocf Tot: Tocoferoles totales

Pig Carot: Pigmentos Carotenoides

Pig Clorf: Pigmentos Clorofílicos

RESUMEN

El aceite de oliva virgen extra de la variedad 'Picual' se caracteriza por su elevada vida útil. Para llevar a cabo una predicción de ésta se lleva a cabo la determinación de la estabilidad oxidativa mediante el equipo Rancimat, lo que en el caso de los aceites de la variedad 'Picual', por su elevada estabilidad, es tedioso y en ocasiones da lugar a errores en la determinación.

En este trabajo se han aplicado diferentes metodologías de análisis multivariante (PCA, MLR y PLS) para la obtención de un modelo de predicción de la estabilidad oxidativa de los aceites de la variedad 'Picual' a partir de su composición. Para ello se han empleado un total de 188 muestras de aceite a los que se le ha determinado la composición en ácidos grasos, y el contenido en los principales compuestos minoritarios: polifenoles, tocoferoles, pigmentos carotenoides y clorofílicos.

Se ha observado que, de entre los compuestos analizados, los Polifenoles por su elevada actividad antioxidante, son los componentes que inciden de forma más importante en la estabilidad oxidativa de los aceites de la variedad 'Picual'. De entre los métodos de análisis multivariante evaluados, es el PLS el que permite obtener un modelo de predicción de la estabilidad oxidativa más robusto y con menor número de variables. Disponer de un modelo de predicción a partir de la composición del aceite permitiría predecir la estabilidad oxidativa de forma inmediata.

ABSTRACT

The extra virgin olive oil of the 'Picual' variety is characterised by its high shelf life. To carry out a prediction of this is carried out the determination of the oxidative stability through the equipment Rancimat, which in the case of the oil of the variety 'Picual', for its high stability, is tedious and sometimes gives rise to errors in the determination.

In this work, different multivariate analysis methodologies (PCA, MLR and PLS) have been applied to obtain a model of prediction of the oxidative stability of oils of the Picual variety from its. A total of 188 oil samples have been used to determine the composition in fatty acids, and the content in the main minority compounds: polyphenols, tocopherols, carotenoid pigments and chlorophylls.

It has been observed that, among the compounds analyzed, Polyphenols due to their high antioxidant activity are the components that have the most important influence on the oxidative stability of oils of the variety 'Picual'. Among the multivariate analysis methods evaluated, it is the PLS that allows to obtain a more robust oxidative stability prediction model with fewer variables. Having a prediction model from the composition of the oil would allow to predict oxidative stability immediately.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS



1.1 INTRODUCCIÓN

El origen del cultivo del olivo se sitúa en las regiones de las antiguas Persia y Mesopotamia y se remonta a 4.000 años a C. aproximadamente (Boskou, 1996). Los vestigios encontrados en Siria, Palestina, Anatolia, Egipto, dejan constancia de la extensión de los olivares en la época, pero no es hasta el siglo XVI a. A. cuando los fenicios comienzan a difundir el olivo por las islas griegas para, más adelante en el siglo VI a. C. propagarlo por toda la cuenca del Mediterráneo.

Existen numerosas citas en la literatura concernientes al cultivo del olivo y a los usos del aceite. En ésta está recogida su introducción en la alimentación y su comercialización, así como el empleo del aceite como ungüentos contra grietas y quemaduras y su uso en lámparas para el alumbrado.

El olivo fue introducido en España hacia el año 1050 a.C. por los fenicios pero no comenzó a desarrollarse hasta la llegada de Escipión (212 a. C.) y la dominación de Roma (45 a.C.).



Ilustración 1: Olivo Centenario. Fuente: Internet.

Actualmente España es el país con el mayor olivar del mundo (1,9 millones de hectáreas) además de ser el mayor productor y exportador mundial (41,2€ de la producción mundial), concentrándose en Andalucía el 60 % de la superficie y el 75 % de la producción de aceite de oliva y aceituna de mesa en España.

En lo que respecta al consumo de aceite de oliva, el promedio anual es de 560.000 toneladas. El olivo (*Olea europea* L) es la única especie de la familia Oleaceae con fruto comestible.

Es un árbol con un tamaño mediano, que en casos extremos alcanza los 10 metros de altura dependiendo de la variedad y que puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda et al., 2000). Su tamaño y potencial para dar fruto está muy relacionado con las condiciones ambientales, aunque el olivo es un árbol con mucha capacidad de adaptación. Su copa natural es redondeada y es en la superficie de ésta donde se localiza el fruto ya que el olivo adquiere intensidades de luz elevadas para desarrollar los brotes (Tombessi y Cartechini, 1986).

Es un árbol polimorfo que tiene una etapa juvenil con hojas claramente diferentes de las que se observan en la etapa adulta. Sus hojas son persistentes pudiendo sobrevivir incluso más de tres años. El desarrollo de la inflorescencia en la yema es bastante uniforme. El tiempo que transcurre desde la diferenciación de la primera flor hasta la última, no suele exceder de dos semanas.

En condiciones normales de desarrollo, todos los ovarios que no han sido fertilizados caen, quedando en el árbol únicamente aquellos que terminarán por transformarse en sus frutos normales, las aceitunas. No obstante, en algunas variedades de olivo es relativamente frecuente que pueden desarrollarse frutos partenocárpicos conocidos como zofairones.

La aceituna es una drupa compuesta por tres tejidos: el exocarpo (1-2%), mesocarpo (70-90%) y endocarpo (9-27%) que contiene una única semilla (1,2-3,5%).



Ilustración 2: Corte transversal. Fuente: Aceites Oliva España Universidad de Córdoba.

El olivo florece al final de la primera en el hemisferio norte y la lignificación del endocarpo tiene lugar entre las 10 y 12 semanas después de la floración (SDF), ocurriendo en ese momento la biosíntesis y acumulación de aceite, tanto en el mesocarpo como en la semilla (Rapoport), 2001).

La aceituna, se desarrolla durante todo el verano hasta que alcanza la maduración fisiológica en septiembre y octubre; donde el fruto alcanza su tamaño definitivo y es de color completamente verde.

A partir de este punto (alrededor de las 28 SDF) se produce la maduración organoléptica del fruto, la cual se reconoce por un viraje de color de verde a morado llegando a un tono prácticamente negro al final de la maduración (Sánchez, 1994). Este proceso dura entre 35 y 40 semanas a partir de la floración, y es el resultado de una combinación de sucesos bioquímicos y fisiológicos regulados por factores genéticos que también depende de la variedad y la edad del olivo, las condiciones climatológicas y la carga del árbol (Connor y Fereres, 2005).

Desde la fertilización hasta la maduración negra completa se observan cinco fases de desarrollo del fruto (Hartmann, 1949; Shulman y Lavee, 1979): en la fase I

se produce un periodo de latencia inicial; después de la rápida división celular se produce un crecimiento rápido de las células (a partir de los 10-15 días después de la fertilización), principalmente del endocarpo, que constituye la fase II, donde se desarrolla y se endurece el endocarpo (a principios de julio) suponiendo un 80 % del volumen total del fruto; en la fase III el crecimiento es lento y su embrión y el endocarpo alcanzan su tamaño final; en la fase IV se produce el ensanchamiento rápido del mesocarpo y comienza la biosíntesis y acumulación de aceite; durante la fase V el crecimiento rápido se frena (otoño), se produce la maduración de los frutos y se sigue acumulado aceite aunque en menor medida; la fase VI es una segunda fase de latencia. Cada parte del fruto crecerá a una velocidad diferente (Tombesi et al., 1994).

En este trabajo se ha utilizado la variedad '**Picual**', procedente de la finca experimental del centro IFAPA Mengibar Venta del Llano de distintas campañas, con un total de 188 muestras.

Características Agronómicas "Picual"

Este árbol es de vigoroso porte y de fácil cultivo, es muy productivo y poco vecero, aunque no es muy resistente a 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 graso entre el 21 y 25 %.

La Aceituna 'Picual' es un fruto de tamaño medio. Tiene forma elíptica y asimétrica y un color de piel, que cuando alcanza la madurez, presenta un color negro.



Ilustración 3: Fruto de la variedad Picual. Fuente: Mundo Plantas

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.

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. Actualmente su cultivo ocupa más de 700.000 hectáreas.

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 una 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 oleuropeina responsable del amargo e hidroxitirosol cuyo retrogusto picante se ve altamente potenciado por su alto contenido (Ávila, 2000). Esto le confiere al fruto cierto amargor que se notara con posterioridad en el aceite de oliva que se extraiga de ella.

Otra característica importante del aceite picual es su alto contenido en ácido oleico (monoinsaturado) pudiendo superar el 80 % de todo su perfil lipídico.

Esto, unido a su bajo contenido en ácidos poliinsaturados, hacen del aceite de oliva picual uno de los aceites de oliva más estables a la oxidación y al enranciamiento.

Tabla 1. Datos medios de la composición ácida de los aceites de la variedad 'Picual'.

COMPOSICION ACIDICA, %	
ACIDO PALMITICO	10,87
ACIDO ESTEARICO	3,26
ACIDO OLEICO	78,1
ACIDO LINOLEICIO	4,64

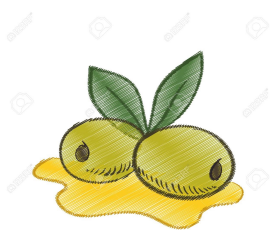
Fuente: "Venta del Llano" en Mengibar, Jaen.

Por eso, el aceite de oliva "Picual" es el más adecuado para utilizarlo en la cocina a alta temperatura, puesto que mantiene sus propiedades en varios ciclos de frituras.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es la determinación de un modelo de predicción de la estabilidad oxidativa del aceite de oliva virgen de la variedad 'Picual' a partir de su composición aplicando técnicas de análisis multivariante.

ANTECEDENTES



2.1 CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

En la composición del aceite de oliva influyen diversos factores como son: variedad de aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas, y características tecnológicas de producción. Sin embargo, los componentes del aceite de oliva, al igual que en otros aceites vegetales, pueden clasificarse en dos grupos: un grupo mayoritario, conocido como la fracción saponificable, que representa el 98-99% del peso total del aceite, y un grupo minoritario o fracción insaponificable, cuya proporción es muy pequeña respecto al total del peso del aceite, pero juega un papel muy importante para la conservación y el valor biológico del aceite de oliva.

2.1.1 Fracción mayoritaria (saponificable).

La fracción saponificable está constituida principalmente por glicéricos (triglicéricos, diglicéridos y monoglicéridos), y en menor cantidad por ácidos grasos libres, fosfolípidos y ceras.

- **Glicéridos:** Los glicéridos son ésteres de la glicerina y ácidos grasos. Dependiendo del número de grupos alcohol que se unan con ácidos grasos, se formará un triglicérido (tres ácidos grasos esterificando a la glicerina), un diglicérido (dos ácidos grasos) o un monoglicérido (un ácido graso).
- Los **triglicéridos** son el grupo mayoritario en el aceite de oliva y, según la teoría de la composición triglicérida podrían formarse hasta 70 triglicéridos diferentes en dicho aceite. Sin embargo, los triglicéridos que realmente se forman en cantidades significativas son la trioleína (OOO) entre el 40-59 %, POO entre el 15-22 %, OOL entre el 12-20 %, POL entre el 5.5-7 %, PLO entre el 4-5 %, SOO entre el 3,7 % y el POP entre el 2-4 % (Boskou, 1998), siendo P ácido palmítico, E ácido esteárico, O ácido oleico y L ácido linoleico. Los mono y diglicéridos se encuentran en menor cantidad en el aceite de

oliva, menos de 0,25 % y entre 1 y 2,8 %, respectivamente y, aunque se forman de manera natural, pueden aparecer como consecuencia de la hidrólisis de los triglicéridos debido a la alteración del aceite. Así, la presencia de 1,2-diglicéridos puede deberse a una síntesis incompleta de los triglicéridos y los compuestos 1,3-triglicéridos pueden provenir del proceso de hidrólisis, de modo que la relación entre ambos puede dar una idea de las condiciones de almacenamiento y edad de determinados aceites.

- **Ácidos grasos:** Los ácidos grasos son compuestos orgánicos constituidos por una cadena hidrocarbonada (formada únicamente por átomos de carbono e hidrógeno) que posee en un extremo un grupo carboxílico.

La cadena hidrocarbonada es la que le confiere carácter hidrófobo y consistencia oleosa y, según el número de dobles enlaces de dicha cadena, los ácidos grasos se pueden clasificar en: ácidos grasos saturados, si no tienen dobles enlaces; ácidos grasos monoinsaturados, si tienen sólo un doble enlace; y ácidos grasos poliinsaturados, si tienen más de un doble enlace.(Uceda et al., 1989).

Los aceites vegetales comestibles raramente contienen ácidos grasos de cadena ramificada o con número impar de átomos de carbono, en cambio, el número de carbonos oscila entre 14 y 24, y la cantidad de dobles enlaces varía de 0 a 3.

No obstante, la composición en ácidos grasos de aceite de oliva difiere dependiendo de la zona de producción, debido a que se ve fuertemente influenciada por la latitud, las condiciones edafoclimáticas (Fedeli, 1996), la variedad (Uceda et al., 2008) y el grado de madurez de las aceitunas de las que se obtenga (Beltrán et al. 2004).

Los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico

(C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0) oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (24:0).

De todos ellos, el que se encuentra en mayor proporción es el ácido oleico, entre el 68-81,5 %, el cual es un ácido graso monoinsaturado.

Mientras que la proporción de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico, principalmente) es inferior al 20 % y, aun menor es la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico, mayoritariamente).

Estas diferencias en la composición de ácidos grasos hacen que el aceite de oliva se diferencie del resto de las grasas vegetales, y le confieren un gran interés desde el punto de vista químico y biológico.

También, los ácidos grasos pueden encontrarse de forma libre en el aceite de oliva, aunque en una pequeña proporción y son, generalmente consecuencia de procesos hidrolíticos que se producen a nivel de los triglicéridos.

Es posible determinar la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite de oliva lo que constituye el índice de acidez, un parámetro de calidad de los aceites de oliva, por el que los aceites se clasifican en las distintas categorías (ver calidad reglamentada).

Tabla 2. Composición en ácidos grasos del aceite de oliva.

Ácidos Grasos	Nomenclatura	Límites Codex (%)
Ácido Mirístico	C 14:0	0,0-0,5
Ácido Palmítico	C 16:0	7,5-20,0
Ácido Palmitoleico	C 16:1	0,3-3,5
Ácido Margárico	C 17:0	0,0-0,3
Ácido Margaroleico	C 17:1	0,0-0,3
Ácido Esteárico	C 18:0	0,5-5,0
Ácido Oleico	C 18:1	55,0-83,0
Ácido Linoleico	C 18:2	3,5-21,0
Ácido Linolénico	C 18:3	0,0-1,5
Ácido Aráquico	C 20:0	0,0-0,6
Ácido Eicosenoico	C 20:1	0,0-0,4
Ácido Behénico	C 22:0	0,0-0,2
Ácido Lignocérico	C 24:0	0,0-0,2

Fuente: FAO Codex Alimentarius (2015).

- **Fosfolípidos:** Los principales fosfolípidos encontrados en el aceite de oliva son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. Estos compuestos se presentan en pequeñas cantidades. En aceites de oliva recién producidos pueden aparecer entre 40 y 135 mg/kg. El ácido oleico es el ácido graso predominante

en la estructura de los fosfolípidos, siendo el patrón de ácidos grasos similares al de los triglicéridos.

- **Ceras:** Constituidos por ésteres de alcoholes grasos con ácidos grasos, que se producen mediante una esterificación entre los alcoholes presentes en el aceite y los ácidos grasos libres. Las ceras del aceite de oliva se caracterizan por tener un elevado número de átomos de carbono, siendo en las más frecuentes las C-40, C-42, C-44 y C-46 (Jiménez et al., 2001). Estos compuestos se encuentran en la piel de las aceitunas y su función consiste en evitar la pérdida de agua del mesocarpio. Por eso, son más abundantes en los aceites de orujo, ya que estos se obtienen de los restos de piel y pulpa de la aceituna por extracción con disolventes.

También se ha demostrado que el contenido de ceras es mayor en aceites obtenidos por sistemas de presión con respecto a los obtenidos por centrifugación (Ranalli y Serraiocco, 1996), y entre los aceites obtenidos en primera y en segunda centrifugación, son más abundantes en los aceites de segunda centrifugación (Martínez, 2002).

2.1.2 Fracción minoritaria (insaponificable).

La fracción insaponificable representa entre 0,5 y 1,5 % del peso total del aceite de oliva y está constituido por una gran variedad de compuestos entre los que destacan: esteroides, hidrocarburos, alcoholes grasos, tocoferoles, pigmentos (carotenos y clorofilas), compuestos fenólicos, y compuestos volátiles y aromáticos.

La fracción insaponificable puede dividirse a su vez en dos grupos (Lozano et al., 2009): un grupo constituido por los compuestos relacionados con los ácidos grasos, como son los ésteres de esteroides y, un segundo grupo que incluye aquellos compuestos que no están químicamente relacionados con

los ácidos grasos, es decir, hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, pigmentos y compuestos fenólicos polares.

Los compuestos que constituyen la fracción insaponificable son difíciles de determinar de forma precisa, debido a su naturaleza compleja y baja concentración.

Además, algunos de estos compuestos están sólo presentes en el aceite de oliva virgen, debido a que desaparecen en el proceso de refinado como, por ejemplo, los compuestos fenólicos.

- **Esteroides:** Los esteroides representan el 20-30 % del total de la fracción insaponificable (Fedeli y Jacini, 1971) y comprenden un amplio grupo de compuestos que representan una estructura molecular análoga, que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. Pueden estar presentes en forma libre o esterificada con los ácidos grasos. El contenido total de esteroides en el aceite de oliva oscila entre 1130 y 2650 ppm dependiendo de la variedad de aceituna (Cert, A. et al., 1997, Aparicio y Luna, 2002). Sin embargo, el contenido de estos compuestos disminuye por oxidación, tanto durante la elaboración como en el almacenamiento del aceite de oliva, así como en el proceso de refinación (Ranalli et al., 1997, Grob et al., 1990, Paqualone y Catalano, 2000). En el aceite de oliva están presentes cuatro clases de esteroides:

Esteroides comunes (4 α -desmetilesteroides), 4 α -metilesteroides; alcoholes triterpénicos (4,4-dimetilesteroides); y dialcoholes triterpénicos. Los esteroides comunes se encuentran principalmente en forma libre y esterificada en el aceite de oliva, aunque también pueden encontrarse como estéril glucósidos y lipoproteínas.

El grupo de esteroides comunes está constituido, mayoritariamente, por: B-sitosterol, entre 75-90 % del total; A5-avenasterol, entre el 5% y 20% del total, aunque en algunas variedades puede representar el 36 % (State Chemical Laboratory, 1994); y campesterol, en un 4 %.

En menor proporción se encuentran: estigmasterol, colesterol, brasicasterol, clerosterol, ergosterol, sitostanol, campestanol, A7-avenasterol, A7-colestenol, A7-campestenol, A7 estigmastenol, A5,23-estigmastadienol, A5,24-estigmastadienol, A7,22-ergostadienol, A7,24-ergostadienol, 24-metilen-colesterol y 22.23-dihidrobrasicasterol (Calapaj et al., 1993). Los compuestos metilesteroles son productos intermedios en la biosíntesis de los esteroides, y se encuentran presentes en el aceite de oliva en pequeñas cantidades que pueden variar entre 50 y 360 ppm.

Los predominantes son; el obtusifoliol, gramisterol, cicloeucatenol y citrostadienol. Los alcoholes triterpénicos están presentes en el aceite de oliva en cantidades comprendidas entre 350 y 1500 ppm, los principales compuestos son: B-amirina, butirospermol, 24-metilencicloartanol y cicloartenol. También se encuentran presentes, aunque en menores cantidades, el ciclobranol, ciclosadol, dammaradienol, germanicol, 24-metilen-24-dihidroparkeol, taraxerol, a-amirina, 7,24-tirucalladienol, parkeol y tirucallol. Los principales dialcoholes triterpénicos identificados en el aceite de oliva son el eritrodiol y el uvaol.

- **Hidrocarburos:** El aceite de oliva contiene hidrocarburos de diversa naturaleza: terpénicos, esteroides, o policíclicos aromáticos. Los hidrocarburos terpénicos se encuentran en cantidades considerables en el aceite de oliva, fundamentalmente, escualeno y B-caroteno.

El escualeno es el componente mayoritario de la fracción insaponificable y representa más del 90 % del contenido total de hidrocarburos, siendo su contenido entre 200 y 7500 ppm en el aceite de oliva (Perrin, 1992). Este compuesto es un precursor bioquímico de la biosíntesis de los esteroides y, al igual que estos, la cantidad de escualeno en el aceite de oliva se ve influida por la variedad de la que procede y el sistema de extracción, y sufriendo una gran disminución durante el proceso de refinación (Mariani et al., 1992).

El B-caroteno se encuentra en cantidades inferiores, que varían de 0,5 a 4 ppm. Los hidrocarburos esteroideos están presentes en cantidades inferiores a 0,15 ppm en aceites de oliva vírgenes. Sin embargo, en los aceites de oliva que han sufrido un proceso de refinado el contenido de estos compuestos es superior, ya que durante dicho proceso, tiene lugar la formación de hidrocarburos, siendo el más abundante el estigmasta-3,5dieno, que se forma a partir del B-sitosterol (Cert et al., 1992). Por lo que este compuesto es muy útil a la hora de detectar fraudes en el aceite de oliva virgen.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos que se han encontrado en el aceite de oliva, aunque en cantidades comprendidas entre 1 ug/kg y 700 ug/kg, son: naftaleno, fenantreno, fluoranteno, 1,2-benzoantraceno, criseno y perileno (Fedeli, 1977).

- **Alcoholes grasos:** Los alcoholes grasos pueden ser lineales (alifáticos) o triterpénicos. La determinación de estos componentes es muy útil para la clasificación de los distintos tipos de aceites. Los alcoholes alifáticos son compuestos de estructura lineal y precursores de la formación de ceras. Los principales alcoholes alifáticos que se encuentran en el aceite de oliva son el docosanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol (Boskou et al., 1983). Estos se encuentran en concentraciones inferiores a 250 ppm en el aceite de oliva virgen, mientras que los niveles encontrados en aceites de orujo de oliva vírgenes (Grob et al., 1990).

Los alcoholes triterpénicos también denominados, 4,4-dimetilesteroles están presentes en el aceite de oliva en cantidades comprendidas entre 350 y 1500 ppm, los principales compuestos son: B-amirina, butirospermol, 24-metilencicloartanol y cicloartenol. También se encuentran presentes, aunque en menores cantidades, el ciclobranol, ciclosadol, dammaradienol, germanicol, 24-metilen-24-dihidroparkeol, taraxerol, a-amirina, 7,24-tirucalladienol, parkeol y tirucallol. Además de los alcoholes alifáticos y triterpénicos, en el

aceite de oliva se encuentran dos alcoholes diterpénicos acíclicos, Fitol y geranylgeraniol. Fitol probablemente se origina a partir de la saponificación de la clorofila y se ha encontrado en aceites de oliva vírgenes en cantidades comprendidas entre 25 y 595 ppm (Aparicio y Luna, 2002).

- **Tocoferoles:** Los tocoferoles representan entre el 2,8 y el 3,5 % del total de los componentes minoritarios del aceite de oliva, es decir, se pueden encontrar cantidades de tocoferoles comprendidas entre 100 y 300 ppm (Salvador et al., 2001), aunque, se han estudiado aceites que han llegado a contener 400 ppm (Uceda et al., 2008). Éstos son componentes terpénicos de naturaleza química similar a los esteroides, que se encuentran en el aceite de oliva sólo en forma libre,

El o-tocoferol es el más abundante, representa el 90 % del contenido total de tocoferoles, seguido de B y y-tocoferol, que se encuentran por debajo del 10 % y, el o-tocoferol en proporciones muy bajas. Cabe destacar que los tocoferoles tienen una actividad biológica vitamínica muy importante, siendo la forma la más activa y, considerándose, así como la auténtica vitamina E (Salvador et al., 2003). Además, los tocoferoles actúan como antioxidantes naturales y confieren estabilidad al aceite.

Así, en el proceso autooxidación del aceite de oliva, los tocoferoles reaccionan con los radicales peróxidos de los ácidos grasos (productos primarios de la autooxidación de la grasa), dando lugar a radicales antioxidantes libres peroxidados y, de este modo, detiene la alteración en las primeras etapas. Por otra parte, los tocoferoles se comportan como atenuadores del proceso de fotooxidación del aceite de oliva, capturando el oxígeno simple por un proceso de inhibición de éste (Kiritsakis y Osman, 1995).

Al igual que otros compuestos minoritarios del aceite de oliva, los tocoferoles pueden encontrarse en cantidades variables en función de la variedad y estado de maduración de la aceituna de la que proceden (Fedelli, 1993). También, el proceso de refinación hace disminuir drásticamente el contenido de tocoferoles en el aceite de oliva.

- **Pigmentos:** El color del aceite de oliva puede ir desde tonalidades verdes intensas hasta las doradas debido a la presencia de dos tipos de pigmentos: clorofilas y feofitinas; y carotenoides. Siendo éste el más verde cuanto mayor es el contenido de clorofilas y más amarillo-dorado cuanto mayor es el contenido carotenoides.

La composición y el contenido total de pigmentos presentes de forma natural en el aceite de oliva están influenciados por la variedad del material vegetal, el índice de madurez de la aceituna, la zona de producción, el sistema de extracción y las condiciones de almacenamiento.

Los pigmentos son parámetros importantes para determinar la calidad del aceite de oliva. Aunque, también, estén relacionados con mecanismos de auto-oxidación y fotooxidación. Las clorofilas que se encuentran en el aceite de oliva, al igual que las feofitinas, pueden ser “a” y “b”, y su contenido varía entre 1 y 20 ppm en el caso de las primeras y, entre 0,2 y 24 ppm, en el caso de las segundas (Fedelli, 1997). Sin embargo, predomina la feofitina “a”, cuya concentración puede representarse entre el 70-80% del total de pigmentos (Ranalli, 1992).

El contenido de clorofilas disminuye conforme avanza el proceso de maduración de la aceituna (Kiritsakis, 1992). Además, durante el almacenamiento, las clorofilas pueden actuar como prooxidantes en presencia de luz o como antioxidantes en la oscuridad, lo cual, le confiere un papel muy importante en la conservación del aceite de oliva (Gómez-Rico et al., 2007).

En cuanto a los carotenoides, los principales presentes en el aceite de oliva son: luteína, B-caroteno, violaxantina y neoxantina. El contenido de este tipo de pigmentos también depende del sistema de extracción, estado de maduración del fruto y variedad. Los carotenoides, principalmente el B-caroteno ejerce de protección frente a la foto-oxidación, ya que éste tiene un efecto en el mecanismo de desactivación de oxígeno singlete producido por las clorofilas en presencia de luz (Bradley y Min, 1992).

- **Compuestos fenólicos:** La fracción fenólica del aceite de oliva está formada por un conjunto de compuestos de diferentes estructuras químicas, que se encuentran principalmente en el mesocarpio de la aceituna. Son considerados parte de su sistema químico de defensa. Además, se les atribuyen otras funciones como la antimicrobiana y la antioxidante (Gutiérrez González et al., 1977). Se considera también, que contribuyen a las propiedades organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, siendo los responsables de atributos positivos como el frutado y el amargor (Carrasco et al., 2004).

Estos componentes pueden clasificarse en: ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, secoiridoides, lignanos y flavonoides (Lozano Sánchez et al., 2009). Los ácidos fenólicos se encuentran en muy pequeñas cantidades, y se subdividen en ácidos benzoicos, dentro de los cuales se encuentran el ácido benzoico, phidroxibenzóico, protocatéquico, gálico, vanílico y siríngico y, ácidos cinámicos donde se incluyen el ácido cinámico, cafeico, ferúlico, sináptico, p-cumárico y o-cumárico. Dentro de los alcoholes fenólicos se incluyen el hidroxitirosol o (3,4-hidroxifenil) etanol, el tirosol o (p-hidroxifenil) etanol y el (3,4-dihidroxifenil) etanol glucósido. Éstos también se encuentran en cantidades muy pequeñas, aunque algo superiores a ácidos fenólicos.

Los secoiridoides proceden del metabolismo secundario de los terpenos y junto con los lignanos son los más abundantes en el aceite

de oliva virgen. Los secoiridoides de mayor interés presentes en el aceite de oliva son la oleuropeina y el ligustrósido. Los lignanos mayoritarios son el pinoresinol y el acetoxipinoresinol. Los flavonoides presentes en el aceite de oliva son la luteolina y la aspigenina.

En general, la concentración de todos estos compuestos en el aceite de oliva virgen puede estar entre 50 y 200 ppm, aunque, pueden encontrarse aceites que alcancen un contenido de hasta 1500 ppm (Lozano Sánchez et al., 2009).

Las variaciones en el contenido de compuestos fenólicos de un aceite de oliva virgen pueden deberse a la variedad de aceituna, estado de madurez de la misma, variables climatológicas y agronómicas (Moussa y Gerasopoulos, 1996), el sistema de extracción y la filtración. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los aceites obtenidos por sistema de centrifugación presentan menos contenido en polifenoles que los obtenidos por decantación (Cortesi et al., 2000).

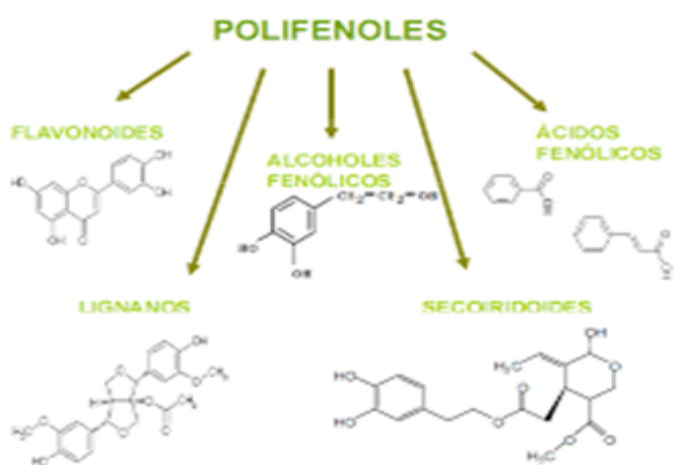


Ilustración 4: Clases de polifenoles. Fuente: Lozano Sanchez J, 2009

- **Compuestos volátiles y aromáticos.** La formación de compuestos aromáticos tiene lugar en los cloroplastos, los cuales pasan al aceite de oliva gracias a la acción de enzimas que actúan durante el molido de la aceituna y batido de la pasta, en el proceso de extracción del aceite de oliva. Se han identificado, aproximadamente, 280 compuestos diferentes en la fracción volátil, los cuales se pueden agrupar en hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, derivados del furano, derivados tiofénicos, piranonas, tioles y pirazinas (Olías et al., 1977, Cavalli et al., 2004). Sin embargo, sólo un número reducido de compuestos son los que se encuentran en cantidades apreciables y contribuyen en el aroma y sabor del aceite de oliva virgen (Aparicio et al., 1996).



Ilustración 5: Olores y sabores de la variedad “Picual”. Fuente: Directo del Olivar

2.2 PROCESO DE OXIDACION

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

aparición 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 a temperaturas mayores de 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:

2.2.1 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:

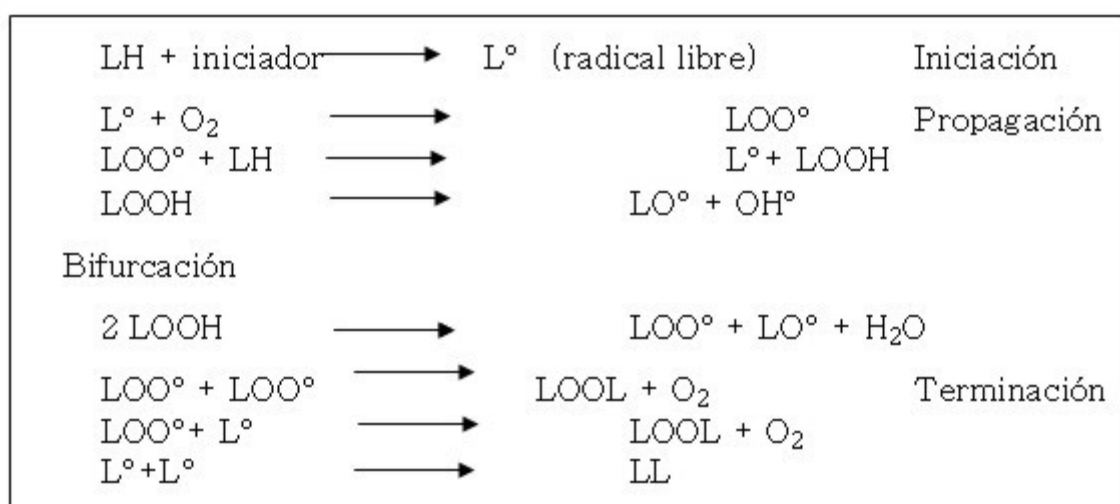


Ilustración 6: Mecanismo de auto oxidación. Fuente: Boskou,1996.

En la Ilustración 6 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.

2.2.2 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 lipídica 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 [1]caroteno como prooxidantes en la oscuridad (Boskou,1996).

2.2.3 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-decadienal, hexanal y 2-octenal pueden formarse.

2.3 LA ESTABILIDAD OXIDATIVA. ANTIOXIDANTES.

La estabilidad oxidativa de un aceite de oliva virgen por su riqueza en antioxidantes naturales y su elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados y bajo en poliinsaturados se lleva a cabo mediante sistemas acelerados. En estos sistemas de entre los factores químicos y físicos que pueden ser utilizados para incrementar las reacciones de oxidación lipídica 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 cortos (Frankel, 1998 citado en Gómez-Alonso, 2004). Para ello el método más empleado es el sistema Rancimat, en el que el aceite es sometido a elevadas temperaturas entre 98 y 140 ° C haciéndole borbotear aire de entre 12 y 20 L/h. Los compuestos de oxidación son arrastrados hasta una trampa de agua equipada con una célula de conductividad que va registrando de forma continua hasta alcanzar el tiempo de inducción.

De forma más reciente se están llevando a cabo trabajos de almacenamiento (Lema-García, 2009) citado en Lozano-Sánchez et al. (2013) 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 de 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 en estabilidad oxidativa que permita determinar la potencial vida útil por debajo de las condiciones normales de almacenamiento de los aceites de oliva virgen extra.

Antioxidantes.

Los antioxidantes pueden prevenir o retrasar el proceso de oxidación al eliminar los radicales libres, inactivando peróxidos y otras especies de oxígeno activo 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, oleuropeina y el tirosol como antioxidantes junto con la vitamina E presentes en este.

2.4 COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE DE LA VARIEDAD “PICUAL”.

El aceite de oliva virgen extra “Picual” tiene una concentración de ácido que no supera el 1%. Tiene un fuerte sabor afrutado y tiene un color verde intenso, a diferencia de otros aceites que parecen oro líquido.

La obtención del aceite de oliva picual, como el resto, se obtiene mediante sistemas mecánicos de prensado en frío y lo que permite mantener sus propiedades por completo, y que no tenga añadidos de color.

En cuanto a los valores nutricionales del aceite de oliva picual, podemos decir que son los más beneficiosos para el ser humano, por lo que debemos destacar los siguientes:

- ❑ El aceite de oliva picual tiene un alto contenido en polifenoles, de ahí nuestro estudio en esta variedad. Los polifenoles son los antioxidantes naturales que tiene el aceite de oliva picual de origen, este componente también ayuda a prevenir el envejecimiento prematuro de la piel, así como a prevenir la aparición de algún tipo de enfermedad degenerativa. Al tener un alto contenido en polifenoles, su conservación y vida es más larga, es decir, tarda más en descomponerse.
- ❑ El aceite picual tiene un alto contenido en ácido oleico: El ácido oleico es un ácido graso de fácil absorción por nuestro organismo y siempre presente en nuestra dieta mediterránea. Este componente del aceite picual es uno de los agentes de prevención de enfermedades cardiovasculares.
- ❑ El aceite de oliva picual tiene una pequeña cantidad de ácido linoleico: Es un tipo de ácido esencial que solo se puede obtener a través de la ingesta de alimentos porque nuestro cuerpo no puede sintetizarlo desde otro lado.

Debemos tener cuidado al consumir ácido linoleico, ya que puede dañar nuestra salud.

Usos del aceite de la variedad 'Picual'

El aceite '**Picual**' tiene una amplia variedad de usos, ya que es un tipo de aceite de oliva virgen extra muy versátil.

- El aceite de oliva 'Picual' tiene una alta estabilidad en su oxidación por lo que es el aliado perfecto para tus frituras. Al ser un aceite que tarda mucho en descomponerse a altas temperaturas, permite realizar varios ciclos de fritura.
- También es el completo perfecto para cocinar tus legumbres y guisos de carne o pescado, ya que le dará un toque de sabor especial y diferente al de otra variedad de aceite de oliva.
- El aceite 'Picual' se considera perfecto para cualquier tipo de conservas, y a nivel doméstico podemos utilizarlo para conservar quesos o embutidos.

Consumir aceite de oliva 'Picual' crudo es uno de los mayores manjares que nos podemos llevar a la boca. Acompañado de tostadas con jamón y tomate, podemos disfrutar de un desayuno saludable y tener múltiples vitaminas.

MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 MATERIAL VEGETAL

El estudio se ha llevado a cabo con aceites de la variedad “Picual”, obtenidos a partir de fruta recolectada en la finca experimental del Centro IFAPA Venta del Llano en Mengibar, Jaen.

3.2 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.



Ilustración 7: Sistema Abencor. Fuente: Intaex.

3.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.3.1 Polifenoles totales

La determinación del contenido en polifenoles totales se ha llevado a cabo siguiendo el método descrito por Vazquez-Roncero et al., (1973), modificado.

Se pesan 1± 0,01 gramos de aceite en un tubo falcon de 15 mL de capacidad, se añaden 5 mL de hexano y se agita durante 15 segundos para disolver el aceite. La extracción de los compuestos fenólicos consiste en una extracción líquido-líquido llevada a cabo por contacto añadiendo un volumen de 2 mL de metanol: agua (60:40) y agitando durante 90 segundos. A continuación, el tubo se introduce en una centrifuga a 4000 rpm durante 6 minutos para separar las dos fases líquidas obtenidas.

El extracto de mayor densidad se extrae con ayuda de una pipeta pasteur de cristal y se vierte en un matraz aforado de 10 mL de capacidad. Esta operación se repite hasta 3 veces y el extracto recogido en el matraz aforado se enrasa hasta 10 mL con agua destilada y se deja decantar con el fin de separar los restos de aceite que pueden quedar en el extracto.

Después de la extracción de los polifenoles del aceite se realiza la dilución de lectura, para lo cual se toma un matraz aforado de 50 mL al que se agregan una cantidad de extracto determinada por valor obtenido en el análisis de K225 (amargor), 35 mL de agua bidestilada y 2,5 mL de reactivo de Foli-Ciocalteau. Se agita y dejan pasar tres minutos para que se desarrolle la reacción, adicionándose 5 mL de disolución NaOH al 5 % (p/v) para crear el medio básico. Se lleva a un volumen final de 50 mL con agua bidestilada y se agita para homogenizar la mezcla.

Después de 10 minutos de tiempo de reacción se mide la absorción a una longitud de onda de 725 nm. Como referencia se emplea una disolución preparada de igual forma a la que no se le añade el extracto de polifenoles. Para la medida de la absorción se emplea un espectrofotómetro Varían 50 Bio UV-visible. Los resultados se expresan en mg/kg de ácido cafeico. Esta cuantificación se lleva a

cabo mediante la correspondiente recta de calibrado.3.3.2 Determinación del amargor (K225).

La determinación del amargor medido como K225 se ha realizado según el método desarrollado por Gutiérrez y Perdiguero (1992). Para realizar la extracción se emplea una columna de extracción en fase sólida SPEC C18 (Baker, J.T.) con un volumen de 6 mL y un peso de fase estacionaria de 500 mg, que se coloca en un colector múltiple de vacío, el cual mediante una bomba de aspiración realiza el vacío y hace pasar los reactivos a través de la columna hasta separar los compuestos fenólicos de la muestra.

A continuación, se pesan 1+- 0,01 gramos de aceite en un vial, se disuelven en 5 mL de hexano y se vierten en la columna SPE, por la que se hace pasar la muestra con ayuda de la bomba de aspiración que realiza el vacío.

Para asegurar que se vierte toda la muestra de aceite en la columna se realizan dos enjuagues del vial con 5 mL de hexano cada uno, y, para eliminar cualquier resto de grasa que pueda quedar en la columna se hacen pasar a través de ésta otros 5 mL de hexano, esta vez sin enjuagar el vial.

Finalmente, los compuestos que han quedado retenidos en la columna se diluyen haciendo pasar en cuatro ocasiones, volúmenes de 5 mL de metanol: agua (50:50). El diluido se recoge en un matraz aforado y se lleva a un volumen final de 25 mL con metanol: agua (50:50), y se procede a la lectura del mismo en un espectrofotómetro tipo UV-visible (Varían, España), a la longitud de onda de 225 nm, empleando la mezcla metanol: agua como referencia.

3.3.3 Determinación de la estabilidad oxidativa.

La estabilidad oxidativa de un aceite considerada como el tiempo necesario para que comience a presentar síntomas de rancidez, se determina mediante el método Rancimat (Gutiérrez González, 1989).

El Rancimat, es un método de medida de estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas, basado en la inducción de la oxidación de la muestra por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire. De esta manera permite estimar el tiempo de inducción o tiempo de estabilidad oxidativa, siendo este el momento a partir del cual la muestra ha superado el tiempo en el que permanece estable, y siendo por tanto indicativo de una pérdida de calidad y vida útil de la muestra.

Para la obtención de los resultados se debe pesar en cada tubo de reacción 3 g de cada muestra, el cual se coloca en el bloque de calentamiento, es decir un hueco donde reciben calor y son conectados a unas vasijas, colocadas detrás, estas vasijas están llenas con 75 mL de agua bidestilada, en cuyo interior se sitúan unos electrodos previamente lavados con agua bidestilada, jabón y acetona.

Una vez colocado todo, se pone en funcionamiento el aparato, con calefacción a 100 ° C y una corriente de aire seco situada entre 15 y 20 L/h. Durante el proceso, el aceite oxidado desprende gases (principalmente metano) que son retenidos en las vasijas por el agua y quedan registrados gracias a un cambio en su conductividad.

Todo este procedimiento es recogido por el equipo Rancimat 679 (Metrohm, A.G; Herisau, Suiza), mediante una gráfica en la que aparece una línea constante hasta que se produce una subida brusca, indicando la formación de dichos compuestos.

El tiempo en horas transcurrido desde el inicio del proceso hasta el punto de mayor curvatura de esta curva experimental (fin del proceso inductivo) es considerado el valor de estabilidad ante la oxidación del aceite que se analiza.

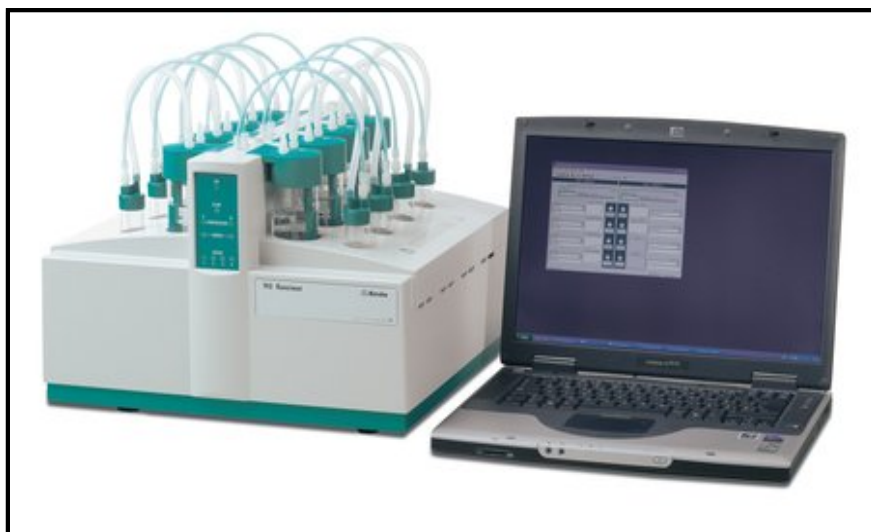


Ilustración 8: Rancimat. Fuente: Web oficial Metrohm.

- En el método Rancimat se acelera la oxidación de la muestra calentando el recipiente de reacción y haciendo pasar aire continuamente a través de la muestra a un flujo controlado. Se forman primero peróxidos y luego, a partir de estos, productos secundarios de oxidación, entre ellos ácidos orgánicos volátiles de bajo peso molecular.
- Los productos secundarios de oxidación volátiles son transportados por la corriente de aire a un segundo recipiente que contiene agua destilada, en el que se monitoriza de forma continua la conductividad.
- Cuanto mayor es el periodo de inducción mayor es la estabilidad ante la oxidación.

3.3.4 Determinación de tocoferoles.

Para la determinación de los tocoferoles se emplea el método número 2432 de IUPAC (IUPAC, 1992). Para ello, se pesan $1,50 \pm 0,01$ gramos de aceite filtrado que se lleva a un volumen final de 10 mL con la misma fase móvil utilizada en el

análisis cromatográfico, es decir, isopropanol al 0,5 % en hexano, se agita para disolver completamente el aceite y se vierte en viales para su análisis en HPLC.

El cromatógrafo empleado es un HPLC (cromatógrafo de líquidos) compuesto de una bomba isocrática, Agilent technologies 1200 series, un detector UV de longitud de onda programable (Agilent, España). La columna utilizada es Lichosphere Si60 (Merck) de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 µm. La detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 296 nm, y a una temperatura de 25°C.

El volumen de muestra inyectado es de 20 µL y la duración del análisis ha sido 20 minutos. La identificación de los tocoferoles se realiza comprando los tiempos de retención de los patrones puros (Sigma-Aldrich Co. LLC). 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.

3.3.5 Determinación de pigmentos (clorofilas y carotenos)

La determinación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides se ha realizado de acuerdo con el método descrito por Mínguez et al. (1990). Se pesan 1,5±0,01 gramos de aceite filtrado en un matraz aforado de 10 mL que se completa hasta el enrase con ciclohexano (HPLC), agitando hasta su homogenización. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Varían 50Bio UV-visible (Varían, España), la medida se lleva a cabo a las longitudes de onda de 472 y 670 nm, para los carotenos y para las clorofilas, respectivamente, utilizando el disolvente ciclohexano como referencia.

Los resultados se expresan en mg/kg. De grasa, aplicando la expresión:

$$Pigmentos \left(\frac{mg}{KG} \right) = \frac{L.V. \cdot 10.000}{E.P}$$

Siendo;

L=Lectura del espectrofotómetro a 472 nm y 670 nm para carotenos y clorofilas, respectivamente.

V= Volumen del extracto (10mL).

E= Absorbancia específica para una disolución al 1 % E= 2000 para carotenos, E=613 para clorofilas.

P= Peso de la muestra de aceite, en g.

3.3.6 Determinación de la composición de ácidos grasos

La determinación por cromatografía en fase gaseosa de la composición cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos del aceite de oliva virgen extra se llevó a cabo mediante la obtención de los correspondientes ésteres metílicos.

Los ácidos grasos no son suficientemente volátiles por lo que previamente se convierten en ésteres metílicos:

METANÓLISIS: La metanólisis se lleva a cabo en presencia de un catalizador básico o ácido. Algunos de los reactivos más utilizados son:

- KOH/CH₃OH (catálisis básica)
- H₂SO₄/CH₃OH (catálisis ácida)
- NaCH₃O/CH₃OH (catálisis básica)

La determinación de los ácidos grasos del aceite de oliva se realiza por cromatografía gaseosa siguiendo el método descrito en el Reglamento (CEE) N° 2568/91.



Ilustración 9: Cromatógrafo de gases. Fuente: Web oficial de Huazheng

La determinación exige una metilación de los ácidos grasos contenidos en las muestras del aceite de oliva para liberarlos de su enlace glicéridico y mejorar las condiciones cromatográficas.

La preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realiza pesando $0,3 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz esférico de fondo plano de 50 mL, añadiendo 2,5 mL de metilato sódico al 0,5 % (v/v), se deja en ebullición durante otros 10 minutos. Se deja entrar tapado para evita evaporaciones y, posteriormente, se lleva el contenido a un tubo de 25 mL. Se enjuaga el matraz donde se ha llevado a cabo la metilación hasta tres veces, empleando 2 mL de heptano cada vez y se colocan en el tubo de 25 mL.

Para facilitar la separación de fases se le añade salmuera al tubo agitando suavemente para conseguir la homogeneización. La muestra a inyectar en el cromatógrafo se toma directamente de la fase superior del tubo y se vierte en viales.

La columna empleada es una columna capilar BPX 70 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de grosor de película (SGE Scientific Pty Ltd Australia).

El gas portador utilizado es el Helio y la temperatura mantenida en el horno es 198°C (isoterma). La temperatura del inyector (modo Split/splitless) es 235 58°C y la del detector de 245°C. El volumen de muestra inyectado es de 2 µL y el tiempo necesario para el análisis de cada muestra es de 40 minutos.

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

En el cromatograma se identifican picos, que corresponden a los ácidos grasos, calculando los tiempos de retención relativos al ácido oleico (mayoritario en el aceite de oliva virgen).

Después se halla el área total de los picos de los ácidos grasos presentes en el aceite, restando del área total las áreas de los picos que no interesen.

$$\text{Acidos grasos} = \frac{A_x \cdot 100}{\sum A}$$

Siendo:

A_x = Área del pico del ácido graso

$\sum A$ = Suma de las áreas de todos los ácidos graso.

3.4 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Para el análisis quimiométrico se ha empleado los resultados analíticos de 189 muestras de Aceite Picual, recogidos todos ellos en una hoja de cálculo EXCEL, la cual ha sido empleada para extraer los estadísticos simples de cada parámetro: media, valor máximo, valor mínimo y desviación estándar.

Dicho análisis se ha realizado empleando “The Unscrambler v9.7” (CAMO Software AS, Norway).

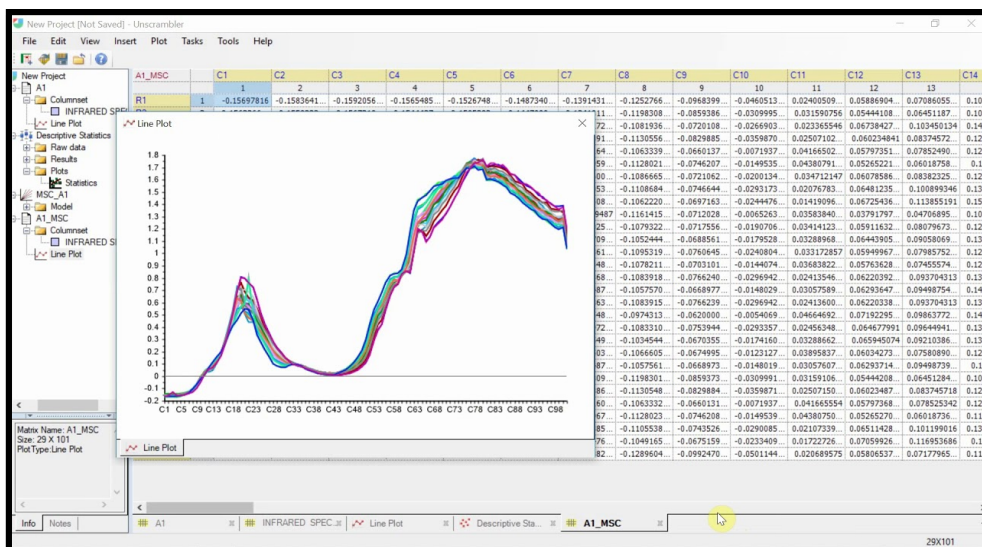


Ilustración 10: Imagen de programa descrito. Fuente: Camo.

Es un programa que nos da las soluciones de optimización, predicción y modelado analítico de CAMO Softwares. Son la opción preferida por más de 25.000 analistas de datos en todo el mundo en una variedad de industrias.

Su software insignia de simulación y predicción es The Unscrambler, reconocido por su facilidad de uso, visualización de datos excepcional y métodos multivariados avanzados.

También ofrece una gama de productos de software que se pueden integrar directamente en instrumentos científicos, soluciones de monitoreo de procesos y software de optimización.

Es de aplicación en productos farmacéuticos y biotecnológicos, automoción, petróleo y gas, alimentos y bebidas, agricultura, investigación, pulpa y papel, productos químicos, fabricación industrial, aeroespacial y defensa, banca y finanzas.

Los sistemas modernos de datos contienen muchas variables donde las principales tendencias están en combinaciones entre las variables.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

1. Describir la calidad **X**
2. Correlacionar calidad con por ejemplo propiedades químicas

$$\mathbf{X} \rightarrow \mathbf{Y}$$

3. Mediciones indirectas

$$\mathbf{X} + \mathbf{Y} \rightarrow \text{Model}$$

$$\mathbf{X}_{\text{NEW}} + \text{Model} \rightarrow \mathbf{Y}$$

Los métodos multivariantes pueden aplicarse a mucho tipo de datos cuantitativos, en nuestro caso disponemos de una tabla de datos con distintas variables: estabilidad, polifenoles totales, amargor, tocoferoles totales, pigmentos carotenoides, pigmentos clorofílicos y ácidos grasos.

Los datos se han incorporado al “Unscrambler” importando, como fichero ASCII, la base de datos en “Excel”, la cual ha sido configurada previamente como fichero “CSV” con 189 filas (muestras) y 18 columnas (parámetros).

3.4.1. Tratamiento de datos

Cada modelado se realiza con los diferentes tratamientos de datos.

- Sin normalizar.
- Normalización (llevar todas las variables a la misma escala). Vamos a realizar un Normalización con la media, máximo y rango, para comprobar cuáles son las variables más importantes.

- ✓ Mean

$$X(i,k)=X(i,k)/\text{Abs}(\text{Mean}(X(i,*)))$$

- ✓ Maximum

$$X(i,k)=X(i,k)/\text{Max}(\text{Abs}(X(i,*)))$$

- ✓ Range

$$X(i,k)=X(i,k)/(\text{Max}(X(i,*))-\text{Min}(X(i,*)))$$

3.4.2. Modelos multivalentes

Los modelos multivariantes analizados en éste trabajo han sido:

- PCA (Análisis de Componentes Principales)
- Regresión:
 - ✓ PLS 1. Regresión por mínimos cuadrados parados.
 - ✓ MLR. Regresión lineal múltiple.

Para todos los modelos se ha empleado el mismo método de validación “Full Cross Validation”, mediante el cual se prueba el modelo construido con todos los datos de acuerdo a la técnica de validación ‘Leave-one-out’.

Los modelos emplean los datos centrados y el número de Pcs iniciales se establecen en 10.

Como criterio de aceptación del modelo se emplean los valores de: Coeficiente de determinación en calibración (R^2_{cal}), Coeficiente de determinación en validación (R^2_{val}) y el error cuadrático medio (RMSE).

Los mejores modelos se consideran cuando los coeficientes de determinación son próximos a 1 y cuando la relación $R^2_{\text{val}} / R^2_{\text{cal}}$ es, también lo más próxima a 1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. Caracterización de los aceites

En la Tabla 3, se definen los estadísticos obtenidos a partir de los resultados de los análisis de los aceites de la variedad 'Picual' empleados en este trabajo: media, desviación estándar, los valores máximo y mínimo.

Tabla 3. Datos calculados a partir de las muestras tomadas. Fuente: Elaboración propia.

	MEDIA	MAXIMO	MINIMO	DESVIACION
POLIFENOLES TOTALES	738	1.694	106	394
AMARGOR (K225)	0,39	0,64	0,08	0,15
ESTABILIDAD	177,71	365,45	61,78	58,79
TOCOFEROLES TOTALES	217	298	156	31
PIGMENTOS CAROTENOIDES	7,23	18,05	2,07	3,09
PIGMENTOS CLOROFILICOS	8,04	24,86	0,70	3,09
C16	9,87	11,46	7,96	0,62
C16'	0,71	1,21	0,18	0,26
C17	0,02	0,10	0,00	0,02
C17'	0,06	0,50	0,02	0,04
C18	2,40	4,38	1,64	0,48
C18'	83,23	93,75	77,90	1,87
C18''	2,76	4,69	1,71	0,60
C18'''	0,41	0,63	0,23	0,11
C20	0,28	0,45	0,19	0,06
C20'	0,19	0,42	0,11	0,06
C22	0,07	0,19	0,03	0,02
C24	0,03	0,18	0,00	0,03

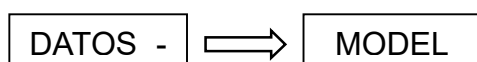
En la tabla anterior se observa una relación del ácido oleico con la estabilidad oxidativa ya que si éste aumenta la estabilidad oxidativa es mayor. Ocurre lo contrario con el ácido oleico y el ácido linoleico, si uno de ellos aumenta el otro disminuye. Asimismo, se aprecia que al aumentar la relación oleico/linoleico la estabilidad de los aceites es mayor. Esto ya lo demostró Tekaya et al. (2013) y Morales et al (1997) en sus estudios, donde informaron de que la estabilidad de los aceites es mayor, cuando el contenido de ácido oleico (C18: 1) es alta y el contenido de ácido linoleico (C18: 2) es baja, y sugirieron que el cociente entre ácido oleico y linoleico estaba estrechamente asociado con la estabilidad oxidativa de los aceites.

Las muestras de aceite empleadas en el trabajo han presentado un amplio rango de valores en el contenido de Polifenoles Totales, con valores altos por encima de los 1500 ppm y valores muy bajos cerca de los 100 ppm.

Las características químicas de los aceites recogidos en la Tabla 3, son los principales de los aceites de la variedad "Picual".

En general se puede observar, que las muestras analizadas han proporcionado un amplio rango de valores en la mayoría de los parámetros composicionales considerados.

4.2. Análisis de los componentes principales (PCA)



Es un modelo descriptivo que permite modelizar un conjunto único de datos, lo que permite encontrar la estructura adyacente de los datos, estudiar la correlación entre variables, describir los objetos de acuerdo con el resumen de las variables, detectar espurios u observaciones extremas.

Nuestro objetivo es analizar los datos para ver si existe una estructura relacionada con la estabilidad oxidativa.

Se ha llevado a cabo el análisis de componentes principales (PCA) aplicando diferentes métodos de “Normalización;” “mean”, “range” y “máximo” respecto a uno sin normalizar.

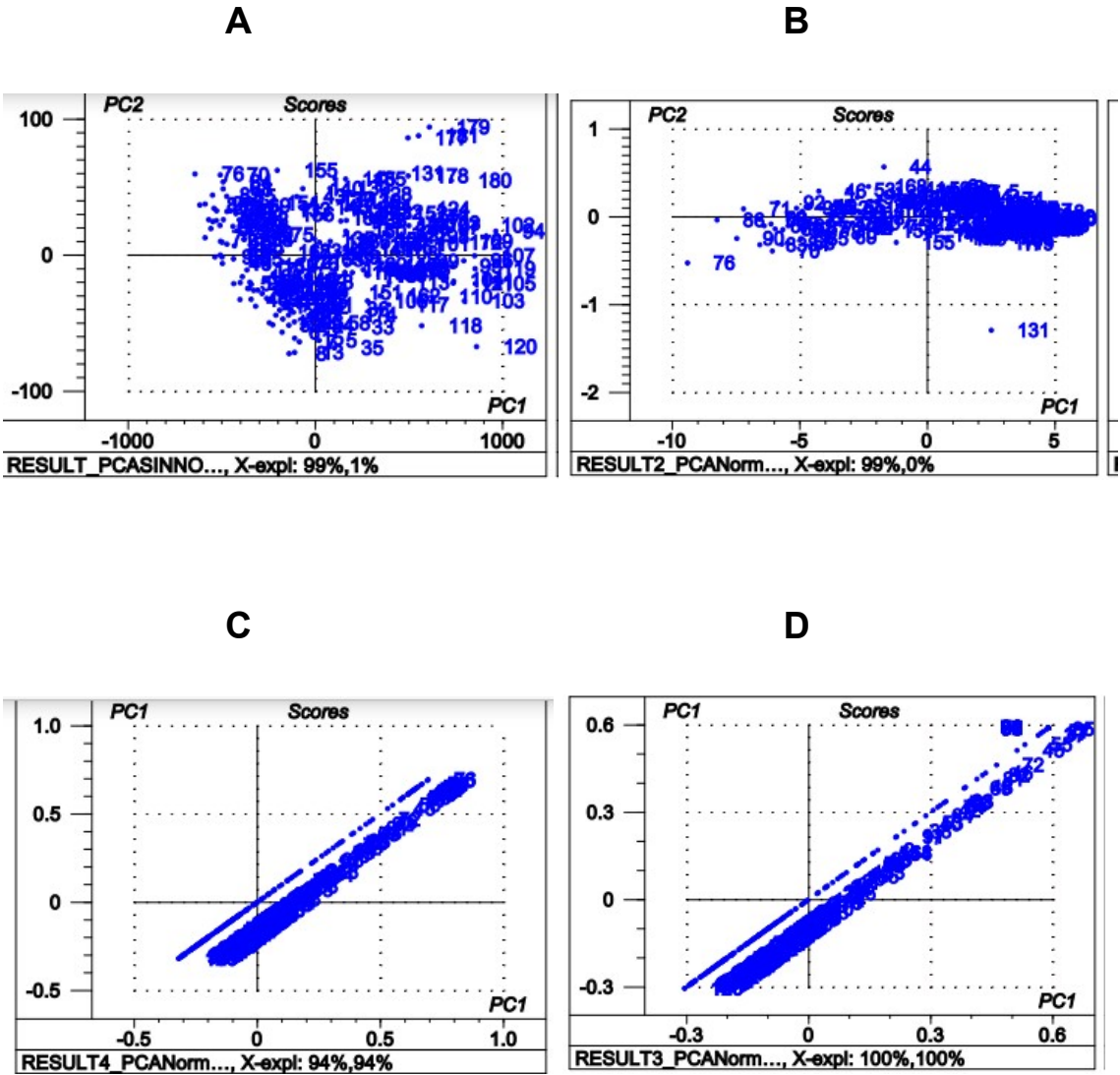


Ilustración 11: Grafico del análisis de componentes principales (PCA) para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica 11A, se representa un PCA sin normalizar. En 11B un PCA normalizado *mean*; en la gráfica 11C un PCA normalizado *range* y por último, en 11D vemos un PCA normalizado *máximo*.

Al ver los cuatro gráficos realizados, podemos ver que el tratamiento que más información nos da es el PCA Sin Normalizar.

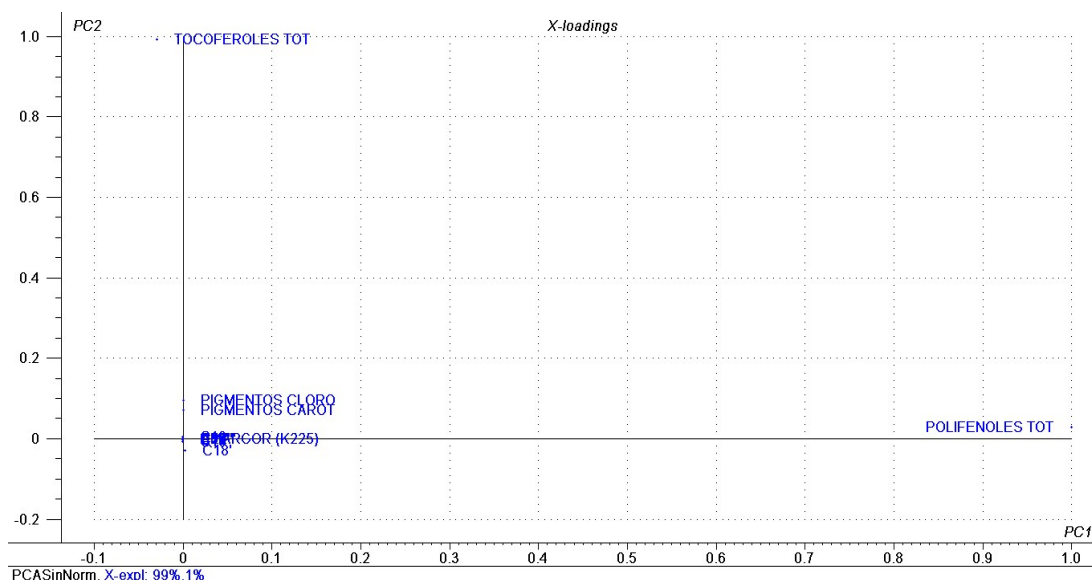


Ilustración 12: Gráfico de cargas PCA sin normalizar para la estabilidad oxidativa. Fuente: Elaboración propia.

Al observar el gráfico de cargas (x-loading) de la figura 12, se observa como los Polifenoles totales y los tocoferoles totales presentan la mayor importancia en la distribución de las muestras, mientras que el resto de parámetros son menos influyentes.

Así, cuando se observa la distribución de las muestras en la figura 11A, se aprecia que en el eje X éstas están distribuidas según el contenido de polifenoles, de manera que los que se encuentran más a la derecha son los más estables, mientras que el eje de la Y, se distribuyen en función de la cantidad de tocoferoles, presentando mayor nivel de éstos componentes cuanto más positivo en el eje Y está colocada la muestra.

Al realizar la comparativa entre dos muestras, por ejemplo, muestras 71 y 102, se observa como la muestra 71, que se encuentra en la zona de la izquierda,

presenta un valor bajo de Polifenoles Totales, con 155 ppm, mientras que la muestra 102, situada en la zona de la derecha, presenta unos niveles muy altos de estos componentes, con 1580 ppm.

Este análisis mediante PCA, muestra que existe una información muy relacionada entre los parámetros analizados y el parámetro objetivo, cual es la estabilidad. Así como se aprecia cuando se observan los valores de estabilidad de estas dos muestras ejemplo. La muestra 102, posee 277 horas de estabilidad y la muestra 71, 92 horas

4.3. Regresión Lineal Múltiple (MLR)

Establece una relación lineal entre un conjunto de predictores y un conjunto de respuestas. La forma matemática de esta relación se denomina modelo.

La regresión lineal múltiple es una técnica estadística que se encarga de analizar situaciones que involucran más de una variable. Donde “Y” es una variable dependiente, en nuestro caso la estabilidad oxidativa.

Este análisis nos permite entender la relación entre las distintas variables. La regresión lineal múltiple permite generar un modelo lineal en el que el valor de la variable dependiente o respuesta (Y) se determina a partir de un conjunto de variables independientes llamadas predictores.

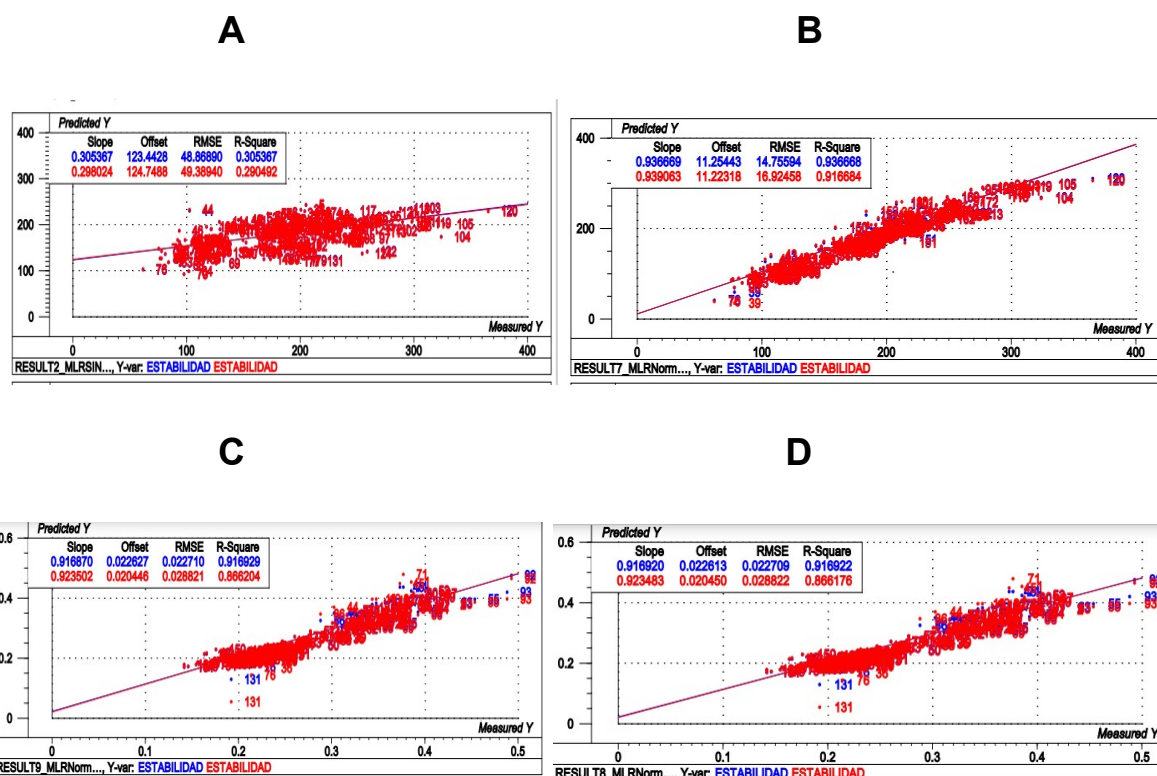


Ilustración 13: Grafico de MLR (regresión lineal múltiple) para la estabilidad oxidativa. A, MLR sin normalizar, B un MLR normalizado mean, C MLR normalizado range y D MLR normalizado range Fuente: Elaboración propia.

En los gráficos antes representados (A, B, C, D), podemos ver la alta linealidad que se obtienen en los diferentes modelos, a excepción del modelo sin normalizar el cual presenta unos valores de coeficientes de determinación muy por debajo de 0,5. El mayor problema con la MLR, es la colinealidad.

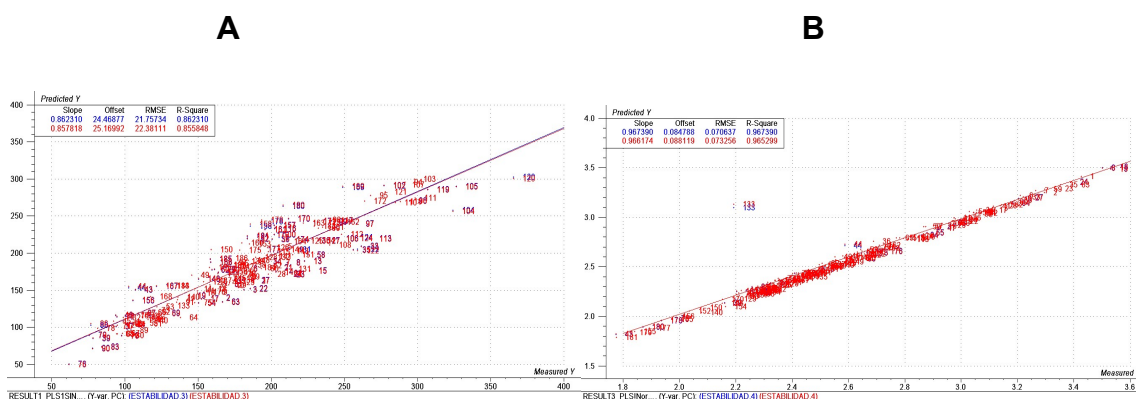
Los otros tres tratamientos nos proporcionan correlaciones significativas, pero la de mayor índice correlación es MLR Normalizado Mean (Figura 13B), el cual presenta un coeficiente de terminación en calibración de $R^2_{cal} = 0,9366$ y de validación de $R^2_{val} = 0,9168$, dando lugar a una alta relación $R^2_{val} / R^2_{cal} = 0,979$, así como un error en validación próximo al método estándar.



Ilustración 14: Grafica de los coeficientes de regresión del MLR normalizado mean. Fuente: Elaboración propia.

4.4. Regresión por mínimos cuadrados (PLS1)

El método de los mínimos cuadrados se utiliza para calcular la recta regresión lineal que minimiza los residuos, esto es, las diferencias entre los valores reales y los estimados por la recta. Se revisa su fundamento y la forma de calcular los coeficientes de regresión con este método.



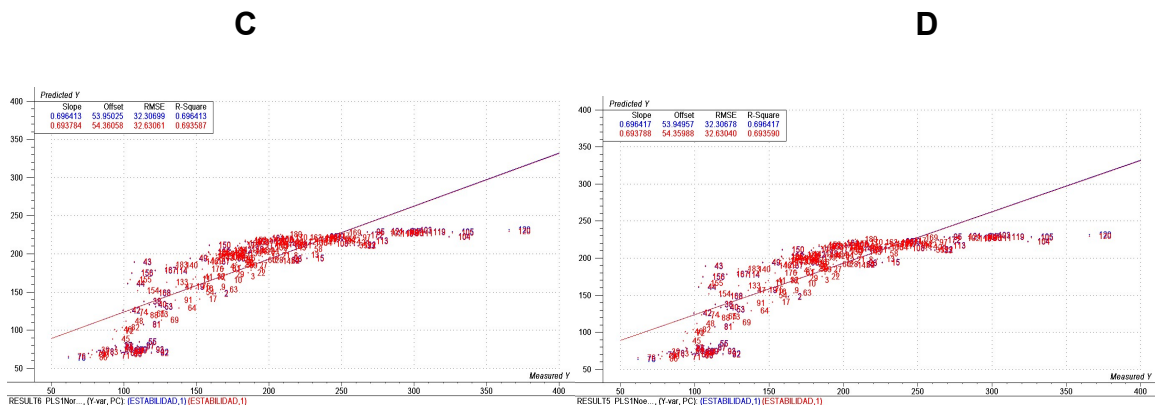


Ilustración 15: Gráfico de PLS1 (regresión por mínimos cuadrados parciales) para la estabilidad oxidativa. A, PLS1 sin normalizar, B PLS1 normalizado mean. C PLS1 normalizado range. y D PLS1 normalizado máximo. Fuente: Elaboración propia.

De los cuatro modelos de PLS1, observamos que la más viable sería el PLS con normalización media (figura 15B), ya que presenta los mejores valores de coeficiente de terminación en calibración ($R^2_{cal} = 0.9673$) y de validación ($R^2_{val} = 0.9652$), que dan lugar a una alta relación $R^2_{val} / R^2_{cal} = 0.9978$, así como un error en validación muy bajo, necesitando solamente 4 PC (Componentes principales).

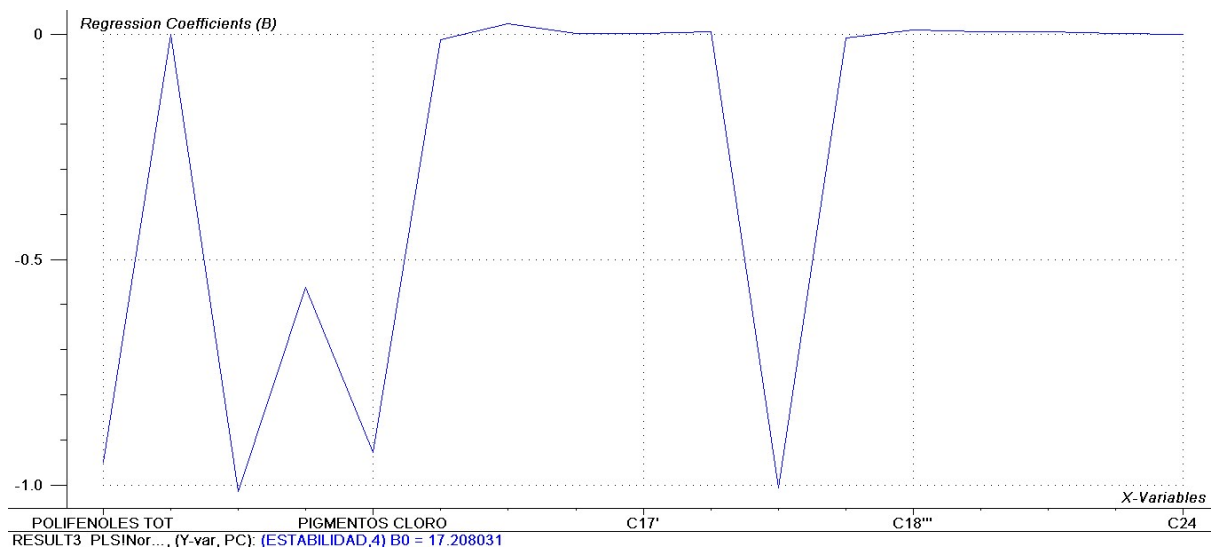


Ilustración 16: Grafico de los coeficientes de regresión del modelo PLS1 con normalización media. Fuente: Elaboración propia.

PLS, también es un método de proyección que consigue extraer de la matriz X, solo la parte de la información que es relevante para Y. Habitualmente produce modelos más sencillos, que son fáciles de interpretar. Tal y como se aprecia en la figura 16, algunos parámetros empleados en el modelo tienen poca significancia ya que están a nivel de influencia cero.

Así pues, en base a estos resultados observamos que se pueden considerar dos posibles modelos para predecir la estabilidad del Aceite de Oliva de esta variedad “Picual”.

Un primer modelo sería PLS 1, con Normalización Media, y el otro un MLR con Normalización Media (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de correlación y validación.

Analisis Multivariante	Tratamiento Datos	R ² Cal	R ² val	RMSE
MLR	Normalizado Media	0.9366	0.9166	1.475.594
PLS1	Normalizado Media	0.9673	0.9652	0,070637

Fuente: Elaboración propia.

Para el modelo de predicción mediante MLR (Figura 17), se extraen los valores de los coeficientes de regresión (Tabla 5).

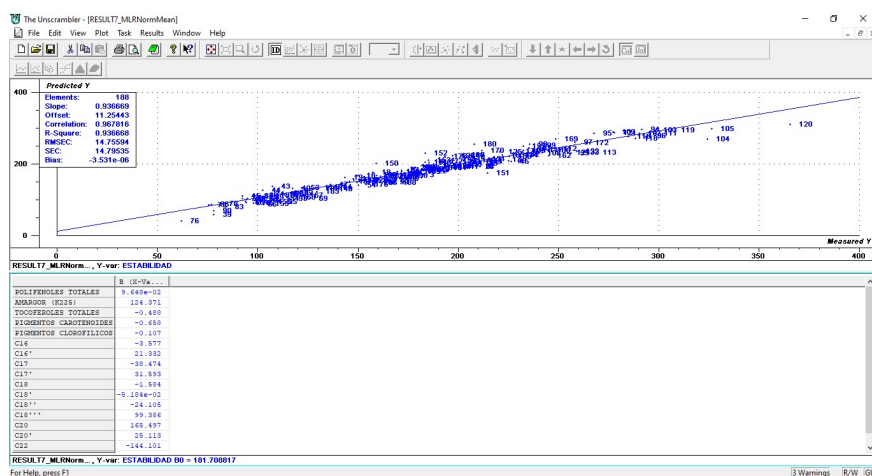


Ilustración 17: Imagen de datos para realizar la tabla MLR. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5 Coeficientes de regresión de MLR.

POLIFENÓLES TOTALES	9,64E-01
AMARGOR (K225)	124.371
TOCOFEROLES TOTALES	-0.488
PIGMENTOS CAROTENOIDES	-0.658
PIGMENTOS CLOROFILICOS	-0.107
C16	-3.577
C16'	21.332
C17	-38.474
C17'	31.593
C18	-1.584
C18'	-5,18E-01
C18''	-24.105
C18'''	99.386
C20	165.497
C20'	25.113
C22	-144.101
C24	0.02

Fuente: Elaboración propia

A partir de dicha tabla se puede obtener el modelo predictivo de la estabilidad mediante la fórmula:

$$\text{Estabilidad (h)} = 181,71 + 0,0964 * \text{Pol Tot} + 124,37 * \text{Amar} - 0,488 * \text{Tocf Tot} - 0,658 * \text{Pig Carot} - 0,107 * \text{Pig Clorof} - 3,577 * \text{C16} + 21,33 * \text{C16}' - 38,47 * \text{c17} + 31,59 * \text{C17}' - 1,584 * \text{C18} - 24,105 * \text{C18}'' + 99,38 * \text{C18}''' + 165,497 * \text{C20} + 25,113 * \text{C20}' - 144,101 * \text{C22}$$

Respecto al modelo de predicción mediante PLS 1, y a partir de los datos del coeficiente de calibración extraídos (figura 18) y presentados en la tabla 6, se puede observar, que hay coeficientes que hay valores con coeficientes de regresión muy despreciables, los cuales se pueden eliminar sin perder la capacidad predictiva del modelo.

	PC_04 (...)
POLIFENOLES TOTALES	-0.949
AMARGOR (K225)	-1.130e-03
TOCOFEROLES TOTALES	-1.014
PIGMENTOS CAROTENOIDES	-0.562
PIGMENTOS CLOROFILICOS	-0.927
C16	-1.216e-02
C16'	2.306e-02
C17	3.076e-04
C17'	1.340e-03
C18	5.724e-03
C18'	-1.007
C18''	-8.593e-03
C18'''	9.518e-03
C20	5.069e-03
C20'	5.707e-03
C22	1.649e-03

RESULT3_PLSINor..., (Y-var, PC): (ESTABILIDAD,4) B0 = 17.208031
For Help, press F1

Ilustración 18: Imagen de datos para realizar la tabla PLS 1. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Coeficientes de regresión de PLS 1.

POLIFENOLES TOTALES	-0.949
AMARGOR (K225)	-1,13E+00
TOCOFEROLES TOTALES	-1.014
PIGMENTOS CAROTENOIDES	-0.562
PIGMENTOS CLOROFILICOS	-0.927
C16	-1,22E+01
C16'	2,31E+01
C17	3,08E-01
C17'	1,34E+00
C18	5,72E+00
C18'	-1.007
C18''	-8,59E+00
C18'''	9,52E+00
C20	5,07E+00
C20'	5,71E+00
C22	1,65E+00
C24	-1,23E+00

Fuente: Elaboración propia.

A partir de dicha tabla se puede obtener el modelo predictivo de la estabilidad mediante la fórmula:

$$\text{Estabilidad (h)} = 17,21 - 0,949 * \text{Pol Tot} - 1,014 * \text{Tocf Tot} - 0,562 * \text{Pig Carot} - 0,927 * \text{Pig Clorof} - 1,007 * \text{C18}'$$

CONCLUSIONES



Conclusión

✓ Los aceites de la variedad “Picual” empleados han proporcionado un amplio rango de valores en los parámetros composicionales considerados, lo que ha permitido llevar a cabo un análisis quimiométrico de éstos.

✓ El análisis de Componentes Principales (PCA), ha mostrado la existencia de una relación entre parámetros composicionales y la estabilidad del aceite. Estando la componente PC1 asociada al contenido en Polifenoles Totales y la componente PC2 al de Tocoferoles Totales.

✓ Una normalización de los datos respecto de su valor medio es el pretratamiento de éstos más adecuado para encontrar el modelo predictivo de la estabilidad.

✓ De los dos modelos de regresión multivariante analizados, el método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) es el que ha proporcionado el mejor modelo de regresión para la predicción de la estabilidad oxidativa del aceite de la variedad “Picual”.

✓ Los parámetros que precisa el modelo PLS, para la predicción, quedan reducidos a solo los Polifenoles Totales, Tocoferoles Totales, los Pigmentos Clorofílicos y Carotenoides y al Ácido Oleico.

BIBLIOGRAFIA

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, Esposito., 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. 85
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 AUTHENTICITY. *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-VIRGIN 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. iculiura 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. 86 REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2016/2095 DE LA COMISIÓN de 26 de septiembre de 2016. Anexo 1.