

i19289650

+1/767

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS SECCION DE QUIMICAS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA SECRETARIA CIENCIAS
16-2-73
ENTRADA N.º 81

EVOLUCION DE LOS INDICES QUIMICOS EN LOS
ACEITES DE OLIVA ENVASADOS Y RELACION PER-
CEPCION-C.G.L. DE SUS AROMAS.

Por: José Manuel Olías Jiménez

Sevilla, Enero 1973

Memoria presentada por el Licenciado José Manuel Olías Jiménez para aspirar al grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas.

Sevilla, Enero 1973

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Olías', with a long horizontal flourish extending to the right.

fdo./ Jose Manuel Olías Jiménez

Esta Tesis ha sido realizada en los Laboratorios del Departamento de Química y Microbiología del Instituto de la Grasa y sus Derivados del Patronato "Juan de la Cierva" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, habiéndose cumplido todos los requisitos exigidos.

Sevilla, Enero 1973

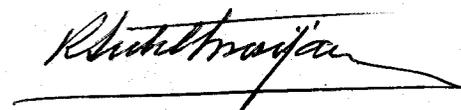
Vº Bº

El Catedrático Padrino



fdo./ J.M. Martínez Moreno
Catedrático de Química Técnica y Director del Instituto de la Grasa y sus Derivados.

El Director de la Tesis



fdo./ R. Gutierrez Gonzalez-Quijano.
Profesor de Investigación

AGRADECIMIENTO

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento:

- A D. Juan Martínez Moreno, Catedrático Padrino, por su supervisión y valiosas sugerencias.
- A D. Rafael Gutierrez González-Quijano, Profesor Investigador del Instituto de la Grasa y sus Derivados, Director de esta tesis, por su constante y auténtica preocupación en su labor.
- A D. José Cabrera Martín Colaborador Científico del Instituto de la Grasa y sus Derivados, por su eficaz colaboración.
- Al Panel de catadores del Instituto de la Grasa y sus Derivados por su inestimable ayuda.
- A la Fundación Juan March por la beca concedida para la realización de parte de este trabajo.
- Y a todas aquellas personas que de una u otra forma han hecho posible la realización de esta tesis.

INDICE. -

	<u>Páginas</u>
1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Objeto del trabajo	8
1.2.- Importancia económica	11
1.3.- Antecedentes bibliográficos generales	17
1.3.1.- Alteraciones de las grasas	18
1.3.1.1.- Mecanismo de la oxidación de las grasas	19
1.3.1.2.- Enranciamiento	21
1.3.2.- Flavor	25
1.3.3.- Estudios sobre conservación y envasado de aceites comestibles	27
1.3.4.- Estudios sobre alteraciones aromáticas del aceite de oliva	35
2.- PARTE EXPERIMENTAL	37
2.1.- Plan de trabajo	38
2.1.1.- Consideraciones generales	39
2.1.2.- Tiempo de almacenamiento	40
2.1.3.- Temperatura	41
2.1.4.- Iluminación	42
2.1.5.- Local	44
2.1.6.- Tipos de envases	45

2.1.7.- Criterio seguido en la elección de los aceites y características iniciales de los elegidos	49
2.1.8.- Desmuestres	54
2.2.- Determinaciones utilizadas	56
2.2.1.- Determinación de acidez	57
2.2.2.- Cromatografía gaseosa de ésteres metílicos	57
2.2.3.- Índice de peróxidos	57
2.2.4.- Extinción específica a 232 y 270 nm.	58
2.2.5.- Prueba de Kreis	60
2.2.6.- Color de los aceites de oliva	62
2.2.7.- Antioxidantes naturales, tocoferoles	63
2.2.8.- Estabilidad	65
2.2.9.- Determinación de trazas metálicas	66
2.2.10.- Pruebas organolépticas	66
2.2.11.- Estudio de los aromas	69
2.2.11.1.- Dificultades de este estudio	69

2.2.11.2.- Técnicas utilizadas para la recogida de componentes aromáticos de alimentos	70
2.2.11.2.1.- Técnicas ensayadas	75
2.2.11.2.2.- Técnica adoptada	77
2.2.11.3.- Cromatografía de los aromas	79
2.2.11.3.1.- Técnica cromatográfica adoptada	81
3.- RESULTADOS Y DISCUSION	82
3.1.- Estudio de la evolución del Índice de Peróxidos (gráficos grupo A)	85
3.2.- Estudio de la evolución de los valores de $E_{232\text{nm}}$ (gráficos del grupo B)	96
3.3.- Estudio de la evolución de los valores de $E_{270\text{nm}}$ (gráficos del grupo C)	100
3.4.- Estudio de los valores dados por la prueba de Kreis (gráficos grupo D)	108

3.5.- Estudio de la evolución del color de los aceites (grupo de gráficos E)	114
3.6.- Estudio de la evolución del contenido en Tocoferoles y materia reductora (gráficos del grupo F)	118
3.7.- Estudio de la evolución de la estabilidad A.O.M. (gráficos del grupo G)	122
3.8.- Estudio de las determinaciones de trazas metálicas (Tabla I)	126
3.9.- Estudio de los resultados de las pruebas organolépticas (grupo de gráficos H)	128
3.10.- Correlación entre ensayos organolépticos y aromagramas.	148
3.10.1.- Posibilidades de correlación entre la determinación objetiva (cromatografía gaseosa) y la respuesta sensorial (Panel organoléptico).	149
3.10.2.- Tratamiento matemático	153

3.10.2.1.- Descripción del fundamento matemático del análisis discriminante en su aplicación a nuestro problema	154
3.10.3.- Plan a seguir para el estudio de la correlación propuesta	159
3.10.4.- Muestras elegidas para este estudio	160
3.10.4.1.- Índices químicos de las muestras elegidas	161
3.10.4.2.- Pruebas organolépticas de diferencias al patrón	162
3.10.4.3.- Aromagramas de las muestras	164
3.10.5.- Función discriminante	169
3.10.5.1.- Elección de las poblaciones A y B.	169
3.10.5.2.- Elección de los parámetros diferenciadores	172
3.10.6.- Cálculo de la función de discriminación	173
3.10.6.1.- Aceite virgen I	173
3.10.6.2.- Aceite virgen II	173
3.10.6.3.- Aceite tipo riviera	174

Páginas

3.10.7.- Prueba de significación de las distintas funcio- nes de discriminación cal- culadas y clasificación de las muestras estableci- das por medio de éstas.	175
3.10.7.1.- Aceite virgen I	175
3.10.7.2.- Aceite virgen II	177
3.10.7.3.- Aceite tipo riviara	178
3.10.8.- Comparación de los resulta- dos obtenidos por cromatogra- fía gaseosa y los ensayos or- ganolépticos	179
4.- CONCLUSIONES	182
5.- BIBLIOGRAFIA	192

1. INTRODUCCION

Los aceites, por su carácter líquido, han requerido siempre para su manipulación del adecuado envase. Es evidente, que el barro cocido, el vidrio y los cueros fueron los primeros recipientes que el hombre utilizó para el comercio de este producto, y durante un extenso período, el tráfico del aceite requería la aportación, por parte del comprador, de un envase que utilizaba una y otra vez. Este sistema ha perdurado hasta hace relativamente pocos años.

La aparición de la hojalata sobre 1810, y su producción mecanizada, alrededor de 1900, produce un efecto revolucionario, al facilitar el envasado y comercialización. Por otra parte se introduce un concepto de envase sin retorno, de forma que el comprador no conserva el envase una vez consumido su contenido.

Las principales ventajas que aporta este envase sin retorno, desde el punto de vista comercial, pueden cifrarse en los siguientes puntos:

- a) Ofrece una mayor garantía sanitaria.
- b) Favorece la manipulación
- c) Garantiza la calidad y cantidad del contenido.
- d) Estimula la competencia entre las marcas.

Pero además de todas estas ventajas, y esto es lo más importante desde el punto de vista de la tesis que se va a desarrollar, el envase debe proporcionar una acción

protectora contra las alteraciones del aceite y muy particularmente, en el caso del aceite de oliva, conservar adecuadamente sus características organolépticas.

La importancia que el comercio actual y moderno atribuye a las anteriores ventajas ha contribuido, extraordinariamente, a la comercialización de los aceites alimenticios envasados, siendo además uno de los pocos puntos, en que concuerdan los intereses de la administración pública, junto con los de los industriales, comerciantes y consumidores.

Al realizar un análisis desapasionado de los posibles envases para aceites comestibles, encontramos que los envases tradicionales, hojalata y vidrio, no están exentos de objeciones. Así por ejemplo, los de hojalata, adquieren, al menos en España, un precio superior al de los restantes tipos, la producción nacional es aún deficitaria y requiere suplementarse con importación; antes de ser llenados, necesitan bastante espacio para su almacenamiento y transporte; tienen un sistema de formación y cerrado de los mismos relativamente complejo, de forma que a veces sus agrafados quedan defectuosos, ocasionando salidas del aceite durante el transporte y almacenamiento. Sin embargo, a pesar de todo ello, siguen utilizándose en la exportación, donde los márgenes de beneficios son algo mayores.

Las botellas de vidrio del tipo normal, son caras en precio, extremadamente pesadas (entre 700 y 800 gr. para el envase de 1 litro), y bastante frágiles. Como además, normalmente no son comercializadas como "envases perdidos", las industrias que lo utilizan se encuentran con problemas tales como:

- a) Gastos de transportes y acarreo de su recogida
- b) Pérdidas por roturas.
- c) Gastos de lavado.
- d) Complicación en la contabilidad.

No obstante, con la aparición de las botellas de vidrio ligero y resistente, cuyo peso oscila entre 300 y 400 gr. para la citada capacidad, los dos primeros puntos, en este tipo de envase, parecen haberse mejorado; pero aún el problema no se ha resuelto en su totalidad.

Hace unos años y ante la necesidad de controlar la calidad de los aceites, el Gobierno español prohibió la venta de aceites a granel. Se presentó entonces el problema de encontrar envases de costo reducido, de forma que éstos no incidiesen sensiblemente sobre el precio del aceite, que masivamente se vendía antes a granel. Los envases clásicos anteriores, no podían obtenerse a los precios deseables, ni se podían eliminar con ellos, totalmente los problemas anteriores indicados, inherentes a su naturaleza.

El empleo del envase de plástico se hacía ineludible, ya que este material reunía una serie de ventajas muy tentadoras desde el punto de vista comercial tales como:

- a) Menor fragilidad que el vidrio.
- b) Fácil y reducido almacenamiento de los envases vacíos.
- c) Peso extremadamente reducido (25-40 gr.)
- d) Maquinaria de relativo poco costo para llenado y cerrado.
- e) Y, sobre todo, un precio realmente asequible.

A partir de entonces, tanto los suministradores de materiales plásticos, como los transformadores de este material por una parte, y los industriales y comerciantes por otra, comenzaron a considerar que el envase de material plástico era una excelente solución, que permitía un bajo costo y un medio de comercialización adecuado, que además había sido también aceptado por el público, el cual se veía así liberado de la dependencia que representaba la devolución del envase. Como demostración de lo anterior, tenemos el hecho de que en 1964, la proporción de aceite envasado en polietileno, ya alcanzó un 15%, que subiría en 1965 a un 25% y en 1966 aproximadamente a un 40%, fecha en la que los envasados en cloruro de polivinilo (PVC) se iniciaban con un 5%.

En 1970 el porcentaje de aceites envasados en polietileno se puede cifrar en un 65% y en cloruro de polivinilo en un 15%.

Para los años próximos parece preverse un retroceso en el porcentaje de los envases de polietileno a favor de los de cloruro de polivinilo.

Aunque hemos de reconocer que los porcentajes de envasados, anteriormente expuestos, tienen principalmente su fundamento en razones económicas, no puede olvidarse sin embargo que el envasado tiene un segundo aspecto, cuyo interés no es posible olvidar, que es la capacidad de conservación de la calidad del producto envasado, al menos durante un período de tiempo suficiente, para que llegue al cliente en las mejores condiciones posibles de consumo.

Resulta evidente, que las variaciones entre las características físicas y químicas, de los distintos materiales, pueden y deben influir notablemente en la capacidad de conservación, y ésta debe ser como mínimo la necesaria para cumplir lo establecido en el párrafo anterior.

Este último aspecto del problema lo consideramos de fundamental importancia, puesto que dadas las características de las materias grasas, sus típicas alteraciones y particularmente, en el caso del aceite de oliva, la conser-

vación de sus características organolépticas: olor, sabor y color, hacen necesario un cuidadoso estudio de las capacidades que tienen para la conservación de las mismas, los envases de los diferentes materiales que aparecen en el mercado.

1.1. OBJETO DEL TRABAJO

El presente trabajo persigue dos objetivos fundamentales:

- a) Realizar un estudio comparativo de la capacidad de conservación del aceite de oliva en envases de: hojalata, vidrio, PVC y polietileno, materiales utilizados con mayor frecuencia para la comercialización y venta al público de este aceite.
- b) Introducir la utilización de la cromatografía gas-líquido como un criterio para determinar las transformaciones aromáticas producidas durante el almacenamiento de los aceites envasados, relacionándolas (variaciones sufridas por sus componentes aromáticos) con el criterio de calidad determinado, por un grupo de catadores expertos; con ayuda de la técnica conocida como "Panel test".

El primer apartado presenta un muy destacado interés económico y legal, ya que conociendo la capacidad de conservación del material del envase, unas veces será el envasador y otras el almacenista el que deberá responsabilizarse de la pérdida de calidad del aceite envasado. Siendo esta la forma más razonable de que el público no se sienta defraudado, al adquirir un aceite de oliva cuya calidad no corresponde a la esperada, con evidente menoscabo del prestigio de este aceite.

Con objeto de que este punto se desarrolle con las mejores garantías de utilidad práctica, el almacenamiento se ha programado bajo condiciones controladas, lo más similares posible a las que suelen darse durante el periodo de comercialización; de esta forma los resultados, que serán discutidos a la luz de las correspondientes órdenes ministeriales, recomendaciones del C. C. O. I. y código alimentario, que regulan las características de los diferentes tipos de aceite de oliva, serán de la mayor utilidad a la vista de la inmediata y general obligatoriedad de envasado.

El segundo aspecto del estudio, que se recoge en el apartado b, lo consideramos de gran interés científico y especulativo, pues en esta Tesis, se intenta por primera vez, correlacionar mediante un cálculo estadístico, la calidad aromática del aceite de oliva, hasta ahora determinada por técnicas psicométricas, semisubjetivas, con un método totalmente objetivo como es la medida de las variaciones de sus componentes aromáticos, durante el periodo de conservación, determinada por cromatografía gas-líquido.

1.2. IMPORTANCIA ECONOMICA

El aceite de oliva, producto típico y tradicional de la cuenca mediterránea, constituye para ésta, la mayor fuente de producción y consumo de materias grasas y un factor importante en el equilibrio de la balanza comercial de sus pueblos.

Al olor frutado típico y característico de este aceite se debe, en buena parte, que su cotización en el mercado internacional, sea muy superior al de otros aceites. Así por ejemplo, en Norteamérica el aceite de oliva se cotiza aproximadamente a 69 \$ tonelada métrica, mientras que los aceites de semilla suelen cotizarse a la mitad. El balance económico que para España representa la producción, consumo y exportación, del aceite de oliva se expone en la tabla A. Para mayor claridad del estudio se han recogido por separado los tres conceptos anteriores.

En el primer apartado se da el volumen de producción y el valor global, al precio medio de campaña, lo que por sí solo habla claramente de su importancia.

En el segundo se recoge el volumen del comercio nacional, en él hemos separado el aceite comercializado a granel, del envasado en recipiente menores de cinco kilogramos, juntamente con el valor total para ambos.

En el tercero y último apartado, se recoge el volumen

y valor de las exportaciones en bidones y recipientes menores.

De los apartados segundo y tercero se puede deducir la importancia de las ventas de aceite envasado en recipientes menores de cinco kilos. El volumen económico que representa la exportación en recipientes menores debe lógicamente aumentar, puesto que nuestros aceites tienden a ser exportados, bajo marcas españolas, en lugar de a granel, para evitar el ser envasados y comercializados por firmas y bajo marcas ajenas.

Pero si bien esto puede ser más o menos problemático, el mercado nacional será, sin duda alguna, comercializado en envases menores, como única forma posible de combatir los fraudes por mezclas con aceites de semillas, tan difíciles de controlar en la venta a granel.

Este es el fin que se persigue con la orden ministerial de la Presidencia del Gobierno, publicada en el B.O.E. nº 159 de fecha 29-10-55, que obliga a la comercialización de los aceites comestibles en régimen total de envasados para 1973.

Para dicho año, es de esperar que las 325.000 toneladas de aceite de oliva comercializadas en la nación,

TABLA A

P-R O D U C C I O N

Campaña oleícola	Tm.	Precio medio ptas/Kgr.	Valor total millones de ptas
1968/69	510.000	32,50	12.105
1969/70	325.000	37,50	18.187,5

C O N S U M O N A C I O N A L

Campaña oleícola	GRANEL			ENVASES MENORES DE 5 Kgr.			TOTAL	
	Tm.	Precio medio Kg/pts	Valor en millones pts	Tm.	Precio medio Kg/pts	Valor en millones pts	Tm.	Valor en millones pts
1968/69	180.000	36,50	6.570	120.000	40,50	4.860	300.000	11.430
1969/70	130.000	38	4.940	195.000	42	8.190	325.000	13.130

E X P O R T A C I O N

Campaña oleícola	BIDONES			ENVASES MENORES DE 5 Kgr.			TOTAL	
	Tm.	Precio medio Kg/pts	Valor en millones pts	Tm.	Precio medio kg/pts	Valor en millones pts	Tm.	Valor en millones pts
1968/69	96.100	42,90	3.264,69	21.800	47,60	1.037,68	97.900	4.302,37
1969/70	155.669	44,22	6.883,64	26.662	48,52	1.293,64	182.331	8.177,28

a un precio medio previsto de 58 ptas/Kg., reporten al mercado un valor global de 18.000.000 ptas, al que deberá sumarse el valor de la exportación.

En relación a los tipos de envases más utilizados para comercializar el aceite, podemos hacer las siguientes consideraciones económicas:

Precio de los envases

Lata de 1 l.	Forma paralelepípeda	7,25 ptas.
" " "	" cilíndrica	4,30 "
Botella de PVC. 1 l. más tapón y etiqueta		2,40 "
Botella de polietileno 1 l.		1,60 "
Botella de vidrio 1 l.		3,20 "

A la vista de estos precios, es fácil comprender el interés que el desarrollo de los envases plásticos y de otro tipo, que reduzcan los costes del envasado, puede tener. Pero no se reduce a esto solo la economía en la utilización de los nuevos materiales, sino que también deben tenerse en consideración los siguientes puntos muy importantes:

Economía en peso de envase por litro de aceite

	Envase lleno de aceite	caja con 15 botellas
En vidrio	1.690 gr.	30,8 Kg (madera)
En plástico	980 gr.	15,4 Kg (cartón)
Diferencia	710 gr.	15,4 Kg
Economía	42%	50%

Economía en volumen

Una caja de madera de botellas de vidrio	72,96 dm ³
Una caja de cartón de botellas de plástico	<u>38,88dm³</u>
diferencia	44,08dm ³
economía	46,7 %

De acuerdo con lo anterior, ello supone en peso, una economía superior al 40%, que repercute en un valor similar en el transporte y en el almacenamiento.

Todo lo anterior, explica el aumento extraordinario en el consumo de estos envases de resinas termomoldeables, aún cuando en los distintos países es diferente el uso de botellas de los distintos materiales. Así por ejemplo, en Francia, en el momento actual, alrededor del 80% del aceite consumido se suministra en envases de PVC, mientras que en España este material solo ocupa un 15% aproximadamente, aunque con tendencia a aumentar. Por el contrario el polietileno ocupa más de un 60% y el resto se reparte entre vidrio, hojalata y otros envases de menor importancia.

Si a todo lo anterior, añadimos que un aceite de oliva se revaloriza por su calidad y que ésta hay que conservarla, resulta evidente la importancia que tiene para la economía nacional el disponer de un envase de reducido precio y que sobre todo, conserve inalterable la calidad

del aceite. ¿Cumplen con estas condiciones todos los tipos de envases existentes en la actualidad? El presente trabajo, tiene por objeto fundamental, estudiar las variaciones sufridas por tres aceites (dos virgenes de diferentes características y un tipo rivierra) envasados en distintos materiales, analizando los índices y características que pueden definirnos su estado de conservación, a lo largo del almacenamiento.

1.3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1.3.1. Alteraciones de las grasas.-

Es un hecho conocido, que las grasas, no pueden conservarse indefinidamente en las condiciones ordinarias, sin que experimenten determinadas alteraciones. Las principales son las provocadas por la acción del oxígeno, aceleradas por la temperatura, en presencia de la luz y ciertos catalizadores (p.e. trazas metálicas).

Estas alteraciones se dividen, actualmente, en varios tipos, según las características que las diferencian. En principio pueden distinguirse las siguientes:

- a) Hidrólisis (aceites brutos)
- b) Alteraciones de olor y sabor (principalmente en los aceites de oliva)
- c) Enranciamiento oxidativo común (general a todas las grasas)
- d) Reversión (general en los aceites refinados)
- e) Oxidación por lipoxidasas.

Concretándonos a los aceites de oliva virgen comestibles de baja acidez, las alteraciones principales, son las debidas a la oxidación de los glicéridos, por el oxígeno atmosférico (rancidez), y las transformaciones de su aroma característico.

La reacción se inicia con la pérdida de un átomo de hidrógeno en un grupo metileno adyacente a un doble enlace, causada por cualquier tipo de energía (generalmente luz o calor). Esta pérdida da lugar a la formación de un radical activado (II), que reacciona con el oxígeno atmosférico, dando lugar a un radical peroxídico (III), el cual reacciona a su vez con una molécula de ácido, para dar un hidroperoxido, de composición más estable (IV) y un nuevo radical activado del tipo (II), con el que se inicia otra nueva cadena.

Es fácil comprender que, siguiendo este camino u otro semejante, y teniendo en cuenta la posibilidad del fenómeno de resonancia híbrida de los dobles enlaces, los hidroperoxidos que se pueden formar, a partir de los diferentes glicéridos, son muy numerosos. Sólo en el caso del ácido oléico, se pueden originar cuatro hidroperoxidos distintos, cuyo grupo peroxídico pueden encontrarse situado sobre los carbonos 8,9,10 y 11, según el camino que siga la reacción.

Ross y cols (6), examinando los resultados de la oxidación, bajo radiación ultravioleta, de un oleato, llegan a la conclusión de que la sustitución ha tenido lugar en las cuatro posiciones, lo que confirma la teoría anterior.

En el caso de la autoxidación de compuestos de varios dobles enlaces, con la formación de peróxidos, tienen lugar un desplazamiento de los mismos, de tal forma, que puede originarse una considerable cantidad de dobles enlaces conjugados (7).

Actualmente en todos los casos, aunque se admiten diferentes tipos de peróxidos, los que dominan son los hidropéroxidos, y sólo en el caso de conjugación se admite la formación de peróxidos cíclicos.

Con todo lo anteriormente expuesto, es fácil comprender, que el número de peróxidos que pueden formarse a partir de los distintos ácidos grasos es muy numeroso, ahora bien, los peróxidos están produciéndose continuamente siempre que exista oxígeno para ello, dependiendo su velocidad de formación del grado de insaturación y de las condiciones de almacenamiento de la grasa, así como de los antioxidantes y prooxidantes presentes.

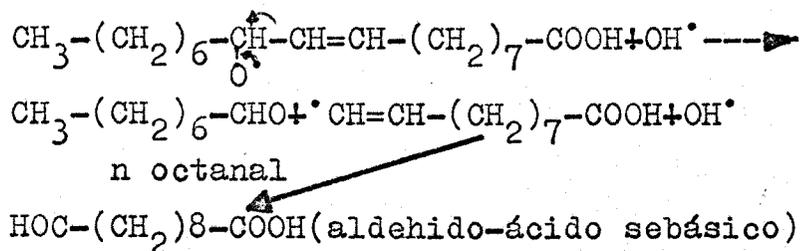
1.3.1.2. Enranciamiento.-

Cuando la destrucción de los peróxidos e hidropéroxidos comienza, dan lugar a una notable cantidad de productos, entre los que se encuentran aldehidos y cetonas de olor y sabor intensos y característicos, que llevan la grasa al estado de "rancidez".

No existe una definición standard de la rancidez, pero como es sabido, ésta se caracteriza por el desarrollo de un olor y sabor típico y desagradable ("a rancio") común para todas las grasas.

Según Pritzker y Jungkuns (8), la rancidez de la grasa se produce con sólo la descomposición del 1% de la misma, en forma de productos volátiles de bajo peso molecular, lo que corresponde, según estos investigadores a la formación del 0,01% de aldehído epihidrínico y otros.

La experiencia demuestra que los peróxidos son compuestos inestables, (incluso se descomponen con violencia), habiendo en la mayor parte de los casos ruptura homolítica del enlace O-O, con aparición de radicales libres. Estos últimos, en general, son de vida muy efímera y se combinan inmediatamente entre ellos para dar moléculas estables. Así por ejemplo, en el caso del ácido oleico, la descomposición de un hidroperóxido puede transcurrir por el siguiente camino:



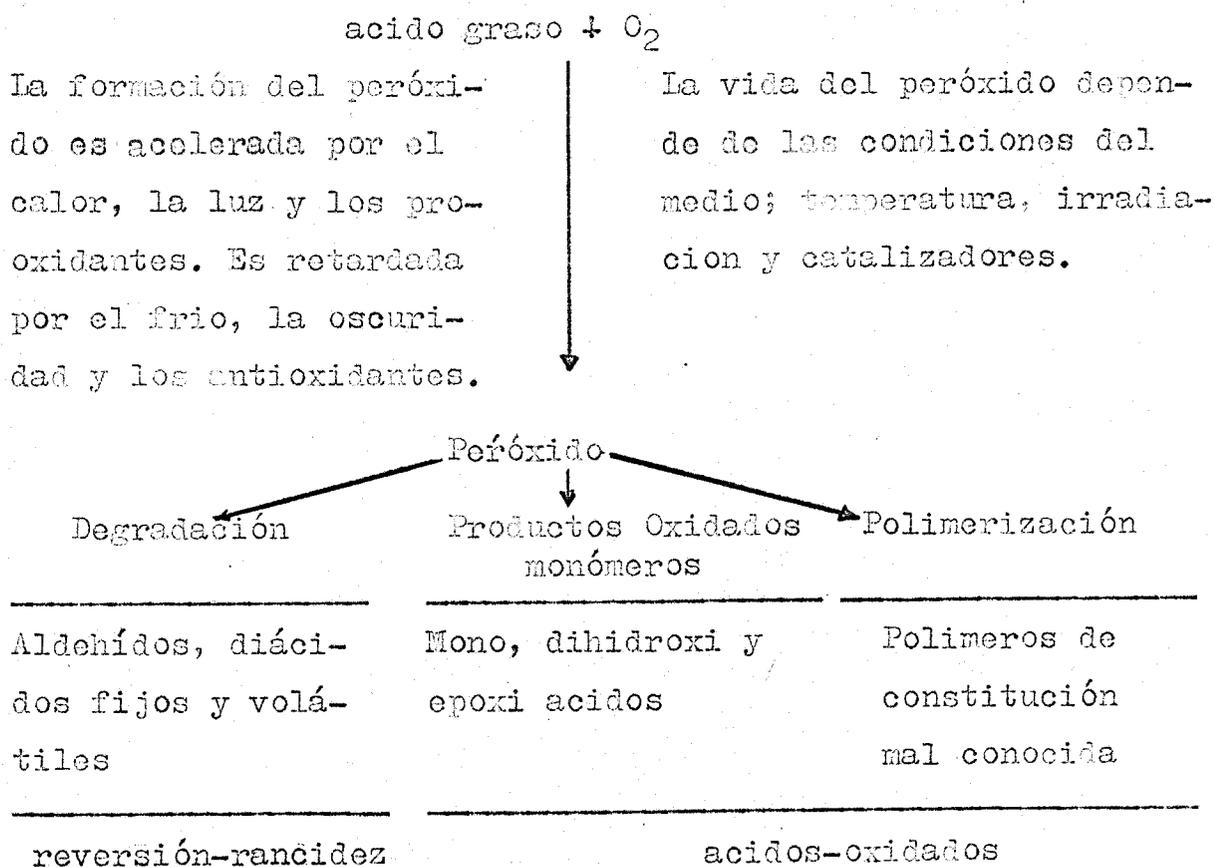
En un estudio realizado sobre la autooxidación del aceite de oliva, por libre exposición al oxígeno atmosférico, a la luz difusa y a la temperatura ambiente, Ruiz y Gutiérrez (9) han encontrado metilcetonas del C_4 hasta C_7 , n-aldehidos del C_3 hasta C_{12} , 2-enaes del C_5 al C_{11} y 2-4 dienales del C_7 al C_{12} , entre los que evidentemente, podemos encontrar, los principales componentes responsables del olor típico a rancio.

El enranciamiento de las grasas, presenta dos fases claramente distintas: en la primera, llamada periodo de inducción, la velocidad de oxidación, y por consiguiente la formación de peróxidos, es más o menos lenta, mientras que en la segunda se acelera rápidamente, y el contenido en peróxidos puede alcanzar, en condiciones favorables, niveles muy elevados.

En la conservación de los aceites vegetales, hemos de distinguir dos tipos completamente distintos: en el primero podemos considerar la conservación del aceite en recipientes abiertos, en los que la relación volumen de aire/volumen de aceite, puede alcanzar valores elevados al estar éste en contacto con una cantidad ilimitada de oxígeno, o al menos muy grande, pudiendo llegar a alcanzar un grado de oxidación elevado, e incluso sobrepasar el periodo de inducción, antes aludido, en un tiempo relativamente corto. Por el contrario, en el caso de los aceites conservados en

recipientes herméticamente cerrados, ya sea a la luz o en la oscuridad, al no disponer más que del oxígeno contenido en su espacio de cabeza y el disuelto naturalmente, el comportamiento es totalmente distinto al del caso anterior, pues la oxidación primaria no puede progresar más que hasta valores muy limitados.

A modo de resumen de todo lo anterior, damos a continuación, un esquema abreviado de la marcha general que sigue la autooxidación de las grasas.



*
#

1.3.2. Flavor.-

Entre los aceites de oliva virgen y los de semillas, existen diferencias fundamentales en lo que concierne a su obtención y preparación, pues mientras que los primeros se extraen por simple prensada del fruto, dando un aceite ya apto para el consumo, los de semilla brutos, son incomedibles directamente y requieren una serie de operaciones para su refinación, que incluye la desacidificación, decoloración y desodorización, lo que conduce a una caracterización general de éstos, como es la ausencia de olor, sabor y de parte de su color.

Todo ello contribuye a que el aceite de oliva virgen, aparezca en el mercado como el único que posee un olor, sabor y color característicos, que lo distingue de los restantes aceites de semilla e incluso de los de oliva refinado.

Nota: *
En términos organolépticos, nos ha parecido conveniente recurrir al arcaísmo flavor, para definir el conjunto de sensaciones olfativo-gustativo-táctiles, percibidas durante el consumo de un alimento y resultantes de la acción de sus distintos componentes químicos, sobre las papilas gustativas y táctiles, y las células receptoras del olor, situadas en la región buco-naso-faríngea del catador. El término flavor se correspondería con el inglés flavour y el francés flaveur, y según el diccionario de Martín Alonso era utilizado por Gonzalo de Berceo en la misma acepción.

Durante el almacenamiento de los aceites de oliva, en recipientes cerrados, se presentan, además de las ya reseñadas, importantes alteraciones que afectan a su flavor. Para la medida de estas alteraciones, dado el desconocimiento que actualmente se tiene sobre la composición de las sustancias responsables del flavor, no ha sido posible encontrar ningún procedimiento que sustituya a los sentidos del gusto y del olfato. Es el ser humano el que ha de decidir si le agradan o desagradan estas variaciones del flavor. En la actualidad disponemos de técnicas, como la del "Panel Test", que han conseguido dar rigor científico a la valoración de los ensayos organolépticos.

Dentro del período de inducción del aceite de oliva, el establecer una posible relación entre el estado de oxidación de una muestra, y sus características organolépticas, resulta casi imposible, pues como se puede ver en los trabajos de Gutiérrez (10), (11) muestras con Índice de Peróxidos más elevados que otras, son puntuadas por el "Panel de catadores" mejor que aquellas de Índice de Peróxidos más bajos. La razón de este hecho se encuentra en los aromas naturales del aceite de oliva, que pueden interferir con los productos de degradación de los glicéridos oxidados. Por ello es particularmente importante la utilización de los ensayos organolépticos, ya que un aceite con-

servado herméticamente cerrado, cuyos productos de oxidación se mantienen dentro de un nivel relativamente bajo, puede contener productos aromáticos alterados, los cuales conducirán a una puntuación organoléptica mala, aún cuando las determinaciones químicas no indiquen un grado de oxidación elevado.

Por todo lo anteriormente expuesto, nos encontramos con la necesidad ineludible de utilizar las técnicas psicométricas("Panel"), para estudiar las alteraciones organolépticas, ya que éstas lógicamente no tienen porque estar íntimamente ligadas con las alteraciones de los glicéridos, al menos dentro de sus primeros estados de oxidación.

1.3.3. Estudios sobre conservación y envasado de aceites comestibles.-

Los problemas de enranciamiento de los diferentes aceites, las dificultades de manipulación que presentan los envases clásicos, y la rápida aplicación de nuevos tipos de materiales para la fabricación de envases, obliga a mantener la investigación en este campo en permanente actualidad.

La comercialización de los aceites y grasas envasados, es un problema que encierra por sí mismo bastante complejidad, ya que sobre él inciden aspectos diferentes, que podemos clasificar como sigue:

a) Económicos; b) relativos a las circunstancias del almacenamiento, tales como: tiempo de comercialización, temperatura, tipo de radiaciones e intensidad de éstas que inciden sobre los aceites envasados; etc. c) factores relativos a la propia naturaleza del envase, como son: su permeabilidad a la grasa, al oxígeno atmosférico y a otros gases, su transparencia a las radiaciones luminosas de distintas longitudes de ondas; etc. d) variables debidas a la propia naturaleza de la grasa, tales como: composición, insaturación y distribución de sus ácidos grasos; composición de su insaponificable; contenido metálico; contenido en productos de oxidación primarios; oxígeno y gases disueltos; composición aromática; etc., finalmente e) los factores dependientes de la relación volumen de aceite, volumen del espacio de cabeza.

De acuerdo con todos los apartados anteriores y tomando en consideración las interacciones que entre ellos existen necesariamente, se comprende la dificultad de encontrar desde el punto de vista práctico, conclusiones ampliamente generalizables para el envasado de los aceites. Ahora bien, esta misma dificultad y la incidencia del envase sobre la calidad del producto envasado, de evidente interés económico, hacen que en los últimos años, estén apareciendo buen número de trabajos sobre este tema.

Así por ejemplo, Winter (12) de un modo general, ha estudiado la capacidad de almacenamiento de diferentes aceites de semillas, para uso comercial, llegando a la conclusión de que las alteraciones oxidativas pueden ser considerablemente reducidas envasando las muestras bajo atmósfera de nitrógeno. Ahora bien, en orden a un estudio más específico del problema, Hugoni (13) y Ricotti (14) han realizado, respectivamente, estudios técnicos sobre recipientes de aluminio y hojalata que consideran de gran utilidad para el almacenamiento de cuerpos grasos. Baldwin (15) ha estudiado ciertos aspectos de la conservación de las cualidades organolépticas del aceite de soja envasado en recipientes pequeños, llegando a la conclusión, de que los envases de aluminio y hojalata ofrecen una buena protección contra estas alteraciones. Gutiérrez (16) ha realizado experiencias sobre la conservación de aceite de oliva refinado, envasado en recipientes pequeños de hojalata, poniendo en evidencia que, las alteraciones organolépticas se desarrollan desde los primeros meses de almacenamiento.

Con la incorporación de los envases de vidrio para la comercialización de los aceites, el problema del envasado adquiere nuevos derroteros, pues en estos envases el aceite es protegido, al menos en su totalidad, de las radiaciones luminosas de corta longitud de onda y como Mor-

gan y colaboradores (17) han demostrado, la acción fotoquímica depende de la longitud de onda y es tanto mayor cuanto menor es ésta. Ramunni (18) ha pretendido determinar las mejores condiciones para almacenar el aceite de oliva, realizando un estudio sobre muestras envasadas en botellas de vidrio de dos tonalidades de color y en envases de hojalata, llegando a la conclusión, de que el aceite de los envases que están totalmente llenos, es el que se conserva mejor.

Gottardi (19) ha estudiado la validez de los recipientes de vidrio para el envasado del aceite, encontrando que, en orden a la oxidación, el I.P. crece más en las muestras expuestas a la luz natural que en las expuestas a la luz ultravioleta. Barton (20) ha estudiado las propiedades protectoras de 12 muestras de celofán coloreadas, en relación al efecto de la oxidación del aceite de oliva a la luz. Rodríguez de la Borbolla y colaboradores (21), al estudiar la influencia de la luz sobre las alteraciones del aceite de oliva, en el caso de los aceites refinados, cuando se mantienen en recipientes abiertos, observan que para conseguir una buena protección contra la acción provocada por la luz, bastaría que el envase (en que estén contenidos) sea opaco a las radiaciones inferiores a 450 nm; en el caso de los aceites rivierra (mezclas de virgen con refinado de oliva) (22) obtienen resultados similares, a pesar de tratarse de aceites que tienen una cierta cantidad de clorofila, por

último (23) encuentran que aceites de oliva virgenes son aparentemente, y a causa de su contenido en clorofila, muy sensibles, a cualquiera de las radiaciones comprendidas entre 320-700 nm, oxidándose con facilidad cuando se les somete a la acción de las mismas; pero dentro de este intervalo se demuestra la existencia de una zona de mínima actividad (aproximadamente de 530 a 630 nm), siendo por el contrario especialmente activas las radiaciones superiores a 630 nm, zona en que el aceite de oliva presenta un máximo de absorción correspondiente a la clorofila.

Garoglio (24) hace una revisión de los fenómenos que tienen lugar en la autoxidación de los aceites vegetales, en relación con los diferentes colores de las botellas de vidrio que se emplean para conservarlos.

Con la incorporación de los plásticos, para la fabricación de envases aptos para los aceites, comenzaron a aparecer un gran número de trabajos, tal como el publicado por D'Ambrosio (25) en el cual se hace una revisión de los problemas concernientes a la conservación de los aceites en las materias plásticas. Ostric (26), Hartmann y Hubig (27) y Petrovici (28) han realizado, por separado, estudios sobre envasado de aceites de semillas en envases de cloruro de polivinilo, encontrando resultados satisfactorios, cuando el almacenamiento no es muy prolongado. Hardorn

y Zurcher (29) han realizado un interesante estudio, sobre la protección que ofrecen ciertos tipos de plásticos a los aceites en ellos envasados. En él han observado que cuanto mejor era la protección contra la luz, tanto más débiles eran las alteraciones del sabor.

La utilización de estas sustancias para el envasado crea un nuevo problema, el de la posible contaminación de las grasas con sustancias cedidas por los plásticos. En este campo, Garlanda y colaboradores (30) estudian el caso concreto de la migración de monómeros de estireno en aceites envasados en polietileno. Rost (31) estudia la contaminación de las grasas con los ftalatos de las materias plásticas.

Sobre la determinación de estabilizadores de las materias plásticas que pasan a los aceites, han aparecido y siguen apareciendo continuamente publicaciones, de entre las que caben destacarse las de Woggon y cols (32), (33), (34) y (35) que a lo largo de una serie de trabajos, han ido identificando los estabilizantes de los envases de polietileno y cloruro de polivinilo, que han pasado al aceite. Una serie análoga es la que está apareciendo actualmente publicada por Figge y Piater (36) y (37).

En el aspecto legal del problema del envasado, caben destacarse los trabajos de Nortz (38) y Garoglio (39); el primero se extiende en una serie de consideraciones,

sobre las especificaciones que deben cumplir los envases de plásticos, destinados al envasado de los aceites, mientras que el segundo señala la utilidad de establecer un límite de conservación de los aceites, no sólo en relación a ellos mismos, sino también al tipo de envase. Y por último, dentro del aspecto económico y técnico, caben destacarse los trabajos de Dos Santos (40), Aubry (41) y Alcazar (42).

Hasta ahora los trabajos reseñados han sido realizados en su mayoría utilizando aceites de semillas y por consiguiente refinados. A continuación vamos a reseñar los trabajos existentes sobre el aceite de oliva. Con anterioridad ya se ha hablado de aquellos, en los que se han empleado envases de hojalata y vidrio (16, (18), (21), (22) y (23), a continuación nos detendremos en los que se han realizado utilizando los envases de resinas termomoldeables.

Gracián y Arévalo (43) en un estudio sobre la conservación de aceite de oliva en envases de polietileno, en una nota preliminar ponen de manifiesto que el insaponificable sufre una alteración claramente acusable en el escualeno; estos mismos autores en un trabajo posterior (44), observan que la conservación en frascos de polietileno, es mucho peor que en frascos de vidrio de color topacio. Un interesante trabajo sobre el envasado del aceite de oliva, en botellas de cloruro de polivinilo es el realizado por Petruccioli (45), en el que se sigue la marcha de la conservación del aceite, por medio de un buen número de pruebas, lle-

gando a la conclusión, de que este envase es apto para la conservación de este aceite; no obstante, consideramos que el tema no está del todo abordado, puesto que queda sin tratar una cuestión: su característica organoléptica, que es precisamente privativa de este aceite.

Gutiérrez (46) ha estudiado el envasado del aceite de oliva en polietileno de diferentes densidades, llegando a la conclusión de que la densidad del polímero tiene gran importancia en cuanto a la conservación de las características organolépticas, que no obstante la mantienen mejor que los envases clásicos de vidrio; estos resultados fueron confirmados en un trabajo posterior (47), realizado con envases de polietileno de alta densidad. Este mismo autor ha realizado un estudio de envasado en frascos de cloruro de polivinilo (48) encontrando al igual que otros autores (26), (27), (28) y (45) resultados satisfactorios, que se revalorizan en los ensayos organolépticos.

Con todo lo anteriormente reseñado, queda en evidencia la necesidad de realizar un estudio, en el que se incluyan los tipos de envase más empleados, hoy en día para la comercialización del aceite de oliva, estudio que por otra parte, ha de llevarse a cabo en condiciones, lo más parecidas posibles a las que suelen darse durante la comercialización de los aceites, y en el que no podrá soslayarse

el análisis de la conservación de las características organolépticas.

1.3.4. Estudios sobre alteraciones aromáticas del aceite de oliva.-

Concretándonos al estudio de los aceites de oliva Naoki Iwata (49) y Prevot (50) hacen importantes trabajos sobre las alteraciones oxidativas que conducen a la rancidez del aceite de oliva, mediante el empleo de la cromatografía gaseosa, indicando las técnicas utilizadas e identificando a un buen número de compuestos, particularmente: aldehídos, cetonas, etc., presentes en el aceite rancio, algunos de los cuales ya habían sido identificados por cromatografía combinada de columna, papel y de capa fina en el Instituto de la Grasa de Sevilla (9).

Ahora bién, en relación a los componentes aromáticos naturales del aceite de oliva virgen, las investigaciones se hayan en sus comienzos. En 1968 Gutiérrez y Nosti (51) publican los primeros aromagramas de cuatro aceites de oliva españoles; posteriormente, han estudiado las variaciones aromáticas de aceites de oliva envasados en diversos materiales, observando, que las diferencias organolépticas dadas por el "Panel", se relacionaban con algunas variaciones cuantitativas de sus componentes aromáticos (52).

En el Congreso de la International Society for Fats Research (I.S.F.), Septiembre 1970, se presentaron los resul-

tados de los primeros intentos de identificación de los compuestos aromáticos de los aceites de oliva, utilizando para ello la técnica de GC+MS acopladas.

En estos trabajos, junto a una serie de aldehídos saturados, insaturados y cetonas, ya identificados en el aceite de oliva y en otras grasas oxidadas (9-50), se encontraron ésteres ciclo-alquílicos, hidrocarburos alifáticos-aromáticos, con un doble enlace en un punto no identificado de su parte alifática y otro grupo de compuestos que presentan, posiblemente, estructuras de ésteres ciclo-alquílicos (53) (54).

Dado que, la composición aromática es una "fotografía" instantánea de las características organolépticas del aceite en el momento del ensayo y que por otra parte, las variaciones aromáticas entre distintas muestras, son extraordinariamente diferentes para un mismo aceite, cuando se cambian las condiciones de extracción, almacenamiento, etc., siendo aún mucho mayores cuando entran en juego, tiempo de maduración, variedades de frutos, campaña olivarera etc., consideramos que desde un punto de vista práctico y realista, nuestro intento de correlacionar de una forma global, las pruebas organolépticas, realizadas por un " PANEL TEST," con los perfiles de los aromagramas obtenidos por C.G.L. es el paso previo y fundamental para la valoración de su calidad,

2. P A R T E E X P E R I M E N T A L

2.1. PLAN DE TRABAJO

2.1.1. Consideraciones generales.-

La experiencia se ha planteado de forma que, las condiciones de almacenamiento, fuesen lo más parecidas posibles, a las que suelen darse durante el período de comercialización de los aceites.

Para encontrar dichas condiciones, se realizaron una serie de consultas entre las firmas envasadoras. En ellas se les pedía dicesen su opinión sobre la forma del almacenamiento, tiempo de duración, temperatura y clase de luz (a las que debían someter las muestras).

Los resultados de esta encuesta fueron los siguientes:

De las 30 empresas consultadas, 24 contestaron a las preguntas, de la siguiente forma:

<u>Tiempo de duración del almacenamiento</u>		
<u>de 1 a 3 meses</u>		<u>de 1 a 6 meses</u>
6		18
<u>Temperatura</u>		
<u>Menos de 25°C</u>	<u>25°C</u>	<u>Más de 25° C</u>
4	8	10

Iluminación

<u>Luz natural</u>	<u>Luz artificial</u>	<u>Luz mixta</u>
7	10	7

Intensidad de iluminación

<u>1.000 lum/m²</u>	<u>1000-1.500 lum/m²</u>	<u>2.000 lum/m²</u>
3	1	-

2.1.2. Tiempo de almacenamiento.-

Las contestaciones sobre el tiempo de almacenamiento, dadas por los industriales en la encuesta anterior, son muy variables; existe desde quien opina que un mes de almacenamiento es suficiente, a quien considera necesario estudiar un tiempo de almacenamiento tal, que les proporcione una garantía máxima, para lo cual sería necesario alargar el período de almacenamiento excesivamente.

Nuestra opinión es, que los envasadores desconocen realmente el período normal de almacenamiento, debido a las dificultades de un verdadero control en el ciclo de comercialización de los aceites embotellados, cosa muy difícil de realizar sin un fechado de botella a la salida de la fábrica.

Circunstancialmente hemos podido comprobar la venta

de alguna caja con más de un año de salida de la fábrica. Creemos sinceramente que aunque estos hechos pueden ser aislados, han de darse casos parecidos, aunque de menor duración, con alguna frecuencia.

Por otra parte, no creemos que en la mayoría de los supermercados y tiendas minoristas, se tenga el menor cuidado de reponer, por riguroso turno, las botellas vendidas, de forma que se vayan consumiendo las que llevan más tiempo en las estanterías, y consiguientemente expuestas a la luz.

Esto parece confirmarlo el hecho de que, en nuestra visita a algunos supermercados y tiendas, hemos encontrado envases conteniendo aceite de la misma marca, con diferencias importantes en el tiempo de almacenamiento, fácilmente apreciables para nosotros, particularmente cuando se trata de envases de plástico.

Así pues, de acuerdo con la mayoría de los resultados de nuestra encuesta a los envasadores y de nuestra experiencia, hemos considerado conveniente que los ensayos de almacenamiento se prolonguen seis meses para los ensayos a la luz y 8 meses para los realizados en la oscuridad.

2.1.3. Temperatura.-

Todos los envasadores de Andalucía proponen tempe-

raturas superiores a los 25°C, cosa lógica, si tenemos en cuenta que las máximas de los meses de junio, julio, agosto y septiembre, sobrepasan los 30°C, a la sombra y alcanzan frecuentemente temperatura de 35°C y hasta 40°C.

Extremando un poco las condiciones medias, puesto que ésto haría posible dar un margen de seguridad, que permitiera generalizar más las conclusiones del ensayo, hemos creído necesario someter las muestras a una temperatura constante de 28°C \pm 1°C.

2.1.4. Iluminación.-

En la conservación natural, durante el tiempo de comercialización, el aceite se encuentra sometido tanto a la radiación natural, como a la artificial, así como a ambas.

Es lógico que en una gran cantidad de supermercados y tiendas, dadas sus grandes dimensiones, se extienda de día en día, la necesidad de suplementar la luz natural con la artificial, aún a las horas del mediodía. Es pues natural que nuestra encuesta nos dé un buen número de contestaciones en este sentido, pero después de estudiar el problema, nos hemos decidido a realizar el ensayo con luz artificial, dada la gran complicación que supondría someter las muestras a la luz natural y la dificultad de controlar su intensidad a lo largo del día.

Para determinar la intensidad, y debido a la falta de resultados aportados por la encuesta, hemos hecho una serie de visitas a tiendas y supermercados, midiendo con un fotómetro Lightmaster, la intensidad luminosa incidente sobre las estanterías, que destinan los comercios para el almacenamiento y exposición al público de las botellas de aceite. A la vista de los valores obtenidos decidimos una iluminación de 1.150 lum/m^2 .

En la comercialización de los aceites, una vez envasados éstos, se transportan y conservan en cajas de cartón, hasta que son de nuevo desembalados y colocados en las estanterías para su venta. De acuerdo con esto, los aceites pasan por dos estados diferentes: oscuridad, y luz. Por ello en este ensayo hemos incluido estas dos variables; pero siendo los intervalos de ambas condiciones imprevisibles, hemos programado el tiempo de los almacenamientos en una y otra circunstancia, en ocho y seis meses respectivamente, para conseguir un mayor margen de seguridad en las posibles conclusiones.

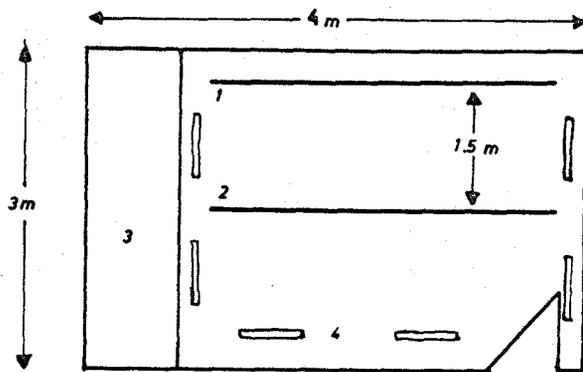
Además se ha incluido una tercera variable, en la cual las muestras se han mantenido durante cierto tiempo (ver esquema del plan de trabajo) en la oscuridad y posteriormente han pasado a la luz. Con estas condiciones mixtas, hemos intentado cubrir todas las posibles variantes que pueden darse durante la comercialización de los aceites envasados.

2.1.5. Local.-

Para conseguir que las condiciones de almacenamiento anteriormente elegidas y descritas, se mantuviesen constantes a lo largo del ensayo, hemos preparado una cámara termostática, ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) cuyo esquema se adjunta más abajo, en la que se ha montado una estantería de tres metros de largo y tres de alto, donde se han colocado los envases, como puede verse en la figura A.

Como fuente de iluminación hemos situado frente a las estanterías en que se colocaron las muestras, cinco tubos fluorescentes de 40W y ocho de 20W. Los tubos se colocaron de forma que la luz incidente sobre la estantería que pretendíamos iluminar homogéneamente, fuese de la intensidad media deseada. Para conseguir una mayor homogeneidad, se estudió el reparto de los tubos fluorescentes, y las paredes y el suelo se pintaron de blanco. De esta forma se consiguió una intensidad bastante regular, que medida con un fotómetro Lightmaster de la Evans Electroselenium Ltd., en sentido vertical daban una diferencia de 1,05%, mientras que en sentido horizontal estas diferencias eran como máximo de 2,03%.

Las muestras que debían permanecer en la oscuridad, se almacenaron dentro de la misma cámara termostática, guardadas en cajas de cartón.



- (1) Estanterías para las muestras
- (2) Fuentes de iluminación
- (3) Zona oscuridad para las muestras
- (4) Radiadores con regulación automática.

Esquema de la cámara

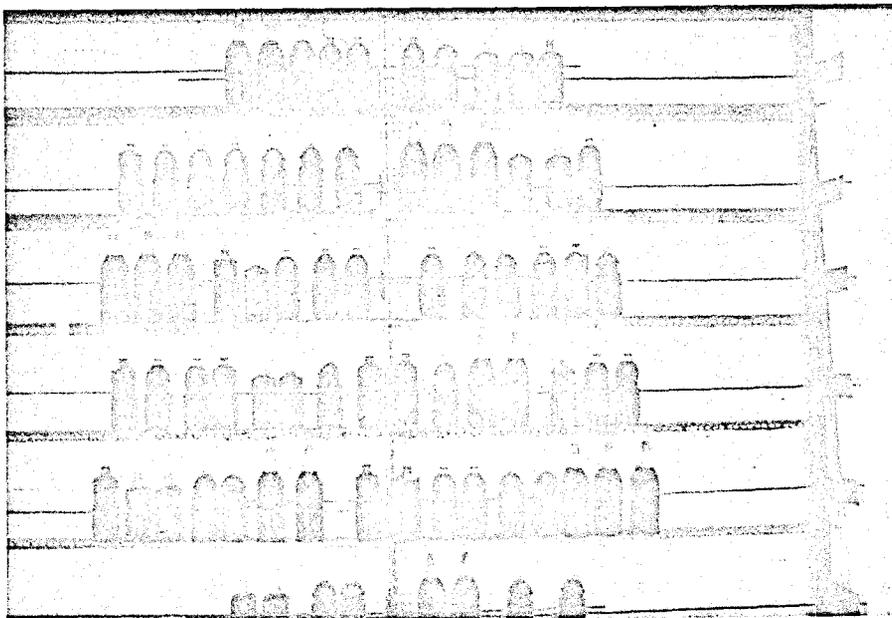


Fig. A

2.1.6. Tipos de envases.-

Tres son los tipos de materiales que se utilizan hoy en día, para la fabricación de envases para la comercialización de los aceites: Hojalata, vidrio y plástico. En este ensayo pretendemos estudiar la conservación del aceite de oliva, en envases de dichos materiales. Sin embargo, deseamos aclarar, que dada la diversidad de tipos de envases, principalmente, en lo que se refiere a materiales plásticos, nos es imposible generalizar nuestros ensayos, para cubrir todos los tipos y formulaciones existentes, por ello nos hemos limitado a utilizar, los envases más usualmente encontrados en el comercio, de los que hemos podido conocer sus características fundamentales.

Hojalata.-

De los dos tipos de hojalata que suelen fabricarse, electrolítica y coke, hemos elegido la primera, ya que el tipo coke, debido a su espesor y revestimiento, no suele usarse en el envasado de aceites.

La empleada en el ensayo, ha sido una hojalata de banda estañada electrolíticamente, por el procedimiento Ferrostán; los envases son cilíndricos, de 1 litro de capacidad, con 0,18 mm de espesor, 0,25 L/cb de revestimiento de estaño y un peso aproximado de 110 ± 1 gr.

Vidrio.-

Botellas de vidrio común, transparentes, de 1 litro de capacidad, de las usualmente empleadas por los envasadores de aceite, con un grueso de pared de 2,8 mm y un peso aproximado de 800 gr. La curva de transmisión se adjunta en la figura B.

Plásticos.-

Entre las numerosas sustancias plásticas utilizables en nuestro país, las que hasta ahora tienen mayor posibilidad son:

Cloruro de polivinilo (PVC), polietileno y polipropileno.

En la actualidad los más utilizados para el envasado de aceites son polietileno y PVC.

Ensayos realizados en el Instituto de la Grasa de Sevilla han permitido comprobar, de una manera general, que todos tienen algunas ventajas e inconvenientes. Pero la tecnología de los plásticos, suministra suficiente número de tipos, dentro de cada clase de resina, como para que no sea fácil decidir el comportamiento de los envases para el aceite, sin un estudio más detallado y minucioso.

En el caso de polietileno (10), ya se sabe que la densidad del polímero es un factor digno de tenerse en

cuenta en relación, no sólo a la permeabilidad del aceite a través del envase (exudación), sino a la permeabilidad del oxígeno hacia el interior de la botella, lo que, como es lógico, facilita la oxidación del aceite.

El polietileno de alta densidad, obtenido por el procedimiento a baja presión, tiene moléculas más compactas gracias a la ausencia de cadenas laterales, lo que le confiere propiedades de resistencia mejorada, y en particular una mayor inercia química e impermeabilidad a los líquidos y gases.

Por otros ensayos realizados (11), sabemos que en los envases de PVC la protección que éstos ofrecen al oxígeno atmosférico es bastante buena y los problemas de la exudación no se presentan, aunque los envases son más frágiles que los de polietileno.

Por todo esto, en este ensayo, hemos incluido un tipo de polietileno y dos de PVC.

En el caso del polietileno, se trata de botellas fabricadas con un "compounds" mezcla de 95% de Alcuña E.0076 de baja densidad con 5% Marlex Phillips Calatrava 6009 de alta densidad, con un grueso de pared de 0,55 mm y un peso aproximado de 28 gr. Se trata de un tipo de envase que se ha generalizado bastante en España.

En el caso de los envases de PVC, uno de ellos, es un tipo fabricado con un "compounds" de Hispavic, que presenta un grueso de pared de 0,47 mm y un peso aproximado de 43 gr. A lo largo del ensayo, a las botellas de estas características, denominaremos PVC I, y en ellas al no disponer más que de un número limitado, solo se ha envasado un aceite virgen (virgen II) y el tipo rivierra. El otro tipo de envase de este material, ha sido fabricado con "compounds" de Plastirex tipo cristal 2100 y presenta un grueso de pared de 0,29 mm y un peso aproximado de 32 gr. A este envase denominaremos PVC II. En ambos casos se trata de botellas de 1 l. de capacidad.

Las curvas de transmisión de todos estos envases se adjunta en la figura B.

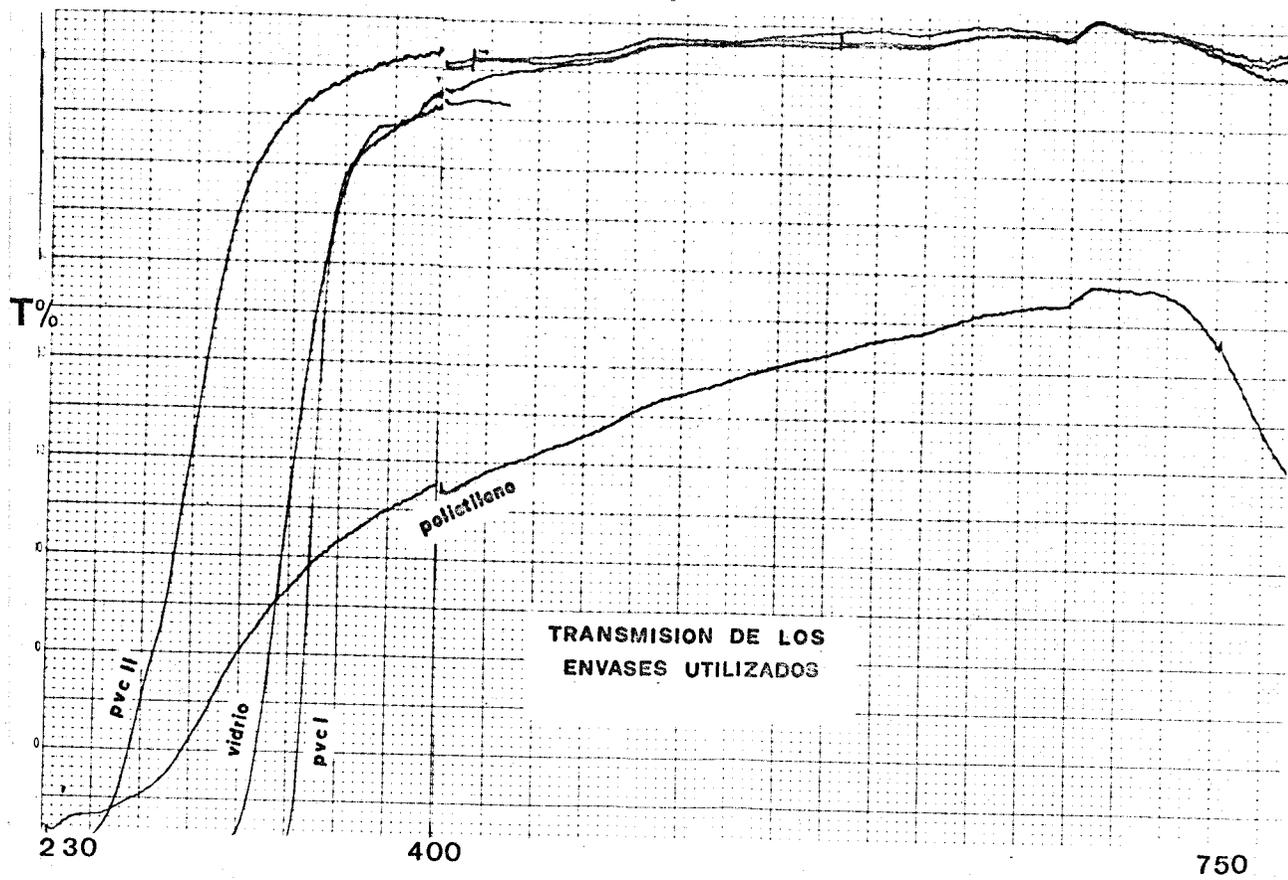


FIG. B

2.1.7. Criterio seguido en la elección de los aceites y características iniciales de los elegidos.-

El aceite de oliva, al ser un producto natural sometido durante su formación a las variaciones ecológicas de olivo, no permite la elección de patrones de características perfectamente representativas, definidas y constantes. Ante la imposibilidad de disponer de tales patrones y puesto que nuestro deseo era realizar un trabajo cuyos resultados pudiesen ser ampliamente generalizados, consideramos conveniente elegir aceites cuyos índices químicos y características tuviesen los valores más frecuentes, dentro del tipo denominado fino, de la campaña aceitera. Para determinar estos valores medios, se realizó un desmuestre, principalmente por las provincias de Sevilla, Córdoba y Jaén, así como en algunas otras zonas olivareras de España.

De las 49 muestras cedidas por almacenistas y envasadores, seis fueron desechadas, por no cumplir las especificaciones, dadas por el Consejo Oleícola Internacional, para este tipo. Las restantes muestras, para aquellos índices y determinaciones químicas, que consideramos más importantes para definir la calidad, dieron los siguientes valores medios.

	<u>Media</u>	<u>Desviación típica</u>
Acidez (% a.g.l.)	1,39	0,7
I.P. (meg /Kg.)	12,00	2,4
$E_{1cm}^{1\%}$ 270 nm	0,136	0,02
Estabilidad A.O.M.	24 h . 10 min.	7
Puntuación organoléptica	6,3	1,7

De los 43 aceites estudiados, ninguno cumplía exactamente con todos y cada uno de los valores de las determinaciones medias obtenidas para el grupo. Por ello, y para salvar esta dificultad, decidimos elegir en lugar de un solo aceite dos, con la condición de que los valores de cada uno de sus índices estuviesen comprendidos dentro de la correspondiente desviación típica, del grupo desmuestado, para la misma prueba.

Esto en cierto aspecto era ventajoso, ya que nos serviría para generalizar las conclusiones.

Para distinguir a ambos aceites, considerados como prototipo a lo largo del estudio, los denominaremos virgen I y II. Las características que presentaban al iniciar el ensayo eran:

Aceite virgen I

(acidez inferior a 1% a.g.l.) Extra.

Acidez = 0,81% a.g.l.

I.P. = 11,3 meq/Kg

Estabilidad = 22 h 20 min.

E₂₃₂ = 1,98

E₂₇₀ = 0,13

Puntuación organoléptica = 5,00 (sobre una escala de 10)

Tocoferoles = 500 p.p.m.

Color = ver gráfico (figura 0)

Kreis = 8,3 unidades rojas Lovihond

Composición en ácidos grasos = 13,5% palmítico, 0,6% palmitoléico, 1,0% esteárico, 73,4% oléico y 11,5% linoléico.

Aceite virgen II

(acidez superior a 1% a.g.l.) Fino

Acidez = 1,65% a.g.l.

I.P. = 12,0 meq/Kg

Estabilidad = 16h. 25 min.

E₂₃₂ = 1,86

E₂₇₀ = 0,12

Puntuación organoléptica = 7,2 (sobre una escala de 10)

Tocoferoles = 369 p.p.m.

Color = ver gráfico (figura C)

Kreis = 9,0 unidades rojas Lovibond

Composición en ácidos grasos = 13,2 % palmítico, 0,8% palmitoléico, 1,4% esteárico, 74% oléico, 10,4% linoléico.

Para completar el estudio, decidimos incluir un aceite tipo rivierra. En su preparación se empleó un aceite de oliva refinado, de buena calidad, al que ^{se} añadió un 20% del aceite de oliva virgen de más baja acidez (virgen I) previamente elegido.

La mezcla preparada poseía los siguientes índices químicos y características:

Aceite rivierra

(mezcla de 80% refinado con 20% de virgen I)

Acidez = 0,43% a.g.l.

I.P. = 3,0 meq/Kg.

Estabilidad = 21h 45 min.

E₂₃₂ = 2,21

E₂₇₀ = 0,56

Puntuación organoléptica = 6,4 (sobre escala de 10)

Tocoferoles = 230 p.p.m.

Color = ver gráfico (figura C)

Kreis = 4,0 unidades rojas Lovibond

Composición en ácidos grasos = 13,7% palmítico.

0,4% palmitoléico, 1,6% esteárico, 76,8 oléico

y 7,4% linoléico.

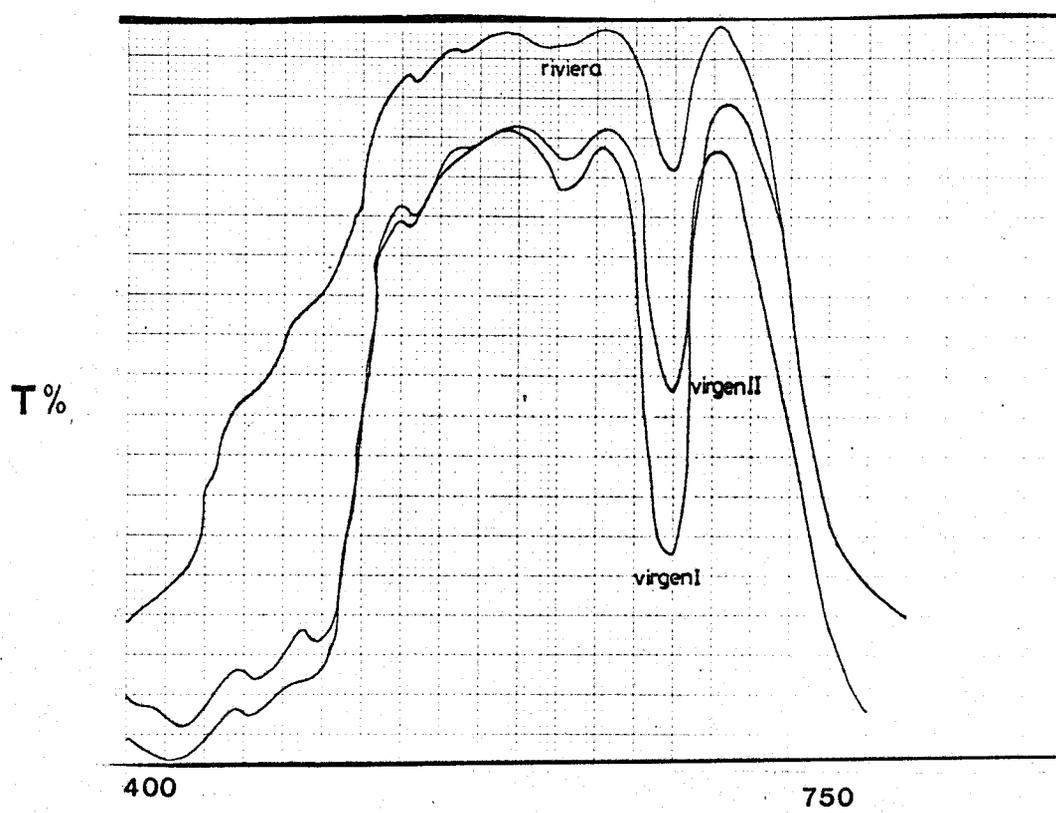


Figura C

2.1.8. Desmuestres.-

Los desmuestres se realizaron a intervalos de unos 25 días, por considerar que este tiempo era suficiente para observar posibles diferencias de magnitud aceptable, en las pruebas escogidas para seguir la marcha de las características de los aceites.

Para realizarlos, se separaron muestras de los aceites que se estudiaban, envasados en los diferentes tipos de recipientes que habían permanecido almacenados a la luz o en la oscuridad. Cada una de las muestras, una vez analizadas, se desechaban, de forma que una muestra, una vez abierta, no volvía a utilizarse.

Como patrones de comparación, se tomaban muestras de los mismos aceites, que se habían conservado en un frigorífico a 4°C, envasados en botellas de vidrio completamente llenas. Estas condiciones se han elegido, de acuerdo con experiencias anteriores, por ser las que menos alteraciones producen en los aceites.

El plan de desmuestres que se siguió a lo largo del ensayo, está detallado en el esquema adjunto, (Figura D), Para el estudio de correlaciones entre ensayos organolépticos y cromatografía gaseosa de los aromas, se eligieron las muestras que habían permanecido 175 días expuestas a la luz.

Para seguir la marcha de las posibles alteraciones de los aceites almacenados, se realizaron, a los intervalos que indica el esquema del plan de trabajo, las siguientes determinaciones:

- a) Determinación de acidez.
- b) Cromatografía gaseosa de ésteres metílicos.
- c) Índice de Peróxidos (I.P.)
- d) Extinción específica a 232 y 270 nm.
- e) Prueba de Kreis.
- f) Color de los aceites de oliva.
- g) Antioxidantes naturales, tocoferoles.
- h) Estabilidad A.O.M.
- i) Determinación de trazas metálicas.
- j) Pruebas Organolépticas
- k) Estudio de los aromas (C.G.L.) de los aceites envasados.

Las dos primeras determinaciones sólo se realizaron al comienzo de la experiencia, al objeto de poder catalogar los aceites que se iban a ensayar.

ESQUEMA DEL TRABAJO REALIZADO
(Muestras estudiadas)

Desmuestras	Hojalata electrolítica	Vidrio	PVC I	PVC II	Polietileno
1.º	25 días oscuridad	25 días luz	25 días luz	25 días luz	25 días luz
2.º	50 días oscuridad	50 días luz 25 días osc. + 25 días luz	50 días luz 25 días osc. + 25 días luz	50 días luz 25 días osc. + 25 días luz	50 días luz 25 días osc. + 25 días luz
3.º	75 días oscuridad	75 días luz 75 días oscuridad 50 días osc. + 25 días luz	75 días luz 75 días oscuridad 50 días osc. + 25 días luz	75 días luz 75 días oscuridad 50 días osc. + 25 días luz	75 días luz 75 días oscuridad 50 días osc. + 25 días luz
4.º	100 días oscuridad	100 días luz 100 días oscuridad 50 días osc. + 50 días luz	100 días luz 100 días oscuridad 50 días osc. + 50 días luz	100 días luz 100 días oscuridad 50 días osc. + 50 días luz	100 días luz 100 días oscuridad 50 días osc. + 50 días luz
5.º	125 días oscuridad	125 días luz 125 días oscuridad 75 días osc. + 50 días luz	125 días luz 125 días oscuridad 75 días osc. + 50 días luz	125 días luz 125 días oscuridad 75 días osc. + 50 días luz	125 días luz 125 días oscuridad 75 días osc. + 50 días luz
6.º	150 días oscuridad	150 días oscuridad 75 días osc. + 75 días luz 50 días osc. + 100 días luz	150 días oscuridad 75 días osc. + 75 días luz 50 días osc. + 100 días luz	150 días oscuridad 75 días osc. + 75 días luz 50 días osc. + 100 días luz	150 días oscuridad 75 días osc. + 75 días luz 50 días osc. + 100 días luz
7.º	175 días oscuridad	175 días luz 175 días oscuridad 100 días osc. + 75 días luz 125 días osc. + 50 días luz	175 días luz 175 días oscuridad 100 días osc. + 75 días luz 125 días osc. + 50 días luz	175 días luz 175 días oscuridad 100 días osc. + 75 días luz 125 días osc. + 50 días luz	175 días luz 175 días oscuridad 100 días osc. + 75 días luz 125 días osc. + 50 días luz
8.º	200 días oscuridad	200 días oscuridad 125 días osc. + 75 días luz 150 días osc. + 50 días luz	200 días oscuridad 125 días osc. + 75 días luz 150 días osc. + 50 días luz	200 días oscuridad 125 días osc. + 75 días luz 150 días osc. + 50 días luz	200 días oscuridad 125 días osc. + 75 días luz 150 días osc. + 50 días luz
9.º	225 días oscuridad	225 días oscuridad	225 días oscuridad	225 días oscuridad	225 días oscuridad

Figura D

2.2. DETERMINACIONES A UTILIZAR

2.2.1. Determinación de acidez.-

Para determinar la acidez libre que presentan los aceites antes de iniciar el ensayo, se ha utilizado la norma UNE 55011, expresando los resultados en porcentajes de ácidos grasos libres.

2.2.2. Cromatografía gaseosa de esteres metílicos.-

La determinación de la composición en ácidos grasos de los aceites, se ha realizado por cromatografía gaseosa de los esteres metílicos, utilizando una columna de E.G.S., según la técnica descrita en la propuesta de norma UNE, adoptada, con carácter provisional, por la C.A.T. (Comisaría General de Aprovisionamiento y Transporte) circular 7/70 de la C.A.T. Anexo 9 (B.O.E.) 93 13.8.70.

2.2.3. Índice de peróxidos.-

La medida más generalizada para determinar el grado de oxidación, en el campo de las grasas, es el índice de peróxidos.

El fundamento de su determinación yodimétrica es la capacidad de los peróxidos de liberar el yodo del KI. Ahora bien, los numerosos procedimientos, que se basan en el mismo principio, varían grandemente en los detalles de la técnica seguida.

En orden cronológico, los primeros métodos propuestos fueron los de Wheeler (55), muy empleado en Norteamérica, de Lea "frío" (56), de Skellon y Wills (57) y Lea modificado por Skellon y Turston (58).

Rodríguez de la Borbolla y Gutiérrez (59), han estudiado los métodos de Wheeler y Skellon y Wills para la determinación de peróxidos en diferentes muestras de aceites de oliva españoles, comparando los resultados que ellos obtienen con los del método frío de Lea, que se toma como patrón. Por los resultados de las experiencias realizadas recomiendan dos métodos, de distinto grado de exactitud, pero de precisión suficiente para los diferentes casos que puedan presentarse. Sin embargo, puesto que el método de determinación del I.P. ha sido posteriormente unificado, se ha seguido el establecido en la Norma UNE nº 55023. Los resultados se han expresado como miliequivalentes de oxígeno peroxídico por Kg de grasa.

2.2.4. Extinción específica a 232 y 270 nm.-

La espectroscopía UV de los aceites es una de las técnicas analíticas que más se han desarrollado en los últimos años. Su fundamento se encuentra en el siguiente hecho: un aceite, obtenido por presión, de aceitunas sanas y en condiciones óptimas de madurez y sin haber sido some-

tido a manipulaciones que no sean las naturales y meramente físicas, como decantación, filtración, etc., realizadas sin calentamiento, producen un registro de extinción, en la zona de 230 a 360 nm, es decir, en el U.V. próximo, semejante al que producen los ácidos grasos o sus glicéridos en estado de pureza, presentando unas extinciones específicas muy bajas entre los 260 y 280 nm, generalmente inferiores a 0,2; es decir, que son muy transparentes para las radiaciones de esta longitud de onda.

Si se producen alteraciones en la composición del aceite, bien sea por anomalías en la maduración del fruto, proceso de oxidación por acción directa del oxígeno del aire, etc., en la inmensa mayoría de los casos, se originan ácidos bi o polifuncionales, en los que abundan las funciones oxigenadas, principalmente alcohol y carbonilo. Estos productos absorben en su mayoría, y en una manera inespecífica, en la región en la que los aceites son muy transparentes.

Los trabajos sobre la espectrofotometría en el U.V. de los aceites vírgenes, desarrollados principalmente por J.P. Wolf (60), nos han llevado a estudiar la evolución de los valores de extinción a 232 y 270 nm, en los aceites de oliva envasados en los distintos materiales, a lo largo del periodo de almacenamiento.

Las determinaciones de extinción a 232 y 270 nm, se han realizado en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer 139, disolviéndose las muestras en ciclohexano, y expresando los resultados de la extinción específica referida al 1%.

2.2.5. Prueba de Kreis.-

Entre las pruebas más corrientemente empleadas para medir el grado de rancidez de las grasas: T.B.A. (61), prueba de dicarbonilos (62), etc., la más antigua, pero también hasta ahora la más utilizada, en el caso de los aceites y grasas, es la propuesta por Kreis (63). Esta consiste en la observación del color producido por la floroglucina, sobre el extracto clorhídrico de la grasa. Se fundamenta, según Powick (64) en que el acetal glicérido del epihidri-naldehído, producido por la oxidación de la grasa, es desdoblado por el clorhídrico y el aldehído libre se transforma en floroglúcido, de color rojo. Según dicho autor, el epihidri-nalaldehído se produce en cantidades equimoleculares con el aldehído heptílico, que según Scala (65), es el compuesto al que se debe, principalmente, el olor a rancio. Si esto fuese estrictamente cierto, la prueba de Kreis sería una medida precisa del desarrollo organoléptico de la rancidez, lo que sin embargo no ocurre, como han comprobado algunos autores.

Patton, Kenney, y Kurtz (66) discrepan de la teoría anterior, ya que creen que el compuesto responsable del color rojo, es el aldehído malónico, cuyo floroglúcido posee idénticas características espectrales a las del epihidrialdehído.

Dado el inconveniente de la técnica primitiva de Kreis, R. Borbolla y Gutiérrez (67) (68), después de una serie de ensayos sobre aceites de oliva, recomiendan las modificaciones de Taffel y Revis (69) y las de Watts y Mayor (70).

La técnica seguida en este trabajo ha sido la modificación de Taffel y Revis, propuesta por aquellos autores, en la cual se toman 10 cc de aceite o 5 cc en el caso de aceites rancios, se agitan con 10 cc de ClH concentrado durante 30 segundos, en un frasco con tapón de vidrio, se añaden 10 gotas de fluroglucina al 5% en alcohol y la mezcla se agita durante 30 segundos, dejándola luego reposar, durante uno o dos minutos, hasta la separación de las capas. Se separa la capa acida y se mide su color en el tintómetro de Lovibond, utilizando una cubeta de una pulgada. Como la capa ácida puede desprender vapores de ClH, dada la alta concentración de este, la cubeta del colorímetro fue cubierta con un vidrio plano engrasado.

2.2.6. Color de los aceites de oliva.-

Otra de las características específicas del aceite de oliva, es la de poseer un color amarillo verdoso, debido a la presencia de ciertos pigmentos responsables de este color, los carotenos que dan el color amarillo y la clorofila de color verde. Las propiedades cromógenas de un aceite se encuentran afectadas por dos factores principalmente, la temperatura y la oxidación, cuando esta ha progresado hasta el punto del enranciamiento, se observa un grado apreciable de blanqueo en el aceite, que puede llegar hasta el amarillo muy pálido.

La determinación del color de una sustancia, se realiza por medio de técnicas espectrofotométricas. La curva de transmisión obtenida puede también referirse a tres coordenadas (C.I.E.), las cuales nos definirán el color.

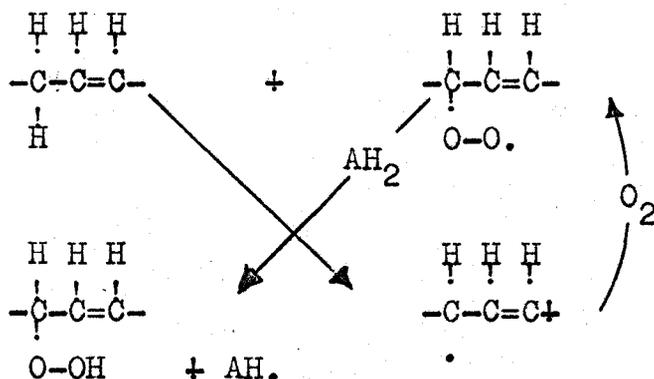
Para determinar las posibles variaciones de color que experimenta el aceite durante su almacenamiento, en las condiciones del ensayo, hemos medido la transmisión en el visible, entre 390 y 700 nm, con ayuda de un espectrofotómetro Bauch-Lomb, modelo Spectronic 505, utilizando cubeta de 1 cm.

Después de algunas representaciones en coordenadas C.I.E., hemos decidido realizar el estudio con ayuda de las propias curvas de transmisión, pues consideramos inte-

resante estudiar las zonas de absorción (caróteros y clorofilas) por separados.

2.2.7. Antioxidantes naturales, tocoferoles.-

Se ha comprobado reiteradamente, que los aceites y grasas naturales, por contener cantidades mínimas de sustancias capaces de inhibir poderosamente la oxidación, son mucho más resistentes a la alteración oxidativa que los glicéridos puros. A pesar de los notables estudios realizados en los últimos años sobre el conocimiento de los antioxidantes en grasas y aceites, la naturaleza y forma de acción de estas sustancias son todavía poco conocida, aunque, en líneas generales, su acción parece realizarse de acuerdo con un mecanismo reductor que esquematzaremos como sigue:



AH_2 = Antioxidante.

De forma que siendo el antioxidante y no una nueva molécula de ácido graso normal la que cede el H:, se rompe la reacción en cadena.

Un importante tipo de antioxidante de distribución casi universal, en el campo de las grasas, son los tocoferoles, algunas de cuyas formas poseen actividad vitamínica (Vitamina E α -tocoferol). Estos fueron descubiertos por Evans y Colbs(71) siendo comprobado como antioxidantes efectivos por Olcott y Emerson (72).

Todo ello hace que la determinación de tocoferoles en grasa tenga gran interés, no sólo por su carácter, de antioxidantes naturales sino también por la naturaleza vitamínica de estos.

Para su determinación se ha seguido el método propuesto por Stern y Baxter (73), pero en su adaptación de Vioque y colaboradores (74) para poder trabajar con cantidades de aceite del orden de varios miligramos, que se pesan en recipientes de seis ml de capacidad, operando bajo luz roja, se adiciona el disolvente y los reactivos recomendados, mezclados previamente, en un volumen conjunto de 5 ml. La curva de calibrado cubre el intervalo de 4 a 25 mgr. de tocoferoles. El tiempo de reacción es 10 minutos. Las extinciones se miden en un espectrofotómetro Spectronic 20.

El inconveniente de esta técnica, se encuentra en el hecho de que al trabajar directamente sobre el aceite, sin previa separación de los tocoferoles, otras sustancias reductoras presentes, pueden interferir; dando valores superiores al de los tocoferoles realmente presentes. Sin embar

esta posible fuente de error, es una ventaja en nuestro caso, ya que tratándose de un estudio sobre la oxidación del aceite de oliva, la determinación de estas sustancias reductoras (probablemente de tipo fenólico) no es inconveniente grave, dado su posible carácter antioxidante.

2.2.8. Estabilidad.-

Otra de las cualidades que debe tener una grasa es la de ser estable, es decir: la de permanecer el mayor tiempo posible sin alterarse.

La técnica empleada en nuestras determinaciones consiste en burbujear oxígeno, con un flujo de 8,4 l/h, a través de la muestra (20 g. de aceite) que se mantiene en un baño de vapor de agua. Para determinar con mayor exactitud el fin del período de inducción, las muestras se hacen por triplicado, comenzando el flujo de oxígeno a pasar por cada una de ellas, a intervalos de una hora aproximadamente. Cuando la primera muestra huele a rancio, se separan las tres del baño y se les determina el I.P., representándolos frente al tiempo. Como período de inducción, se toma el tiempo necesario para que la grasa adquiera un I.P. determinado, que en el aceite de oliva se toma como 100meq/Kg

Este método ha sido elegido por su simplicidad, rapidez y buena reproducibilidad. Sin embargo debemos hacer constar, que no se puede correlacionar exactamente con la

conservación natural; cosa lógica, puesto que las condiciones de almacenamiento de los productos grasos pueden variar ampliamente. Solamente fijando las condiciones del ensayo pueden, como hizo Thompson (75), encontrarse correlaciones aceptables, que, aún así, varían dentro de amplios límites.

2.2.9. Determinación de trazas metálicas.-

La determinación cuantitativa de los metales pesados, presentes en los aceites, se ha realizado siguiendo el método descrito por A. Vioque y cols. (76) (77). Los aceites se mineralizan, por vía seca, en presencia de nitrato magnésico. La disolución clorhídrica de las cenizas, es sometida a una extracción múltiple con diversos reactivos orgánicos, para separar los metales pesados de los alcalinos y alcalinotérreos, que interfieren, siendo posteriormente destruidos los complejos orgánicos formados, por calcinación y disueltos, tras ataque con agua regia, nuevamente con ácido clorhídrico. La disolución clorhídrica final, concentrada, es llevada a un espectrógrafo de prisma de cuarzo, con excitación por chispa, utilizando berilio como patrón interno. Se utiliza en los cálculos posteriores la transformación "Lambda" de Candler.

2.2.10. Pruebas organolépticas.-

Anteriormente ya hemos hablado de la necesidad de estas pruebas, para el estudio de las variaciones del "flavor", dada las características aromáticas genuinas del

aceite de oliva.

Es cierto, que el degustador experto ejerce una misión muy digna de tener en consideración, en la industria del aceite de oliva. Sin embargo, la dificultad de dar una expresión adecuada a sus percepciones, la imposibilidad de reconocer sus errores y la apreciación puramente subjetiva, que se deduce de su forma habitual de trabajo, hacen a sus resultados poco utilizables, como criterios capaces de poder satisfacer diversos puntos de vista científicos y técnicos.

Estas consideraciones nos han animado a aplicar las nuevas técnicas de ensayo organoléptico, a los problemas de evolución del "flavor", en las muestras de los aceites de oliva empleados en el ensayo.

Para ello, hemos comparado las distintas muestras, con el patrón almacenado en el frigorífico. El "panel" utilizado estaba compuesto por 8 o más catadores, que es, según Kramer y Twigg (78), particularmente útil para el estudio de diferencias-preferencias.

Para realizar estos ensayos, olfativos-gustativos, se entregaron, a cada catador, 10 cc de aceite colocados en copas de vidrio. Las copas se presentaban cubiertas con un vidrio de reloj y marcadas en clave, compuesta por un par de

números o números y letras, conocidas sólo por el organizador del "panel".

Los catadores trabajan por separado en una habitación especialmente diseñada para ésto, acondicionada a unos 23°C.

Como en cada sesión se dió una vez cada muestra, y hubo dos sesiones para cada desmuestra, se obtuvo un duplicado por catador, muestra y desmuestra.

La técnica seguida, las hojas de puntuación utilizadas, etc., fueron iguales a las utilizadas por Mahoney (79).

En la figura E se da una hoja de puntuación con la que trabajan los catadores, y en la figura F, el estandillo donde se recogen los datos para su posterior cálculo estadístico.

El análisis estadístico de los datos, nos permite calcular la probabilidad de que las diferencias encontradas entre las muestras, de los distintos tratamientos, sean debidas al azar.

El método de análisis estadístico utilizado, fue el de análisis de la varianza abreviado, debido a Tukey(80) y basado en los intervalos de variación, tal y como lo utiliza Mahoney (79).

EVALUACION DE LAS DIFERENCIAS DE SABOR

Objeto de la prueba _____ Fecha _____

Replicado _____

INSTRUCCIONES

- 1.- Colocar a la cabeza de cada columna la clave de la muestra que se ensaya.
- 2.- Determina UN el grado de diferencia que aprecia entre la muestra que encabeza la columna y la muestra de referencia (control).
 - a) SI UD NO DETECTA NINGUNA DIFERENCIA EN EL OLOR de la muestra correspondiente, marque una (X) en el casillero de la línea NINGUNA.
 - b) SI A SU JUICIO SE PARECIA ALGUNA DIFERENCIA EN EL OLOR utilice los casilleros correspondientes a los distintos calificativos haciendo una (x) justamente en el que corresponde a la intensidad de la diferencia que Ud aprecia.

NOTA.- La muestra de referencia (Control) debe ser olida tantas veces como sea necesaria para determinar el grado de diferencia que las separa de cada muestra.

Diferencia en el flavor _____

	1	2	3	4	5	6	7
NINGUNA	<input type="checkbox"/>						
LIGERA	<input type="checkbox"/>						
MODERADA	<input type="checkbox"/>						
GRANDE	<input type="checkbox"/>						
EXTREMA	<input type="checkbox"/>						

Firma del catador _____

Figura E

HOJA DE RECOPIACION DE DATOS

DETERMINACION N° _____ FECHA=_____

EXPERIENCIA DE _____

Tratamiento	Replicados	Catador n°													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	1														
	2														
	3														
	4														
	Suma														
	Interv														
	1														
	2														
	3														
	4														
	Suma														
	Interv														
	1														
	2														
	3														
	4														
	Suma														
	Interv														
Suma de interv															
Interv de suma															
Sig. 95% P															
Sig. 95% F-															

Figura F

Otros utensilios y medios de trabajo, las técnicas generales, y las condiciones adecuadas para realizar los ensayos, son ampliamente descritas en la bibliografía (78) (81) (82) (83) (84).

2.2.11. Estudio de los aromas.-

2.2.11.1. Dificultades de este estudio.-

En la mayoría de las sustancias naturales los componentes que constituyen el aroma, son una parte muy pequeña del producto alimenticio total, y suelen encontrarse a concentraciones de partes por millón o a-ún menores. Otros factores que dificultan extraordinariamente esta investigación, pueden clasificarse como sigue:

a) Las sustancias que contribuyen al aroma forman una extensa gama de clases de componentes orgánicos, existiendo una gran variedad de compuestos químicos de la misma clase, que son derivados producidos por la naturaleza, por procesos bioquímicos, o que se producen naturalmente durante los tratamientos, o en el proceso de obtención de los alimentos.

b) Los compuestos aromáticos, suelen extenderse en un largo intervalo de puntos de ebullición, de forma que el aromagrama de su flavor no es nunca simple.

c) En muchos casos existen componentes lábiles, cuya separación del sustrato los transforma, originando

alteraciones en su composición.

d) El carácter polar de numerosos compuestos da origen a su absorción por las superficies (muy grandes en relación a las cantidades de estos compuestos) de las trampas, jeringas de inyección, inyector, etc. de los accesorios empleados en la cromatografía gaseosa.

e) Es difícil eliminar la contaminación, que se produce en el material utilizado, de unas muestras a otras.

f) La presencia de notables cantidades de sustancias sin olor, crea importantes problemas, principalmente el agua, que suele encontrarse a concentraciones de varias decenas de veces superior al conjunto de los restantes volátiles, responsables del aroma.

g) La contaminación atmosférica puede introducir componentes extraños, detectables a las bajas atenuaciones a que se suele trabajar con el cromatógrafo en las investigaciones de aromas.

2.2.11.2. Técnicas utilizadas para la recogida de componentes aromáticos de alimentos.-

La preparación de las muestras es un aspecto costoso de la investigación del flavor. El análisis de los artefactos producidos por la oxidación, que eventualmente pueden formarse durante el proceso preparativo de las mues-

tras (concentrados o no), la acción enzimática, el calor, las interacciones químicas o físicas, al intentar extraer, absorber o concentrar, y en general manipular las muestras, limita el valor de la información obtenida, utilizándose con frecuencia el análisis organoléptico, para estudiar los cambios sufridos por la muestra aromática, desde su separación del material alimenticio.

Es obvio, que el flavor de los alimentos frescos, debe ser desmuestreado con mayor precaución que las muestras de aquellos otros que previamente han sido cocidos, fritos o tostados.

Un gran número de procedimientos han sido empleados para obtener fracciones o concentrados, para su posterior evaluación por análisis cromatográfico. La extracción por vacío y la destilación con vapor son actualmente menos usadas que en el pasado (85) (86) (87) (88), la utilización de evaporadores de "tipo flash", ha sido encontrada útil cuando se trata de materiales tales como jugos o purés diluidos (89). Programando la temperatura de calentamiento, se pueden obtener varias fracciones de destilado, algo menos complejas en su composición, lo que facilita la evaluación y análisis posterior. También puede hacerse la concentración en "trampas", sometidas a diferentes temperaturas de enfriamiento, tal como Chang (90) el cual estudia los

compuestos clorosos del aceite de soja revertido.

Otros autores, arrastran con vapor de agua, y recogen las sustancias volátiles, utilizando una serie de trampas enfriadas a diversas temperaturas, extrayendo por último las sustancias orgánicas, condensadas junto al agua, con un disolvente apropiado, que puede ser éter según Chang (90), sulfuro de carbono, como utilizan Wilkens y Lin (91), o como hacen, en el caso de las frutas, R. Barrera y cols. metil-p-cresol, 2-2 dicloroetil éter o dietilftalato (92).

En general, el sistema de extracción de aromas utilizando disolventes (93,98), aplicado especialmente a las grasas por Wong (99), utilice o no el arrastre previo por vapor o gas inerte, tiene el inconveniente de que junto a la impurificación producida por los artefactos que acompañan a los disolventes, se hace necesario, en la inmensa mayoría de los casos, la eliminación total o parcial del mismo, con el consiguiente riesgo de descomposición y pérdida de los componentes volátiles del aroma. Cuando además se ha utilizado un arrastre previo por vapor o nitrógeno, para el concentrado de la muestra, en presencia o no de agua, se pueden producir productos de descomposición o hidrólisis. Al objeto de salvar estos inconvenientes las técnicas de Schogt (100), Lea y Swoboda (101) y Salke (102), preconizan la utilización de bajas temperaturas y alto vacío, conden-

sando los aromas en trampas de diseño especial, de las cuales los compuestos volátiles pueden ser transferidos a capilares soldados a las mismas, que son, en el momento necesario, rotos dentro del inyector del cromatógrafo. Un sistema que requiere también atención es el debido a Nawar y Fagueson (103), el cual utiliza N_2 y una bomba de recirculación del mismo, a través de la muestra y el sistema. La condensación se hace en vial, provisto de un tapón de goma, de forma que la muestra puede tomarse, con la jeringa cromatográfica, para ser inyectada con gran facilidad. Este sistema, según Prevot (50), es recomendable.

En algunos casos, previa a la inyección cromatográfica, se puede hacer un fraccionamiento en columna, al objeto de facilitar la separación por C.G.L., Strachi (104), para separar el aroma de los alimentos, utiliza un paso previo sobre columna de sílice, modificada con Carbowax 20 M., eluyendo con pentano-cloruro de metilo y separa dos miscelas, que luego inyecta en el cromatógrafo de gas.

Otro camino más reciente de concentración de aroma, consiste en el paso de volátiles arrastrados por gases inertes a través de un material absorbente e inactivo, el cual puede a su vez, ser enfriado para facilitar la concentración sobre el mismo de los productos volátiles. Este material inerte, conteniendo los volátiles, se introduce en

precolumna en el cromatógrafo y una vez volatilizado su contenido, se procede a su cromatografía. En líneas generales, este es el método empleado por Jennings para el estudio de bebidas alcohólicas (105). Este autor utiliza un tubo relleno con Porapak. Morgan (106) y Gottanf (107) pasan una lenta corriente del aroma a través de una corta precolumna, rellena con el mismo soporte que utilizan en fase estacionaria, enfriando a 80°C bajo cero. Una vez completada su carga, la precolumna es unida a la columna cromatográfica y posteriormente calentada a 100°C y ajustado el correspondiente flujo de gas.

Finalmente, uno de los métodos más usados actualmente consiste en la cromatografía de los espacios de cabeza, cuyo aromagrama puede proporcionar un "perfil gráfico" de la composición de los volátiles, que realmente evalúa el "Panel".

Al parecer, en algunos alimentos, existe una buena concordancia entre las puntuaciones del flavor, dadas por el panel y el incremento en determinados componentes. Tal es el caso de la determinación oxidativa de las patatas, cuya puntuación organoléptica se correlaciona bien con la concentración de n-hexanal como componente principal (108), Kepner (109) ha publicado también algunos estudios sobre la técnica del espacio de cabeza. Bernar y cols. (110) han

realizado una serie de trabajos con esta técnica, que aplica la clasificación de diferentes variedades de *genus allium*, en relación a sus compuestos sulfonados.

Otro interesante trabajo en el que se emplea esta técnica, de espacio de cabeza, se debe a Weurman (111), en él se recoge, además, una amplia bibliografía sobre este tema.

Finalmente podemos citar aún, dos técnicas, la inyección directa en la cabeza de columna, o en precolumna, del material bruto que ha sido aplicada concretamente al aceite por Prevot (112), y la utilización, como trampas, de agujas hipodérmicas o de capilares, cuyo mayor inconveniente reside en la rápida obstrucción de estos, en presencia de pequeñas cantidades de agua, que se congela fácilmente y obturan el paso de volátiles, dando lugar a cromatogramas muy pobres.

2.2.11.2.1. Técnicas ensayadas.-

Antes de tomar una decisión sobre la mejor técnica, para estudiar los componentes volátiles del aroma del aceite de oliva, decidimos ensayar aquellas que nos parecían más de acuerdo con nuestras posibilidades y a su vez más prometedoras.

En primer lugar se ensayó la técnica de espacio de cabeza, tomando de matraces llenos de aceite, provistos de cierres de gomas, muestras del aroma de los espacios de cabeza. Los erlemmeyers fueron calentados a distintas temperaturas, que oscilaron entre 40 y 100°C, antes de tomar la muestra, pinchando el tapón de goma con una jeringa Hamilton de gases, (cuidadosamente limpia y purgada con nitrógeno). Con esta técnica los aromagramas eran poco reproducibles y muy pobres. Se intentó aumentar el contenido en volátiles del espacio de cabeza, por inmersión del Erlemmeyer en nieve carbónica, haciendo vacío en el espacio de cabeza cuando el aceite se había congelado. Sacado el aceite de la nieve carbónica se dejaba a la temperatura ambiente, con lo cual el vacío del espacio de cabeza facilitaba un fuerte desprendimiento de gases en el aceite. Cuando este cesaba, se tomaba la muestra con la jeringa y se inyectaba en el cromatógrafo. Los resultados, aunque algo mejores seguían originando aromagramas poco abundantes y no reproducibles, puesto que la mayor parte de los gases desprendidos, parecían ser aire y agua.

Ante la deficiencia de los resultados, se construyeron algunas trampas según el diseño de De Brugh y Schogt (100) y se intentó seguir la técnica de estos investigadores, sin llegar a vacíos tan elevados. Con esta técnica se presentaban dos dificultades, en primer lugar la gran

cantidad de agua en relación a los volátiles, que obturaba la trampa, al formar en ellas tapones de hielo y la necesidad de un dispositivo, adecuadamente construido, y adaptado al cromatógrafo, para la rotura de los capilares que contenían el aroma. Por otra parte, las trampas eran muy caras y la rotura de los capilares las inutilizan.

La tercera técnica ensayada fue la absorción sobre carbón activo, colocado en una precolumna que se sometía a carga, arrastrando los volátiles con N_2 y recogiendo los sobre el relleno de carbón. Acoplada a la columna, se sometía a calefacción para desgasificarla y se introducía la muestra desabsorbida en la columna. Los cromatogramas obtenidos eran abundantes, pero las muestras desgasificadas oían a aceite rancio y los cromatogramas estaban constituidos, principalmente, por los aldehídos típicos responsables de olor a rancio.

Arrastrando los volátiles del aceite con nitrógeno y haciendo borbotear el gas sobre distintos disolventes, se obtuvieron también pobres resultados.

2.2.11.2.2. Técnica adoptada.-

La técnica más idónea entre las ensayadas es la que a continuación pasamos a describir.

Una jeringa de inyección fue adaptada a un recipiente metálico, de forma que su punta y parte superior, quedaban fuera de él. El recipiente era cargado con nieve carbónica y acetona, y una vez la jeringa bien fría, se conectaba su punta a un tubito de teflón por el que se conducía N_2 que previamente se había hecho borbotear por la muestra de aceite a estudiar, calentada a $60^{\circ}C$ en un baño de agua. A la parte posterior de la jeringa, se le adaptaban un cierre de celofán, perforado con una aguja en dos o tres pequeños orificios, para permitir la salida de N_2 portador.

El flujo de N_2 se regulaba a 40 ml/min. manteniendo este flujo durante 40 minutos.

Cuando se daba esta operación por terminada, sin quitar la mezcla frigorífica, se sustituía el tubo de teflón por un corto trocito de tubo de goma latex, cuya punta se tapaba con una varilla de vidrio maciza. Se separaba el cierre de celofán y se introducía el émbolo en la jeringa aproximadamente 1 cm, quedando así aquella completamente cerrada por ambos extremos.

Hecha las operaciones descritas anteriormente, se pinchaba el tubito de goma que cerraba la punta, con la aguja de una jeringa Hamilton, para gases, de 5 cc. y solo entonces se procedía a separar la mezcla frigorífica del recipiente exterior de la "jeringa-trampa", sustituyéndola

por agua caliente a 80°C, dejándola durante dos minutos, al objeto de que los volátiles condensados se gasifiquen y puedan ser transferidos a la jeringa Hamilton. Debe tenerse en cuenta que la dilatación gaseosa puede expulsar el émbolo de la "jeringa-trampa", por lo cual este debe ser retenido firmemente o bloqueado con algún dispositivo para cortar su retroceso.

Presionando el émbolo de la primera jeringa y succionando con la Hamilton, se puede recoger en ésta la cantidad de muestra que se desea inyectar en el cromatógrafo.

2.2.11.3. Cromatografía de los aromas.-

El fraccionamiento de los compuestos volátiles del flavor, es usualmente utilizado para obtener información química, que puede explicar o justificar, las apreciaciones organolépticas humanas sobre el flavor de un alimento.

La cromatografía gaseosa ha sido, desde sus principios, la técnica más idónea que pueda aplicarse a estos estudios. Con el desarrollo de las técnicas y aparatos la cromatografía gaseosa ha ampliado, poco a poco, su campo de aplicación (113-116), mejorando en poder de resolución y sensibilidad.

Existe una gran diversidad de tipos de cromatógrafos, columnas y técnicas de trabajos. En relación al tipo de soporte y relleno Prevot (50) utiliza columnas de 3 m. rellenas de Chromosorb P de

80-100 mallas tratadas con hexametildicilazano y como fase líquida utiliza Carbowax 20 M, que da una separación neta en el análisis de aldehidos. Para separar los productos polares utiliza otra columna, de igual soporte, cuya fase líquida es Apiezon L de 10%, ya que el Carbowax 20 M retiene los productos polares demasiado fuertemente (tal es el caso de los aldehidos insaturados). Fedeli y Jacini (117) utilizan el mismo soporte, alargan la columna a 4 m. y suben la concentración de Carbowax 20 M al 15%.

Naoki Iwata (49) utiliza como soporte Diasolid S (100-180 mallas) y como fase líquida dioctilselazato al 5% para estudiar los componentes de los aceites rancios. Jennings (105) utiliza Apiezon L al 1% sobre un soporte de Chromosorb W de 80-100 mallas, para estudiar el aroma de la leche.

Scholz (118) emplea una columna de 3 m rellena con Carbowax 20 M sobre cromosorb P.

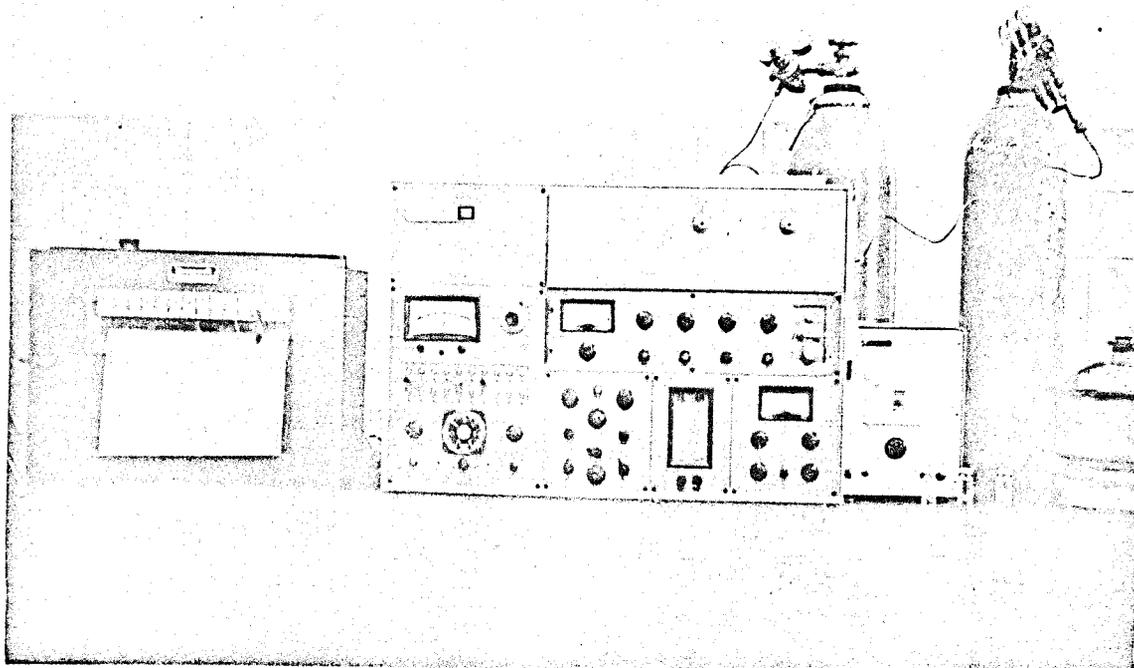
En relación a las condiciones cromatográficas, aunque algunos autores utilizan cromatografía a temperatura constante, es evidente que las sustancias volátiles, constituyentes de aromas complejos, pueden extenderse en una amplia variedad de tiempos de retención, desde sustancias muy volátiles a pesadas, por lo que parece conveniente el empleo de temperaturas programadas.

2.2.11.3.1. Técnica cromatográfica adoptada.-

Hemos ensayado columnas de diferente longitud, rellena de Cromosorb P y W como soporte, sobre el que se han depositado como fase líquida, Apiezon L, Carbowax 20 M a varias concentraciones, y finalmente, Castorwax.

Este último relleno parecía el más prometedor, por ello y después de algunos ensayos, se encontró que una columna de acero inoxidable de 5m y 1/8" de diámetro, rellena de Castorwax de 12% sobre Cromosorb W, era la más eficaz para nuestro trabajo. El cromatógrafo utilizado fué un Aerograph modelo 1.520, provisto de detector de llama y temperatura programada. La temperatura del horno fué inicialmente de 80°C, programándose a 4°/minuto a partir del 3^{er} minuto después de efectuada la inyección.

Puesto que la concentración de los distintos compuestos responsables del aroma, contenido en las muestras era muy diferente, fué necesario variar la atenuación del detector para algunos picos, por lo que era fácil comparar la proporcionalidad de las concentraciones de los compuestos eluidos, por simple observación de las áreas o alturas de sus picos sobre el cromatograma, haciéndose necesario unificarlas por medida sobre el aromagrama, por las atenuaciones correspondientes.



Cromatógrafo Modelo "Aerograf" 1.500, provisto de detector de llama y programación matriz de temperatura, en el que se realizó el estudio cromatográfico de este trabajo.

3. RESULTADOS Y
DISCUSION

Para facilitar el estudio de los resultados, hemos recurrido a representaciones gráficas para su mejor interpretación. Puesto que se trata de tres tipos de aceites, que han sido envasados en recipientes de diferentes materiales, de los cuales una muestra se ha conservado a la luz, otra en la oscuridad, y otra en condiciones mixtas, hemos considerado que la mejor forma de estudiar la marcha de las distintas pruebas químicas, es agruparlas en relación al aceite de que se trate, y a las condiciones de almacenamiento. Según esto, vamos a considerar los siguientes grupos de gráficos:

- Grupo A.- Representa la evolución del índice de peróxidos (I.P.)
- " B.- Representa la evolución de los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 232 nm.
- " C.- Representa la evolución de los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 270 nm.
- " D.- Representa la evolución de los valores dados por la prueba de Kreis.
- " E.- Representa la evolución del color de los aceites.
- " F.- Representa la evolución del contenido en tocoferoles y materias reductoras.
- " G.- Representa la evolución de la estabilidad A.O.M.

Tabla I.- Estudio de las determinaciones de trazas metálicas.

Grupo H.- Representa los resultados de las pruebas organolépticas.

Finalmente se hace un estudio de las correlaciones entre los ensayos organolépticos y los aromagramas.

3.1. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DEL INDICE
DE PEROXIDOS (gráficos del grupo A)

En este grupo se recoge la marcha del I.P., durante el almacenamiento, de los aceites virgen I, virgen II y rivierra (número 1 al 9). Los gráficos nº 1,2 y 3 corresponden a las muestras de los aceites conservados en la oscuridad y los nº 4,5 y 6 a los de las muestras expuestas a la luz. Los números 7,8 y 9 corresponden al estudio de las muestras de los aceites envasados en polietileno que primeramente se conservaron en la oscuridad y luego pasaron a la luz.

De la observación simultánea de los seis primeros gráficos, podemos deducir fácilmente, que el aceite envasado en polietileno, presenta un comportamiento distinto al conservado en los demás envases estudiados. Así pues, hemos separado el estudio de los resultados de estas muestras, de las restantes, con el objeto de simplificar la exposición.

a) Estudio de la marcha del I.P. en las muestras envasadas en polietileno.

El aceite en el que se produce un aumento más rápido y mayor del I.P. es el envasado en polietileno. Esto ocurre tanto para las muestras conservadas en oscuridad, como en la luz. Los valores máximos alcanzados al final de los ensayos son:

	<u>LUZ</u>	<u>OSCURIDAD</u>
Aceite virgen I	97 meq/Kg	28 meq/Kg
Aceite virgen II	101 meq/Kg	35 meq/Kg
Aceite riviera	95 meq/Kg	25 meq/Kg

Estos valores no pueden ser explicados a partir de los peróxidos formables con el oxígeno disuelto y el contenido en los espacios de cabeza. Consiguientemente, la única explicación posible, hay que buscarla en la permeabilidad del oxígeno a través del polímero del envase. El inicio de la formación de los peróxidos, se produce probablemente en contacto con la misma pared del envase, particularmente en las moléculas de aceite interpuestas en la red de la resina termoplástica.

Estos peróxidos formados junto a la pared o dentro de ella misma (exudación), emigran al interior de la masa del aceite, catalizando extraordinariamente la reacción de oxidación del mismo y permitiendo alcanzar valores tan elevados, que nos obligan a considerar a este envase, en este sentido, muy significativamente distinto a los demás que estamos estudiando.

Desde un punto de vista cuantitativo y teniendo en consideración las recomendaciones del C.O.I. (Consejo Oleícola Internacional) de que los aceites de oliva envasados no tengan un I.P. superior a 20 meq/Kg de oxígeno

peroxídico, es evidente que las únicas muestras que pueden correr el riesgo de sobrepasar el límite, son las envasadas en polietileno, sobre todo las expuestas a la luz.

Para aceites de tipo medio, como los que cuidadosamente hemos escogido, y cuyo contenido peroxídico inicial podemos considerar como representativo de los aceites existentes en el mercado, el tiempo que ha de transcurrir para sobrepasar el I.P. = 20 meq/Kg, cuando se envasa en polietileno, se recoge a continuación:

Tiempo aproximado en días para pasar el I.P. = 20 meq/Kg

	Oscuridad	Luz (iluminación 24 horas continuadas por día)
Virgen I	140	10
Virgen II	120	9
Riviera	190	20

De la observación de esta tabla, es fácil deducir que si bien en la oscuridad (envases conservados dentro de cajas de cartón), el I.P. puede mantenerse por debajo del límite establecido durante un período aproximado de 4 meses, cuando se exponen a una iluminación normal en supermercados y tiendas, la acción de esta luz cataliza la oxidación, hasta el punto de sobrepasar los 20 meq/Kg

en unos pocos días.

Como es lógico la mayor o menor capacidad de conservación de un aceite será más o menos variable, dependiendo de factores tales como: el I.P. inicial del aceite, estabilidad, condiciones de almacenamiento (luz, temperatura) etc.

b) Estudio de la marcha del I.P. en las muestras envasadas en hojalata, vidrio, PVC I y PVC II.

En el comportamiento de los aceites almacenados en los envases reseñados, es interesante destacar que el I.P. aumenta solamente (durante algo más del primer mes) unos 3 meq/Kg de oxígeno peroxídico.

Esta subida es plenamente lógica, si pensamos que el aumento del I.P., se corresponde con bastante exactitud con el volumen del oxígeno disponible, a saber, el del aire contenido en el "espacio de cabeza" de estos envases, más el oxígeno que naturalmente lleva disuelto el aceite.

Tratándose de envases, impermeables al aire, como los de vidrio y hojalata o prácticamente impermeables como los de cloruro de polivinilo (PVC I Y PVC II) es lógico este comportamiento general, puesto que el espacio de cabeza de todos los envases y la relación aire/aceite, se dispuso, premeditadamente, de forma que fuese exactamente la misma en todos ellos.

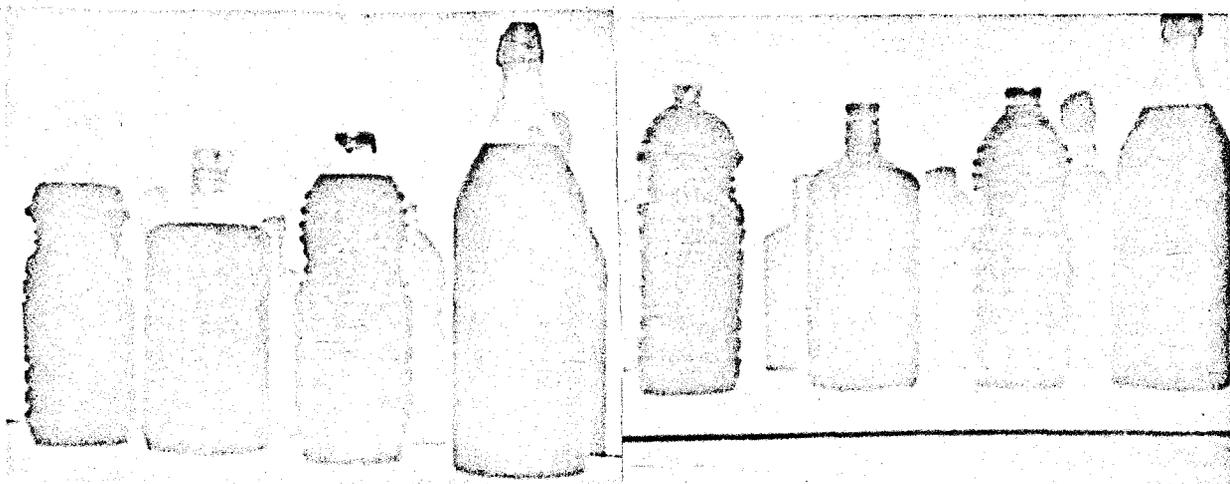
Alcanzado el máximo ya indicado en el párrafo anterior, se produce un descenso del contenido peroxidico, perfectamente apreciable en las determinaciones correspondientes a los sucesivos desmuestres. Este descenso es muy conveniente estudiarlo a pesar de que por su cuantía, podría parecer, a primera vista, no digno de consideración. La causa que lo origina es la descomposición de los peróxidos previamente formados, que da lugar a otros productos de degradación. Pero dado que estos productos son considerados precisamente como los posibles responsables de las alteraciones aromáticas, su influencia sobre los caracteres organolépticos podemos considerarla decisiva.

Estudiando detenidamente esta destrucción de peróxidos de las muestras conservadas en los envases impermeables, en este grupo de seis gráficos, podemos observar que de menos a más el orden de "degradación" de los peróxidos es el siguiente: muestra patrón, aceites envasados en PVC y vidrio. Cuando entre las muestras a estudiar se incluye el aceite envasado en hojalata, esta se sitúa inmediatamente pareada con el patrón.

Este orden no parece establecido por puro azar, pues existen algunas explicaciones muy razonables para ello. Siendo la degradación de los peróxidos una reacción secundaria favorecida por: a) temperatura b) luz y c) vacío, es lógico pensar que tanto más favorecidas serán las reacciones

de degradación, cuanto mayor sea el efecto de estos tres factores en conjunción, sobre el contenido peroxídico. Así pues: en el caso del "patrón" (frigorífico, oscuridad), la degradación es muy poco apreciable, ya que los dos principales factores, temperatura y luz, están prácticamente inhibidos. Sigue inmediatamente la muestra envasada en hojalata, en los ensayos en que ésta se ha incluido; en su caso, no se ha eliminado el efecto de la temperatura, aunque sí los de la luz, al ser este envase opaco a ella. En tercer lugar encontramos las envasadas en PVC, sobre las que ha actuado la temperatura y la luz, sobre todo en el caso de las muestras conservadas en la cámara iluminada, aunque y quizás también en las muestras almacenadas en la oscuridad, haya podido filtrarse alguna luz en pequeñas proporciones, principalmente durante las operaciones de desmuestra, etc. Finalmente y donde el proceso de degradación aparece más intenso, es en las muestras envasadas en vidrio, que están sometidas a la temperatura y a la luz. Pero, ¿como es posible que teniendo el vidrio y los PVC curvas de transmisión, (tanto en el ultravioleta como en el visible) muy próximas, (gráficos B) los peróxidos se descompongan apreciablemente más en las muestras envasadas en vidrio? Para darle a este fenómeno la explicación adecuada, hemos de hacer la observación de que durante la primera etapa de la oxidación, ha de producirse naturalmente un

vacío en el espacio de cabeza de los envases. Este vacío es originado, en parte, por la fijación del oxígeno al carbono inmediato al doble enlace, para formar los correspondientes hidroperóxidos y también por simples procesos de disolución en el aceite del nitrógeno y demás gases atmosféricos. Esta absorción de oxígeno y otros gases, está más que probada y es uno de los métodos de determinación del grado de oxidación, Warburg (119) y Barcroft (120). Ahora bien, según Lundberg (121), los procesos de degradación de los peróxidos son favorecidos por el vacío, entonces es posible suponer que en los envases rígidos (tal como ocurre con el vidrio), este vacío producido en el espacio de cabeza, favorecerá más la destrucción de los peróxidos que en los otros envases, ya que al ser algo deformables estos últimos, permiten la subida del aceite por el cuello del envase a costa de la deformación del mismo. Este fenómeno puede apreciarse fácilmente en la fotografía que se adjunta realizada al final del ensayo, en la cual se aprecia claramente como el aceite ha ocupado todo el espacio de cabeza, en los envases de resinas termomoldeables, llegando incluso a deformarlos.



En la fotografía de la izquierda aparecen las botellas al iniciar el ensayo, Como se puede apreciar, todas tienen su correspondiente espacio de cabeza, que al final del ensayo, (fotografía de la derecha), ha desaparecido en las muestras envasadas en plástico.

De acuerdo con estas consideraciones, al final del período de conservación, el descenso más pronunciado del I.P. corresponderá a la muestra del envase más rígido, es decir al vidrio, como vemos que ocurre.

Esta destrucción de peróxidos y su transformación en productos de degradación, quedará confirmada por un aumento del contenido de estos productos, cuya extinción es medible a 270 nm y que comprobaremos, cuando hagamos el estudio correspondiente.

La formación de estos compuestos de degradación (aldehidos, cetonas, etc.) es muy interesante, ya que puede explicar importantes conclusiones, relacionadas con la evolución de las características organolépticas, desarrolla-

das en los aceites envasados en los recipientes estudiados.

c) Estudio del almacenamiento a la oscuridad-luz.

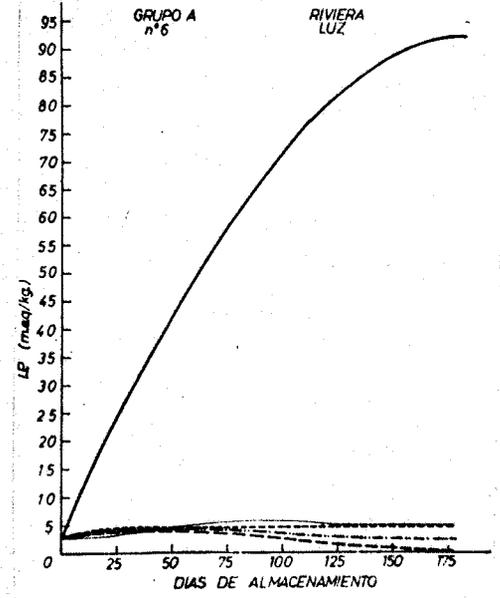
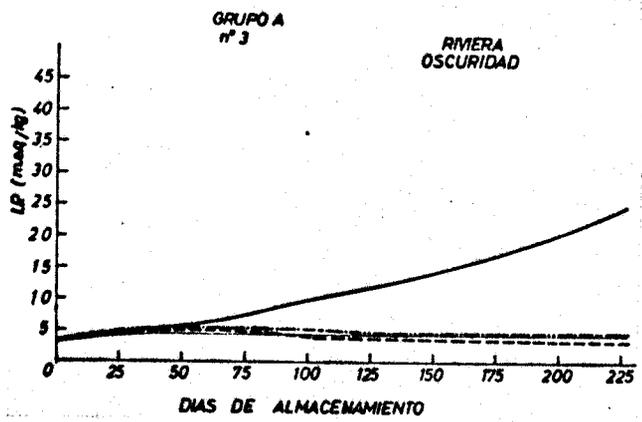
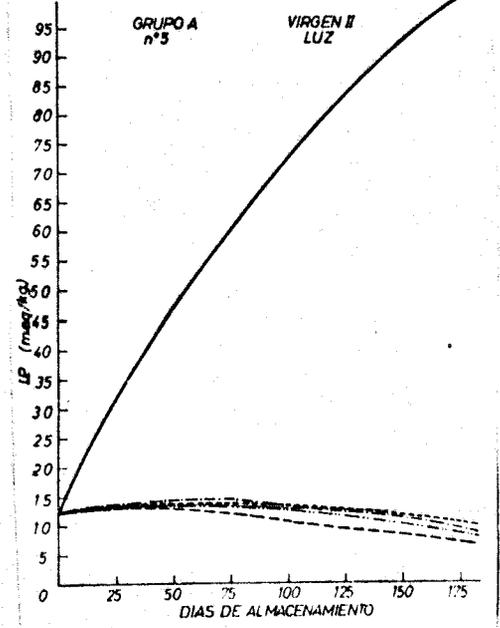
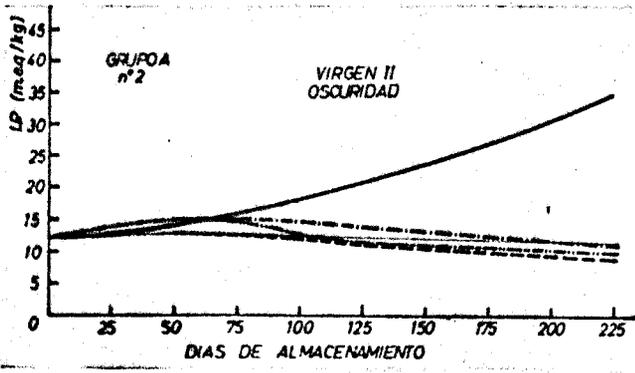
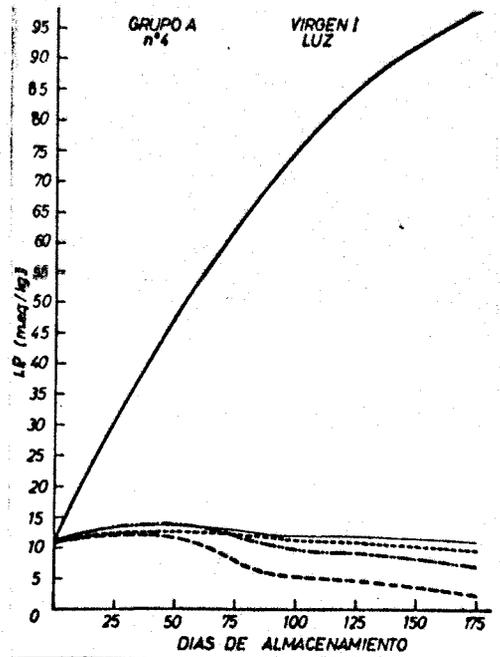
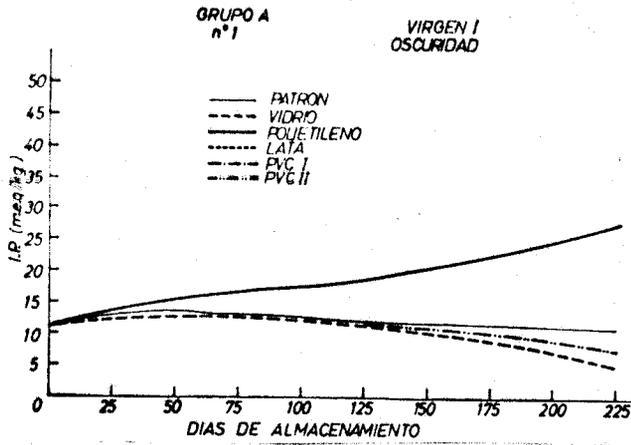
En el grupo de gráficos números 7,8 y 9 se recoge un estudio particular del desarrollo del contenido peroxídico de muestras almacenadas en condiciones mixtas, es decir, primeramente almacenadas en la oscuridad y luego pasadas a la estantería expuestas a la luz.

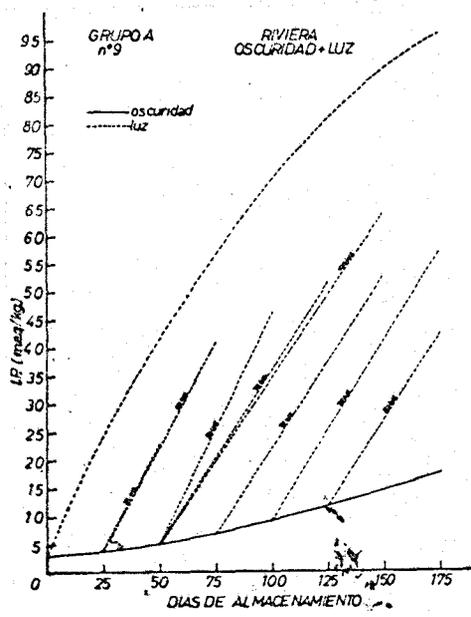
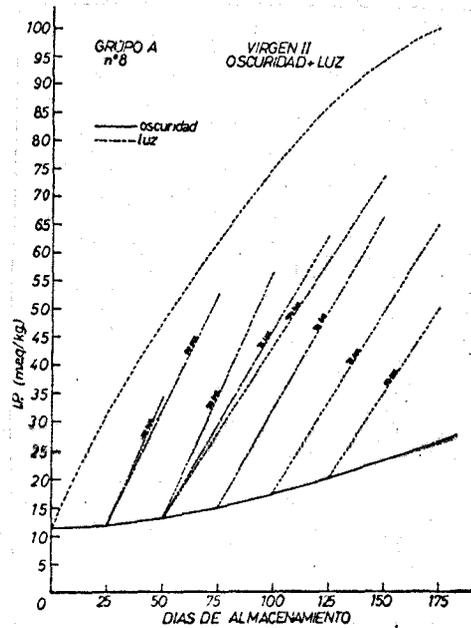
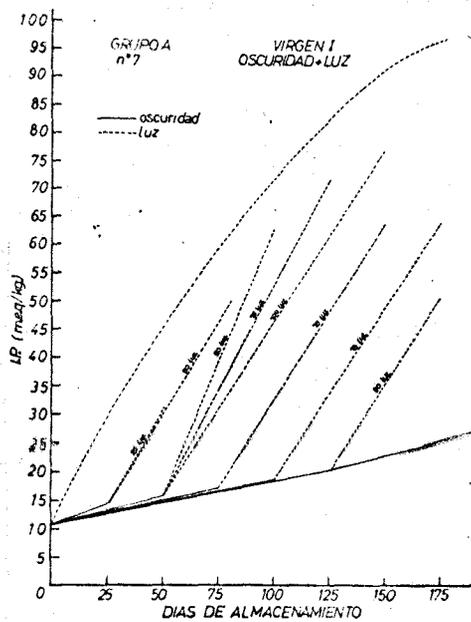
El interés del ensayo, se debe a que durante el período de comercialización, el almacenamiento de los aceites envasados sufren un proceso de este tipo. En primer lugar los envases, cualquiera que sea su material, se someten al almacenamiento dentro de cajas de cartón o madera, de donde son sacados en tiendas y supermercados para su exposición al público.

En este grupo de gráficos (7,8 y 9) hemos estudiado solamente las muestras envasadas en polietileno, por ser las únicas en que aparecían variaciones importantes. Se observa claramente que, para los tres aceites estudiados, la subida del contenido peroxídico se produce lentamente, mientras las muestras se conservan en la oscuridad, pero la velocidad de aumento del I.P. crece, extraordinariamente, tan pronto las muestras pasan a la luz, cualquiera que sea el intervalo que han permanecido en la oscuridad.

Esta comprobación es importante, ya que demuestra la necesidad de recomendar a los almacenistas, que mantengan sus aceites dentro de las cajas de cartón el mayor tiempo posible, tomando además las precauciones necesarias para que los envases una vez expuestos a la luz, sean consumidos en su totalidad lo antes posible. Este punto es de extraordinaria importancia, puesto que el aumento del I.P. a la oscuridad es aproximadamente de 0,045 a 0,050 por día, y a la luz de 0,58 a 0,65; dicho más sencillamente: a la luz, la oxidación progresa 12 o 13 veces más rápidamente que en la oscuridad, al menos en las condiciones de nuestro ensayo.

El paralelismo aproximado de estas subidas, a primera vista, resulta un poco extraño, ya que parece independiente del tiempo que con anterioridad hayan permanecido las muestras en la oscuridad. No obstante, analizando las circunstancias que concurren en este hecho, el fenómeno parece explicarse fácilmente puesto que dada la buena estabilidad de los aceites, cuando las muestras fueron trasladadas a la luz, aún se encontraban dentro del período de inducción, es decir, en el inicio de la oxidación y por ello, la pérdida de antioxidantes durante el almacenamiento en la oscuridad, no es tan importante como para influir en la velocidad de oxidación, que por otro lado está regulada en todas las muestras por la permeabilidad constante del polietileno al oxígeno atmosférico.





3.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS VALORES

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 232 nm (gráficos del grupo B)

En este grupo de gráficos, se recoge la marcha de los valores de extinción específica a 232 nm de las muestras almacenadas en la oscuridad, gráficos nº 1,2 y 3 y a la luz nº 4,5 y 6, envasadas en los recipientes de distintos materiales que se estudian, correspondiendo los gráficos nº 7,8 y 9 a las muestras de aceites envasadas en polietileno, que se han sometido a condiciones de almacenamiento mixto, es decir, que estuvieron primero en la oscuridad y pasaron más tarde a la luz.

La absorción específica a 232 nm en los aceites, se debe a los productos que se forman durante la oxidación primaria, principalmente los hidroperóxidos de los ácidos linoléico y linolénico, cuya configuración diénica conjugada, produce un espectro de absorción de banda, con un máximo a 232 nm.

En nuestro ensayo, la extinción específica a esta longitud de onda, sólo progresa destacadamente en las muestras envasadas en polietileno, tanto para las muestras almacenadas en la oscuridad, como para las expuestas en las estanterías a la luz. Para los aceites envasados en los restantes materiales (hojalata, vidrio y PVC), el aumento que se produce es poco significativo, como consecuencia de las limitadas disponibilidades de oxígeno, debido a la impermeabilidad de los envases.

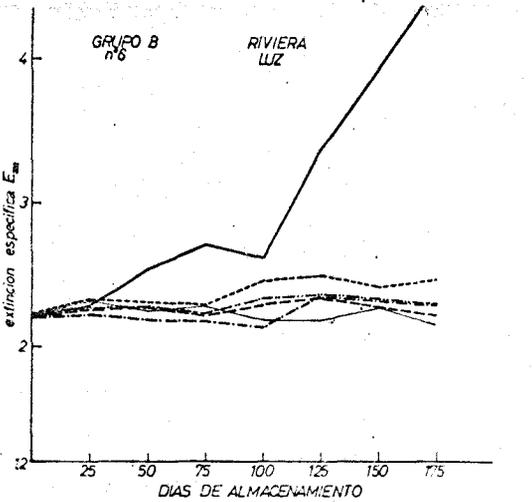
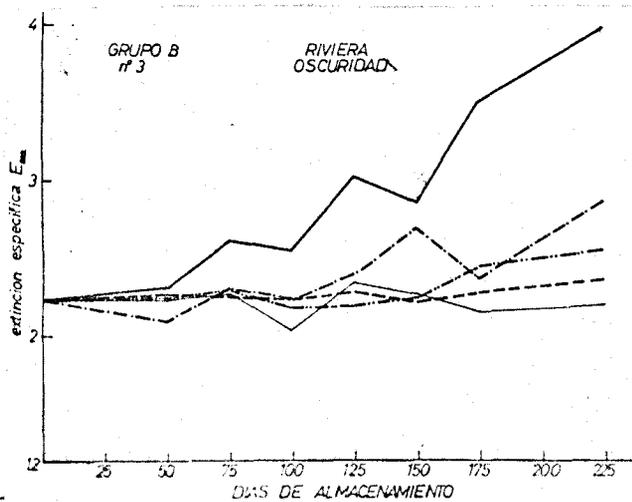
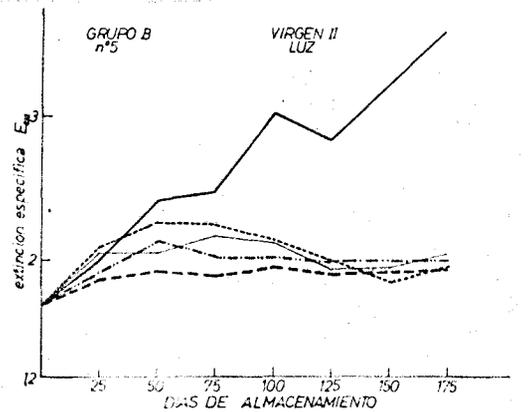
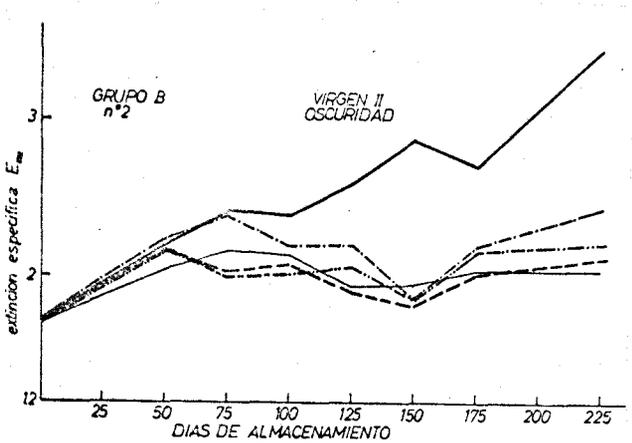
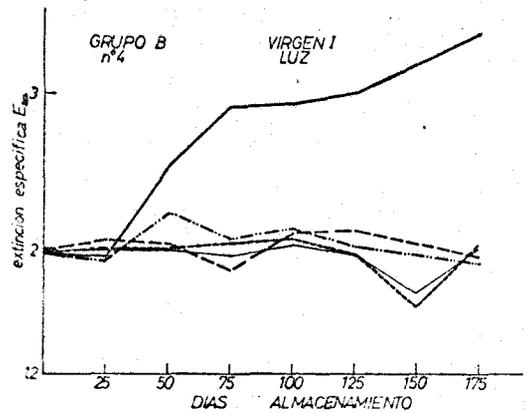
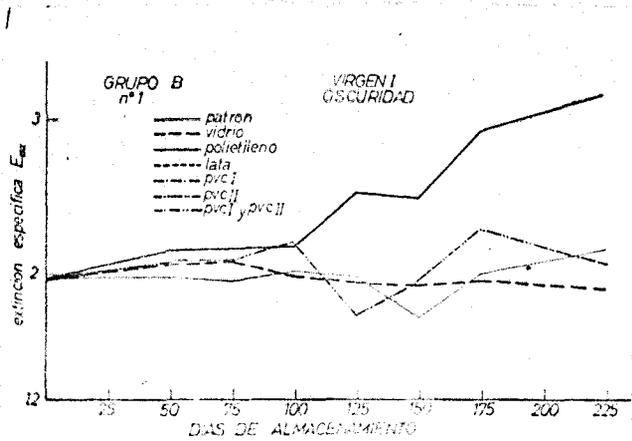
En el proyecto de normas, para los aceites de oliva virgen y refinado y para el aceite de orujo de aceituna, refinado, propuesto por el C.O.I., en lo concerniente a la extinción específica en el ultravioleta se ha fijado un límite, para $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 232 nm, de 3,5. Las muestras de los dos aceites vírgenes envasados en polietileno, que han permanecido expuestos a la luz, alcanzan dicho límite aproximadamente a los seis meses de almacenamiento en las condiciones del ensayo, pero cuando estas muestras se conservan en la oscuridad, se mantienen por debajo del límite, después de transcurrir ocho meses desde que fueron almacenadas.

Para las restantes muestras envasadas en hojalata, vidrio, PVC I y PVC II, conservadas tanto a la luz como en la oscuridad, los valores de la extinción a esta longitud de onda, se mantienen siempre por debajo del límite propuesto.

En cuanto al aceite de oliva tipo rivierra, no existe en la actualidad límite alguno para la extinción específica a 232 nm; pero al igual que ocurría con los aceites vírgenes, las únicas muestras que experimentan un aumento notable, son las envasadas en polietileno, sobre todo aquellas que han permanecido expuestas a la luz. Las restantes muestras mantienen prácticamente su extinción específica inicial.

Como se puede observar, los resultados obtenidos en las muestras para esta determinación, parecen estar en bastante consonancia con los observados al estudiar la marcha del I.P.; hecho lógico, ya que como es sabido, ambas determinaciones están orientadas hacia la determinación de la concentración de productos primarios de la oxidación y como antes comentábamos, en las muestras envasadas en polietileno son en las únicas que ésta progresa, debido a la permeabilidad del material al oxígeno atmosférico.

En los gráficos nº 7, 8 y 9 se recoge la marcha de los valores de extinción específica a 232 nm, para las muestras envasadas en polietileno, puesto que en este envase es en el único en el que ha tenido lugar una variación notable durante el almacenamiento. Estas muestras se almacenaron primeramente en la oscuridad y posteriormente se expusieron a la luz; en dichos gráficos puede observarse claramente como aumentan los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 232nm al pasar las muestras a la exposición de la luz, lo que nos confirma los resultados obtenidos en estas muestras, cuando se les hicieron las determinaciones de peróxidos. No obstante hemos de resaltar el hecho de la falta de paralelismo, en estas subidas, la causa de ello parece encontrarse en la inespecificidad e inestabilidad de los compuestos responsables de la absorción a esta longitud de onda.



3.3. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS
VALORES $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 270 nm (gráficos
del grupo C)

En este grupo de gráficos, se recoge la marcha de los valores de extinción específica a 270 nm de las muestras de los tres aceites, envasadas en los distintos materiales y almacenados a la oscuridad, nº 1, 2 y 3; así como a la luz nº 4, 5 y 6 y los de las muestras sometidas a condiciones mixtas nº 7 al 17.

Las cetonas α -insaturadas, las α -dicetonas, y posiblemente otros productos carbonílicos de naturaleza similar, que se producen por degradación de los hidropéroxidos, poseen un máximo de absorción a 270 nm. Por otra parte, los trienos conjugados, que pueden originarse, durante la descomposición térmica o luminosa de los peróxidos del linoléico, dan lugar a un espectro con una banda triple de absorción a 260-268 y 281 nm.

Por ello, la medida espectrofotométrica a 270 nm en el aceite de oliva, permite seguir la alteración de las sustancias grasas durante su almacenamiento. En efecto, variaciones cuantitativas en las longitudes de onda indicada, corresponden a la aparición de productos de oxidación o a la desaparición por polimerización de compuestos polinsaturados, en el caso de los aceites refinados que los contienen. Sin embargo esta técnica no sirve, por sí sola, para poner en evidencia la diferencia entre los productos de oxidación que quedan en el aceite, que carecen de olor

y sabor, y aquellos que se formen posteriormente durante el almacenamiento, responsables del sabor y olor a rancio típico.

A pesar de todas las dificultades y del insuficiente conocimiento en muchos puntos, los estudios sobre la espectrofotometría en el ultravioleta, a 270 nm, han permitido, mediante la recogida masiva de datos, establecer unos límites para los valores de extinción específica en aceites, a esta longitud de onda.

De acuerdo con estos criterios, el C.O.I. ha propuesto como límite para los aceites vírgenes un $E_{1\text{cm}}^{1\%} 270\text{nm}$, = 0,25.

Teniendo en cuenta este criterio, en los aceites almacenados en la oscuridad, el valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%} 270\text{ nm}$, aunque sube ligeramente, no alcanza en ningún momento los valores límites establecidos, cualesquiera que sean los envases utilizados, ya que al estar las muestras en la oscuridad y sometida a una temperatura moderada, no existe una fuente de energía necesaria para producir la descomposición de los peróxidos, con la consiguiente formación de compuestos que absorben a esta longitud de onda.

Por el contrario, en las muestras de los aceites vírgenes expuestas a la luz (gráficos 4 y 5), envasadas en polietileno, vidrio, PVC I y PVC II, se observan nota-

bles incrementos en los valores de su extinción, que aumentan muy rápidamente al principio (durante los 50 primeros días de exposición a la luz) y posteriormente tienden a decrecer paulatinamente. Este hecho es muy visible, particularmente en las muestras conservadas en vidrio, PVC I y PVC II que son los materiales más impermeables al aire. En el caso de las muestras envasadas en polietileno, el descenso en la velocidad de formación de estos compuestos, aunque menos notables, también puede observarse claramente.

Los productos de degradación responsables del aumento de los valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 270, provienen con toda seguridad de los peróxidos formados y de los restantes productos que absorben a 232 nm; en los aceites envasados en polietileno, pueden proceder de la descomposición de ambos tipos de compuestos, ya que continuamente siguen formándose peróxidos y pueden dar una notable cantidad de cromógenos a 270 nm.

En cuanto a las muestras envasadas en vidrio, PVC I y PVC II, más impermeables al aire, la fuente de producción de estos compuestos, aunque es la misma (peróxidos y cromógenos a 232 nm), se ha de tener en cuenta que su concentración es bastante inferior. Sin embargo, tanto en los envases de polietileno como en los de PVC y vidrio, se observa que la velocidad de formación de los compuestos responsables de la extinción a 270 nm, crece durante los

50 primeros días hasta un valor de 0,30 a 0,35 aproximadamente, para luego estabilizarse prácticamente. Por el contrario, las muestras envasadas en hojalata y el patrón conservado en frigorífico, mantienen invariable su valor, por debajo de 0,25 a lo largo de todo el período de almacenamiento.

En principio, no parece lógico que la subida de los valores de extinción a 270 nm. en las muestras envasadas en vidrio, PVC I y PVC II, sea similar a la de las muestras conservadas en polietileno, puesto que la concentración en peróxidos y en otros compuestos responsables de la extinción a 232 nm, es más elevada en esta muestra, que en las restantes. Partiendo de este hecho, era de esperar una mayor diferencia en los valores de esta extinción, entre las muestras envasadas en polietileno y las conservadas en vidrio y PVC; ¿por qué esta escasa diferencia?

La observación de que las muestras envasadas en botellas permeables, se comporten de forma diferente, cuando están expuestas a la luz que cuando lo están en la oscuridad, nos permite creer, por una parte, que la formación de estos compuestos, está más estrechamente relacionada con el efecto de la luz que con las mayores o menores disponibilidades de oxígeno; pero también podría sentarse la hipótesis, de que si el contenido en peróxidos es muy

elevado, (caso de las muestras envasadas en polietileno) la reacción secundaria (destrucción de los peróxidos), seguiría otros caminos, dando productos que no absorben a 270 nm, en su mayoría.

Como se observa en el gráfico nº6 de este grupo, las muestras de tipo rivierra, envasadas en los diferentes materiales estudiados, no sólo no presentan aumento de su extinción específica a dicha longitud de onda a lo largo del período de almacenamiento, sino que sus valores disminuyen particularmente en las muestras envasadas en polietileno.

La causa de este decrecimiento parece encontrarse en el hecho de que al tener este aceite un 80% de refinado, parte al inicio de la experiencia con un valor elevado de extinción específica a 270 nm, o lo que es igual, con una gran concentración de cromógenos a esta longitud de onda, y como antes hemos anotado cuando el valor de dicha concentración alcanza cierto límite, el camino que sigue la destrucción de los peróxidos parece conducir a la formación de compuestos que no absorben a 270 nm.

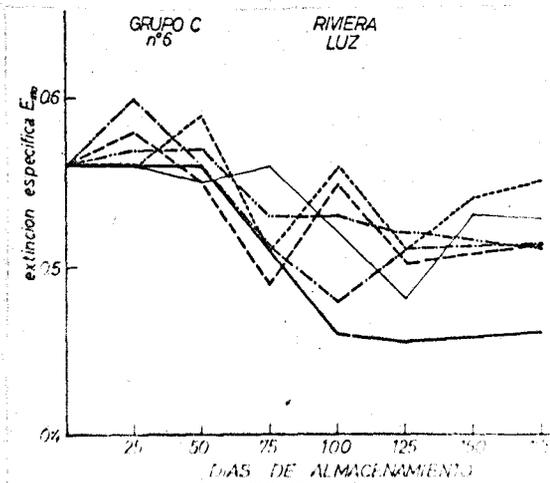
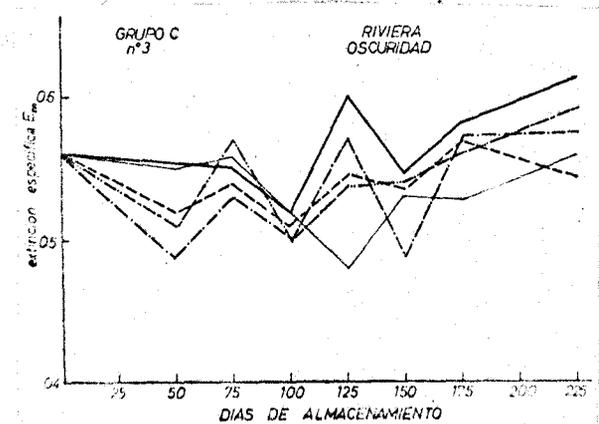
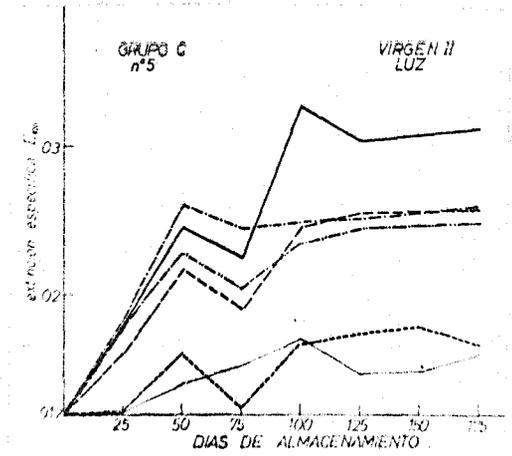
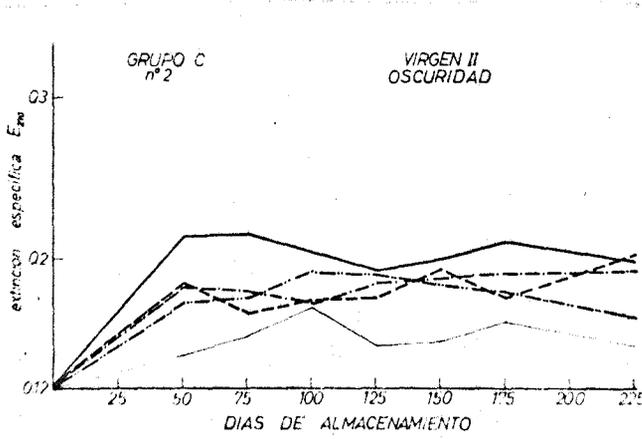
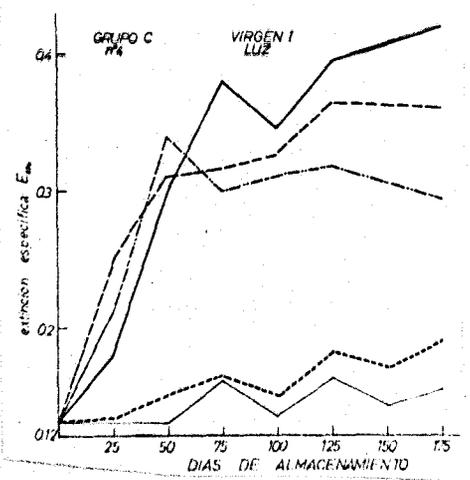
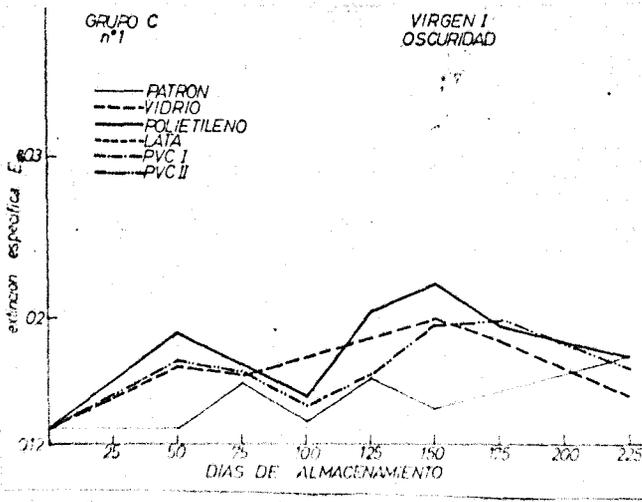
En los gráficos del 7 al 13, correspondientes a las muestras de aceites virgenes, almacenadas en condiciones mixtas, se observa un aumento de la velocidad de formación de compuestos que absorben a 270 nm, cuando las

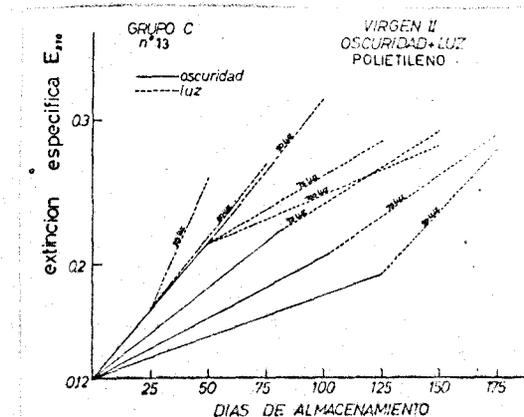
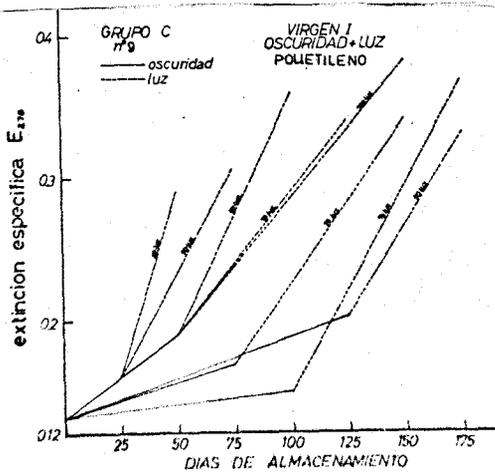
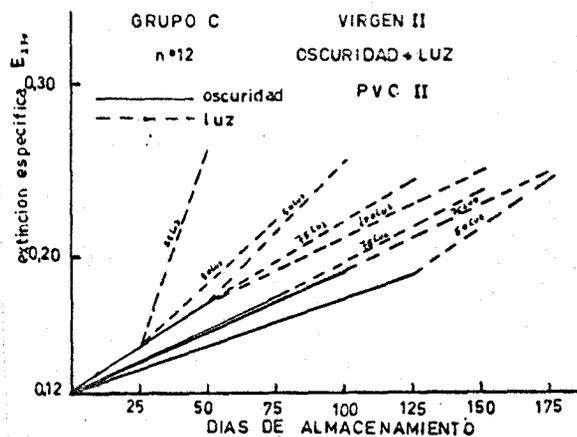
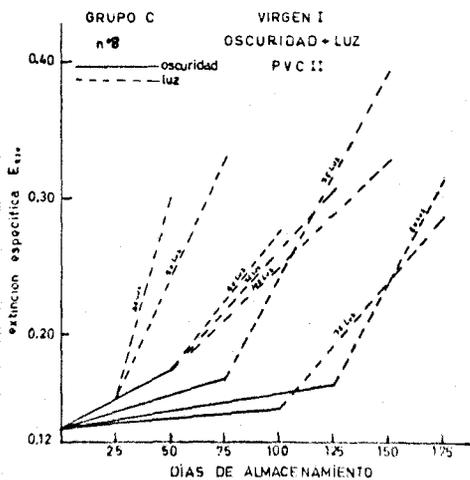
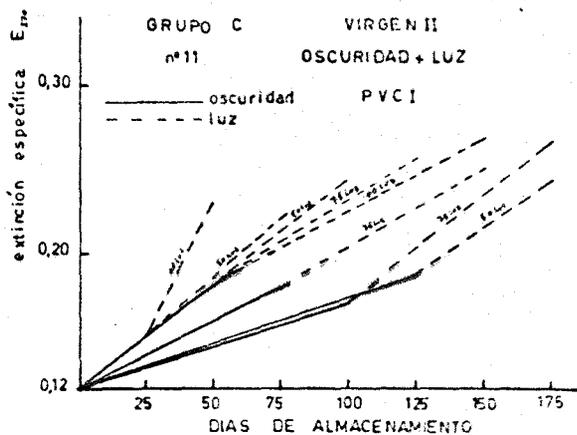
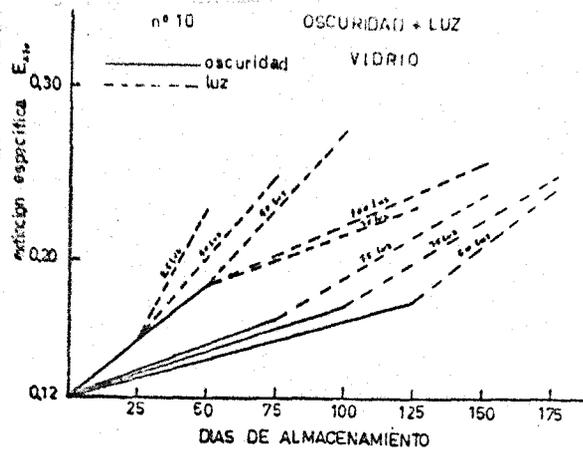
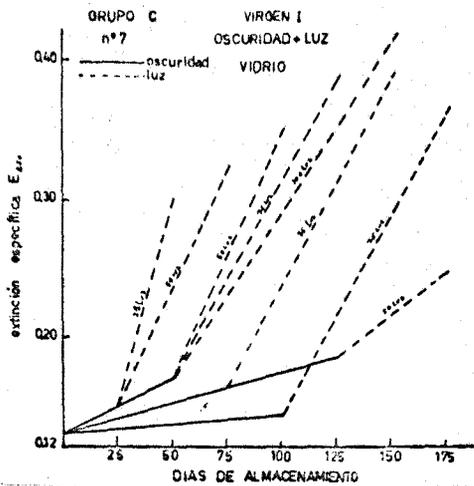
muestras son pasadas de la oscuridad a la luz, lo que nos confirma, que la destrucción de los peróxidos, está más relacionada con la acción de la luz que con la mayor o menor permeabilidad del envase; ya que como se puede apreciar en estos gráficos, no existe gran diferencia entre las muestras envasadas en polietileno y las envasadas en vidrio, PVC I y PVC II.

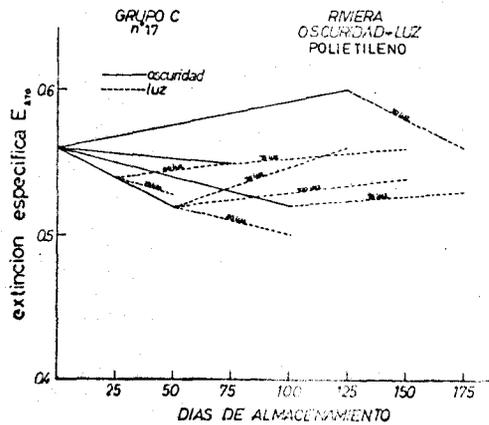
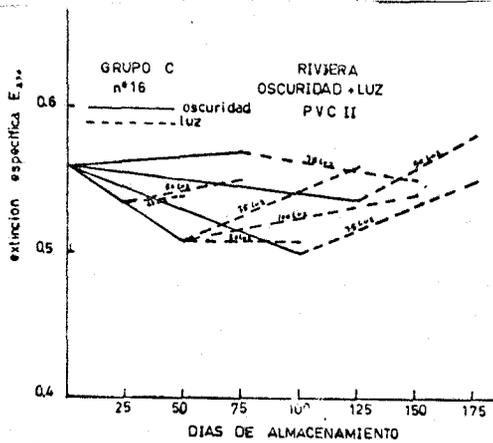
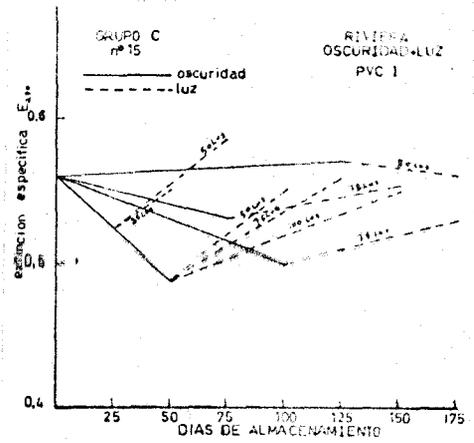
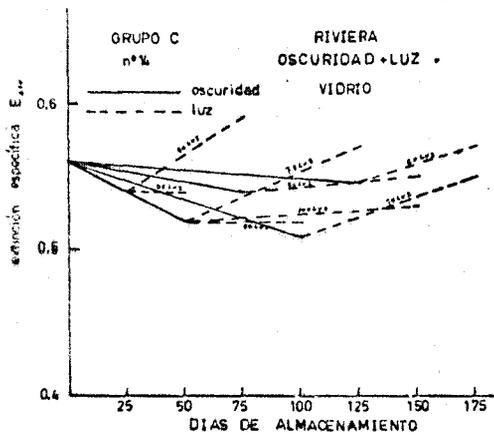
También se observan en todos estos gráficos, un paralelismo bastante aproximado entre aquellas muestras que han permanecido el mismo tiempo expuestas a la luz; pareciendo no tener gran importancia el valor original de su extinción, (es decir el valor que tenían al pasar de la oscuridad a la luz) que en ningún caso era el mismo. Todo esto parece indicar que el camino que sigue la destrucción de los hidroperóxidos, bajo la acción de la luz es el mismo en los aceites vírgenes; pues este paralelismo se da tanto en el virgen I como en el virgen II.

En las muestras del aceite tipo riviera, gráficos nº 14 al 17, como era lógico esperar y a tenor de los resultados obtenidos con las muestras expuestas a la luz, se produce un fenómeno diferente al observado en los demás aceites, pues las muestras cuando se exponen a la luz no sufren un fuerte aumento en su absorción. Por otra parte, es digno de destacarse el hecho de que en las únicas que decrece la absorción, es en aquellas en la que su va-

lor de extinción específica es superior a 0,57 como se puede comprobar en las muestras envasadas en PVC I (125 días oscuridad más 50 días luz) PVC II (75 días oscuridad más 75 días luz) y polietileno (125 días oscuridad más 50 días luz). Lo que nos vuelve a confirmar que el camino seguido por la destrucción de los peróxidos en este tipo de aceite, es diferente al del aceite virgen. Hipótesis que se confirma aún más, por el hecho de la falta de paralelismo entre las determinaciones.







3.4. ESTUDIO DE LOS VALORES DADOS
POR LA PRUEBA DE KREIS (gráfi-
cos del grupo D)

En este grupo de gráficos, se estudia la evolución de los valores dados por la prueba de Kreis (modificación de Taffel y Revis), durante el almacenamiento de los tres aceites, conservados en la oscuridad (gráficos nº1,2 y3) y expuestos a la luz (gráficos nº 4,5y 6) envasados en los distintos materiales que se estudian.

Con anterioridad, al hacer las consideraciones generales sobre la prueba de Kreis, se ha referido la dualidad de teorías sobre compuestos en los que se fundamenta la reacción base de dicha prueba (epihidrialdehído, según Powich, y aldehído malónico, según Patton, Kenney y Kunrtz). No obstante, dentro de estas posibilidades, esta prueba podemos considerarla de gran especificidad frente a la extinción específica a 270 nm, puesto que se fundamenta en dos posibles compuestos, que se desarrollan durante la oxidación secundaria de las grasas, es decir, como consecuencia de la destrucción de los peróxidos.

Analizando los resultados de las muestras conservadas en la oscuridad (gráficos nº 1 al 3), se observa que en los tres aceites, las muestras almacenadas en los envases impermeables (vidrio, PVC I y PVC II) mantienen su valor inicial a lo largo de casi todo el almacenamiento, experimentando una leve subida al final de este período. Este comportamiento resulta totalmente lógico a la vista de los

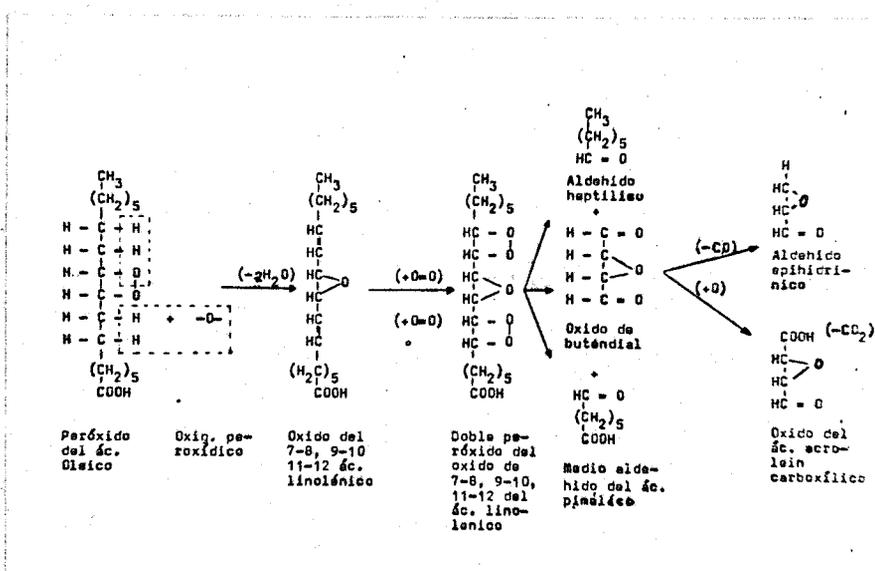
resultados de I.P. y $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 270 nm ya observado en estas muestras, pues como hemos comentado al hablar de la extinción específica a 270 nm, las reacciones secundarias (destrucción de peróxidos) de oxidación no han podido darse, al no disponer ni de concentración elevada de peróxidos ni de energía suficiente para que los que tiene se destruyan.

En las muestras envasadas en polietileno el comportamiento es algo diferente, pues como se puede observar en el gráfico nº 3, a partir de los 75 días de almacenamiento, estas muestras comienzan a experimentar paulatinamente una subida en los valores dados por esta prueba, lo que indica claramente que la reacción de destrucción de los peróxidos, en el sentido de esta prueba, ha comenzado.

Observando conjuntamente estos resultados con los de extinción específica a 270 nm, se deduce que bajo el efecto de la temperatura, la reacción secundaria de oxidación prácticamente no se inicia.

En las muestras conservadas a la luz (gráficos nº 4 al 6) nuevamente se aprecia que las almacenadas en los envases impermeables al oxígeno atmosférico, (hojalata, vidrio, PVC I y PVC II) mantienen casi inalterado su valor inicial, a pesar de disponer de la energía luminosa, que como se puede ver en los comentarios sobre la extinción específica, produce una gran destrucción de los peróxidos en

estas muestras. La razón de este fenómeno se encuentra en la impermeabilidad de los materiales de los envases, ya que como se puede observar en la marcha propuesta por Powick (64), para la formación del epihidrialdehído a partir del peróxido del ácido oléico, es necesaria la presencia de oxígeno para que la reacción progrese, una vez formado el óxido 7-8, 9-10, 11-12 del ácido linolénico



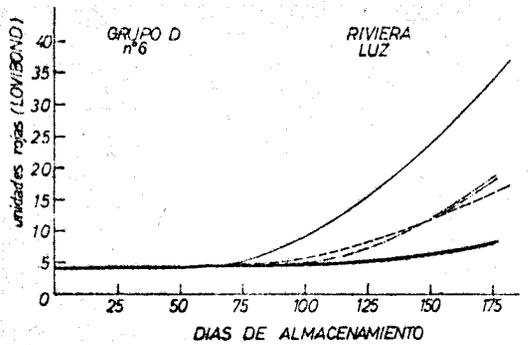
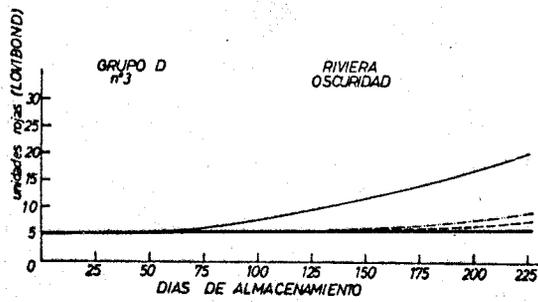
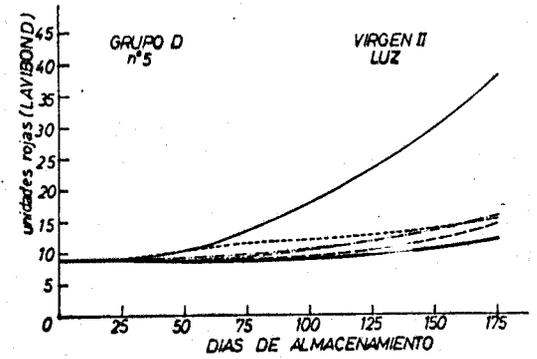
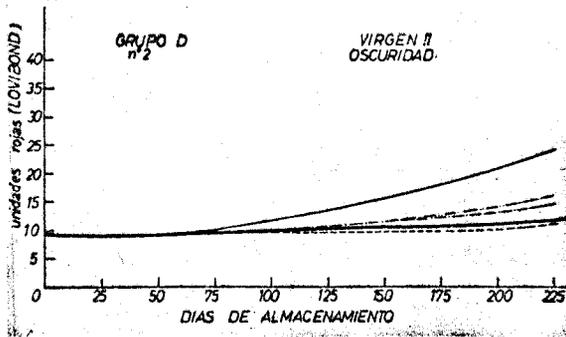
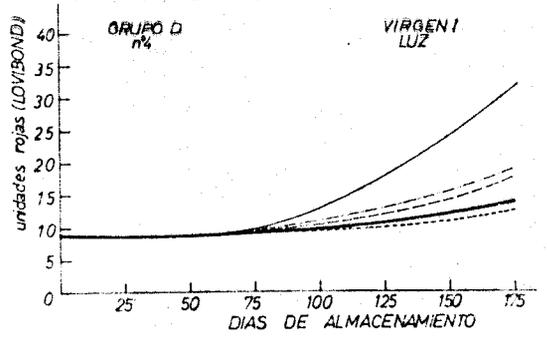
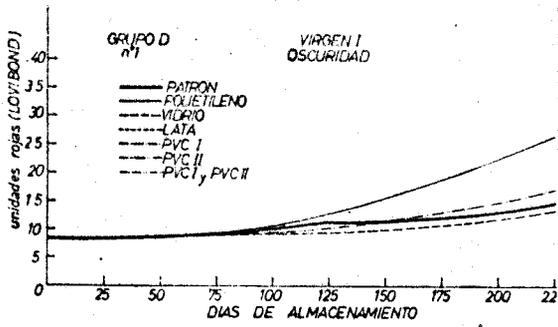
En las muestras de los tres aceites que han sido envasadas en polietileno, a partir de los 50 días de almacenamiento, se observa un aumento progresivo de los valores dados por esta prueba, lo que resulta del todo lógico, ya que al ser el envase permeable al oxígeno atmosférico, la

reacción antes aludida puede progresar y consiguientemente se puede formar el aldehído epihidrínico.

De acuerdo con lo anterior, se deduce que la formación de los compuestos aldehídicos responsables de la prueba, están más íntimamente relacionado con la permeabilidad del envase que con el posible efecto catalítico, producido por la luz.

En el esquema antes expuesto, el aldehído epihidrínico se produce en cantidades equimoleculares con el heptílico que según Scala (65) es el principal responsable del olor a rancio, por lo que esta prueba debería presentar cierta correlación con los resultados organolépticos; adelantándonos un poco a los comentarios de dichos resultados organolépticos, podemos decir; que en los aceites vírgenes esta correlación no se cumple con rigurosidad, seguramente a causa de posibles alteraciones de los aromas naturales de estos aceites, que no están relacionados con la formación de los productos de oxidación de los glicéridos, en los que se fundamenta esta prueba y por otra, por posibles interferencias que en la lectura del color, pueden tener otros productos, no relacionados con los aldehídos en que se basa, pero que dan características espectrales parecidas, a las mismas longitudes de onda. En el caso del aceite tipo riviera los valores de esta prueba coinciden bastante bien con los resulta-

dos organolépticos, lo que podemos atribuirlo a la pequeña porción de aromas naturales que posee dicho aceite (20% de virgen).



3.5. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DEL COLOR
DE LOS ACEITES (Gráficos del grupo E)

En este grupo de gráficos se estudia la evolución, a lo largo del ensayo, de la transmisión en el visible (390-700 nm) de los aceites almacenados, envasados en los distintos recipientes que se están estudiando. Los gráficos nº 1, 2 y 3 recogen la transmisión de las muestras conservadas en la oscuridad.

De la observación de estos gráficos se deduce que tanto en los aceites vírgenes I (gráfico 1) y II (gráfico 2) como en el tipo rivierra (gráfico 3), la transmisión en la zona visible del espectro, no ha sufrido variación sensible a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento. Este hecho es lógico, ya que, como se ha podido ver antes por la marcha de las distintas pruebas químicas, dichas muestras no han sufrido oxidación notable o al menos, esta no ha sido lo suficientemente intensa, como para afectar a los pigmentos coloreados. En otras palabras, los aceites envasados conservados en la oscuridad, mantienen su coloración característica inicial inalterable, a lo largo del período de almacenamiento.

Todo ello nos demuestra, que la decoloración debe ser una reacción fotoquímica, puesto que la mayor o menor permeabilidad del envase afecta muy poco a su decoloración como puede verse por el comportamiento de las muestras que están envasadas en polietileno.

El grupo de gráficos nº 4,5 y 6, muestra la evolución de la transmisión de las muestras almacenadas en la luz. En ellos se observa que: tanto las muestras patrón como las envasadas en hojalata, no han sufrido alteración a lo largo del almacenamiento, como lo demuestra la superposición de sus curvas de transmisión.

A partir de los 50 días de almacenamiento, en las muestras de aceites virgenes y riviera, envasadas en vidrio, PVC I y PVC II, se aprecia una notable decoloración, tanto en la zona de los carotenos (amarillos) como en la de la clorofila (verde), lo que claramente nos indica la acción destructora de la luz sobre estos pigmentos.

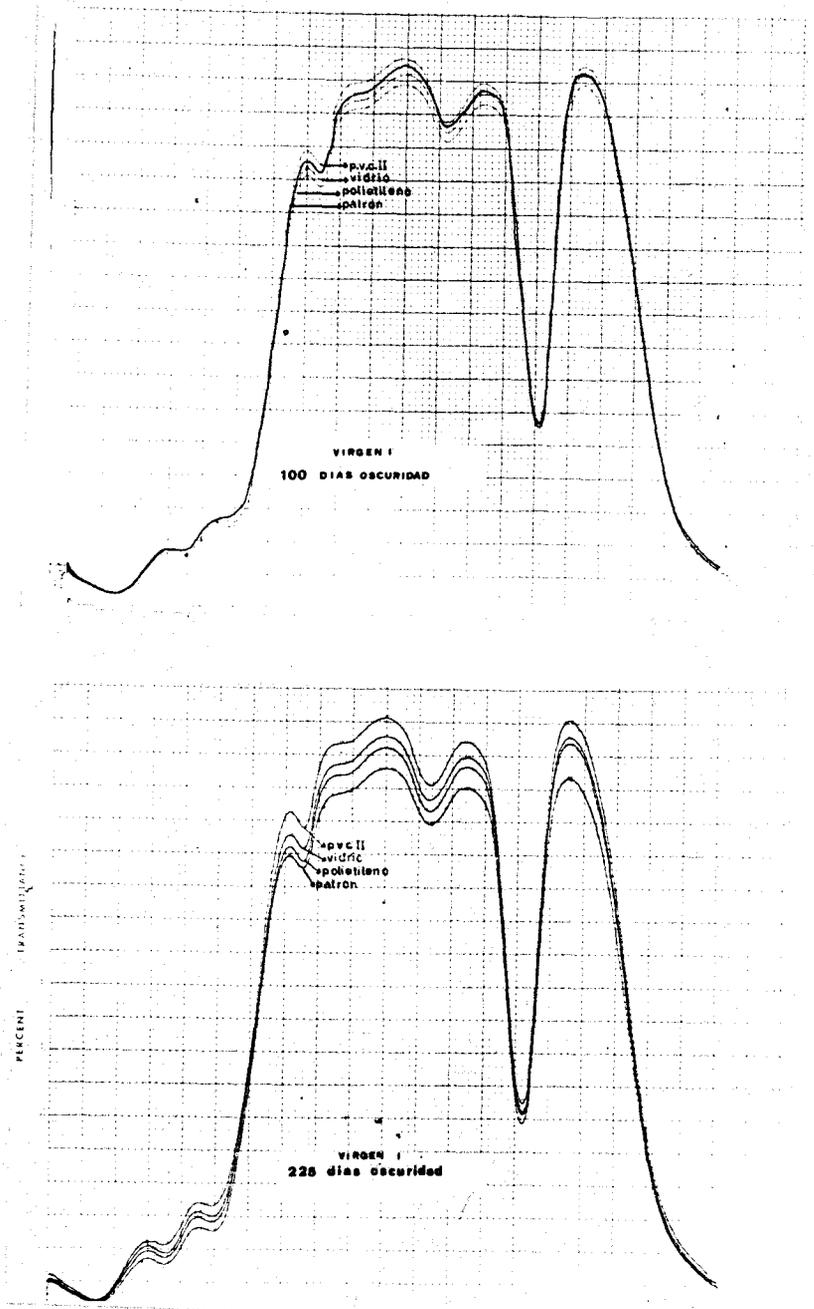
En las muestras envasadas en polietileno se observa que durante los primeros meses de almacenamiento a la luz, se conserva bastante mejor el color inicial del aceite, que en los otros envases transparentes a la luz; hecho que resulta lógico, ya que como se ha comentado anteriormente, este envase ofrece mayor protección a la luz que los restantes. Pero a medida que el tiempo avanza, el aceite comienza a decolorarse ostensiblemente.

La razón de este comportamiento la atribuimos al hecho de que siendo la decoloración un fenómeno sensiblemente fotoquímico, dentro de niveles bajos de oxidación, durante los tres primeros meses del almacenamiento, la protección

que suministra el envase es suficiente para evitar la destrucción de los pigmentos, pero cuando la oxidación es muy elevada (IP = 70 meq/Kg) la decoloración del aceite de este envase llega a igualarse e incluso a sobrepasar (175 días de almacenamiento, ver gráfico 6) a la de los aceites envasados en los demás materiales transparentes, ya que a la acción fotoquímica se le une la acción destructora de la oxidación.

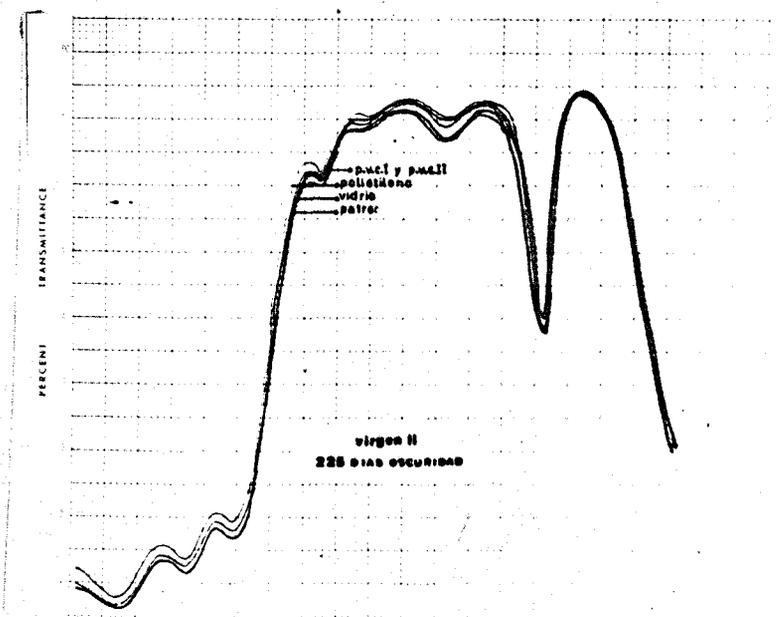
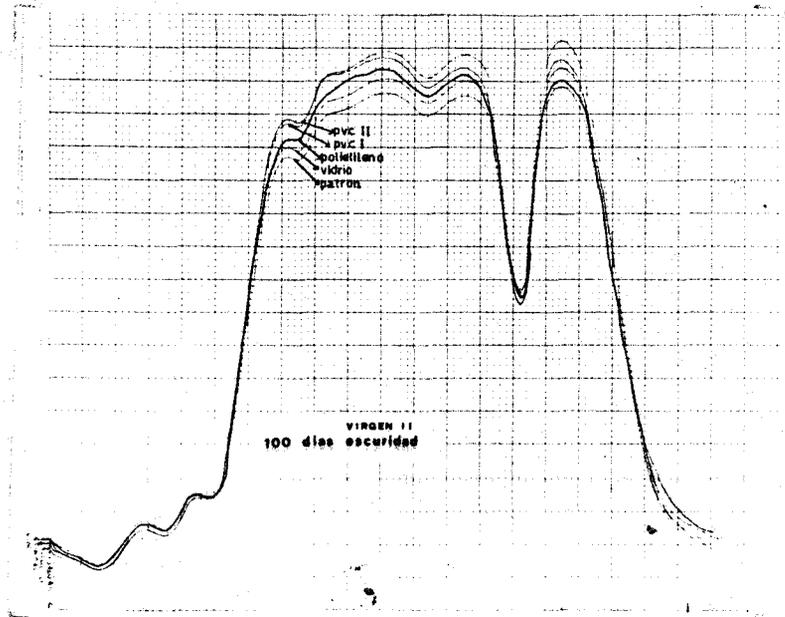
GRUPO E

nº 1



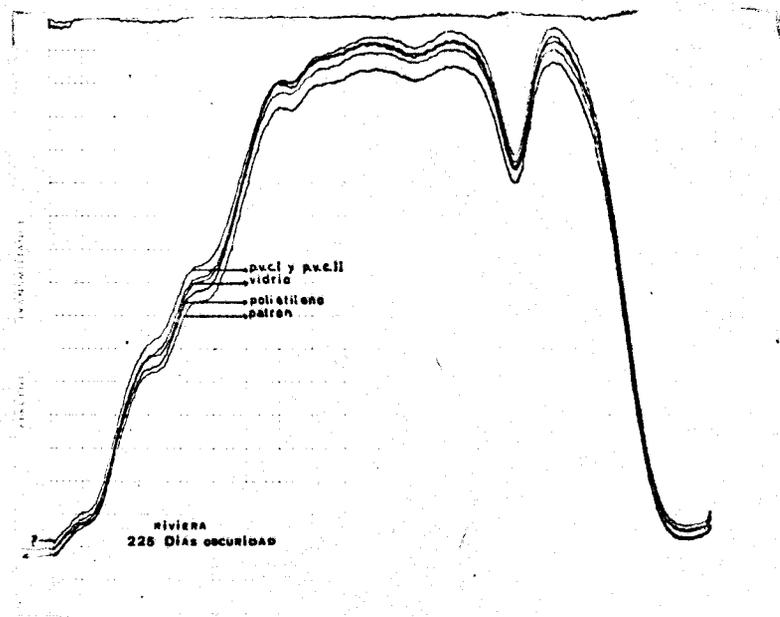
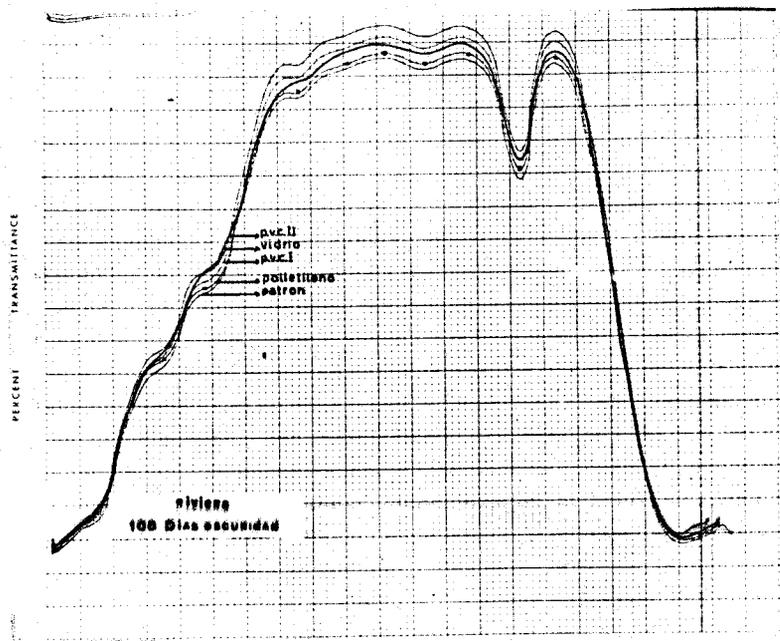
GRUPO E

nº2

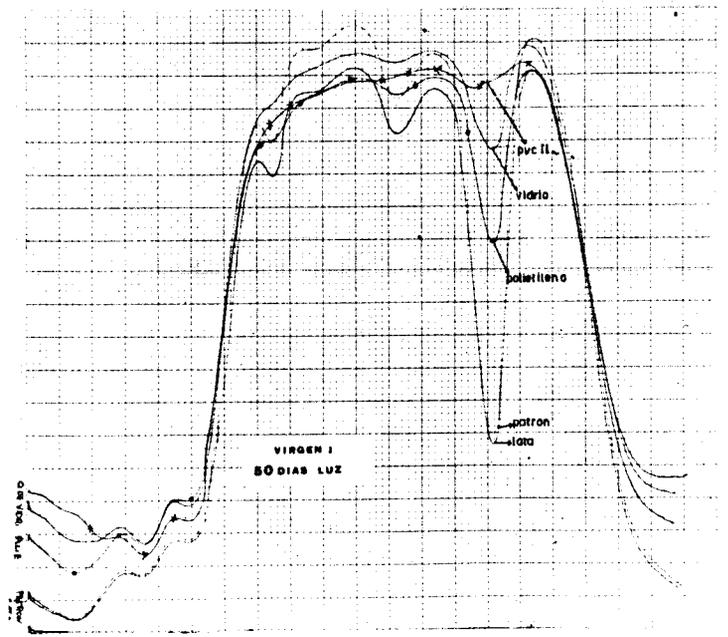


GRUPO E

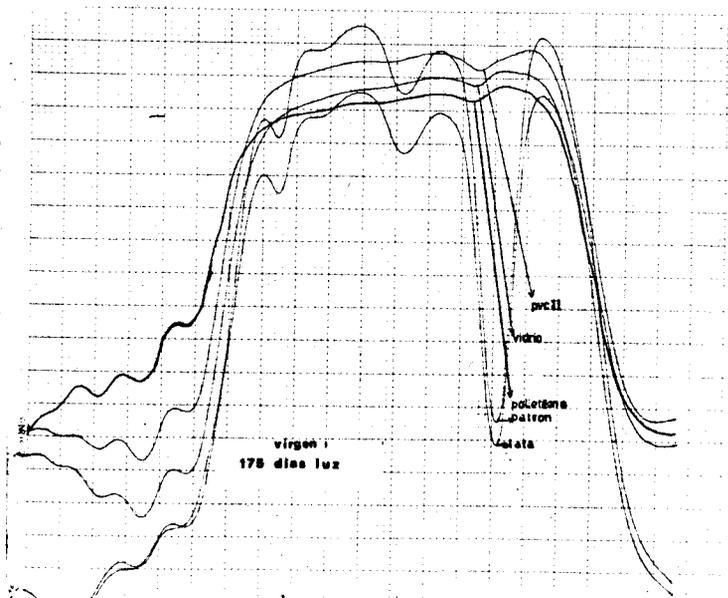
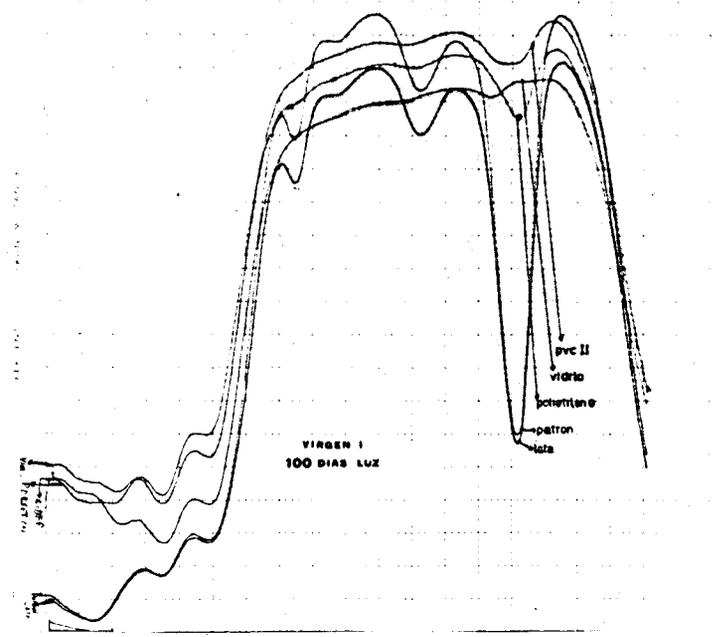
n° 3



GRUPO E

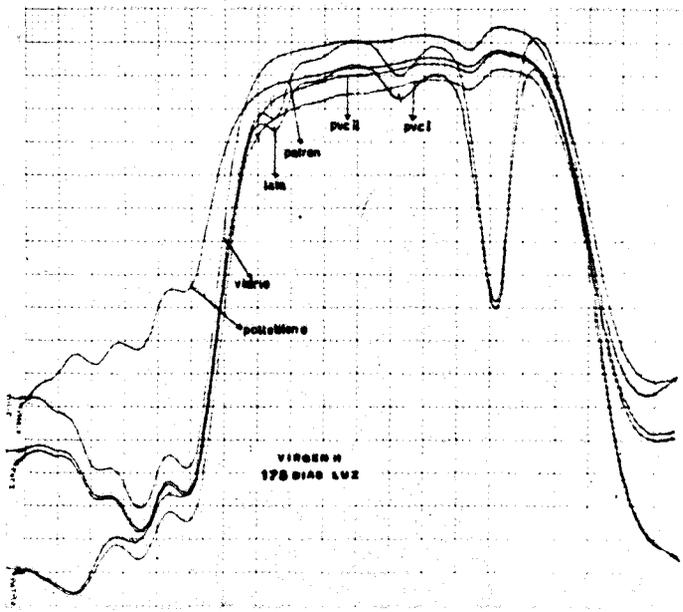
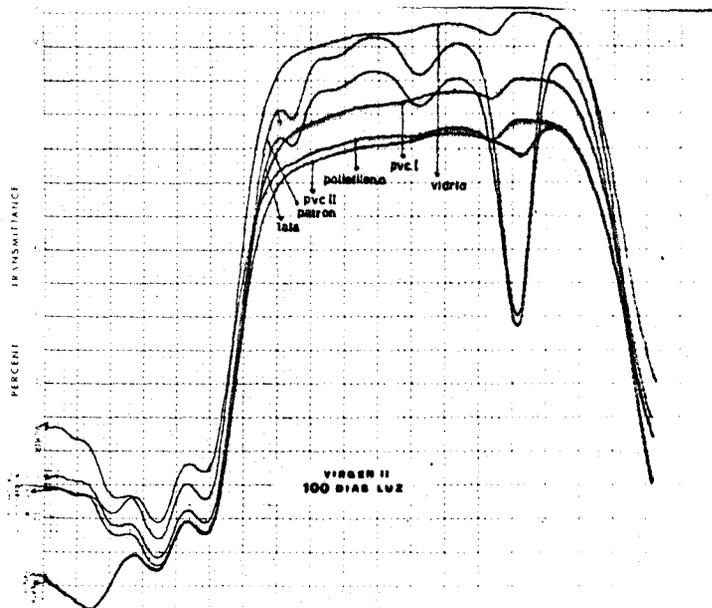
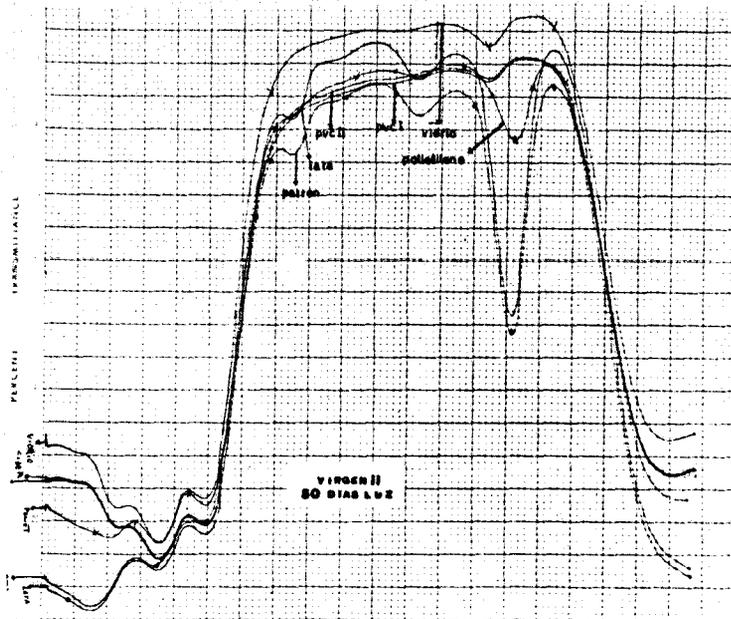


nº4



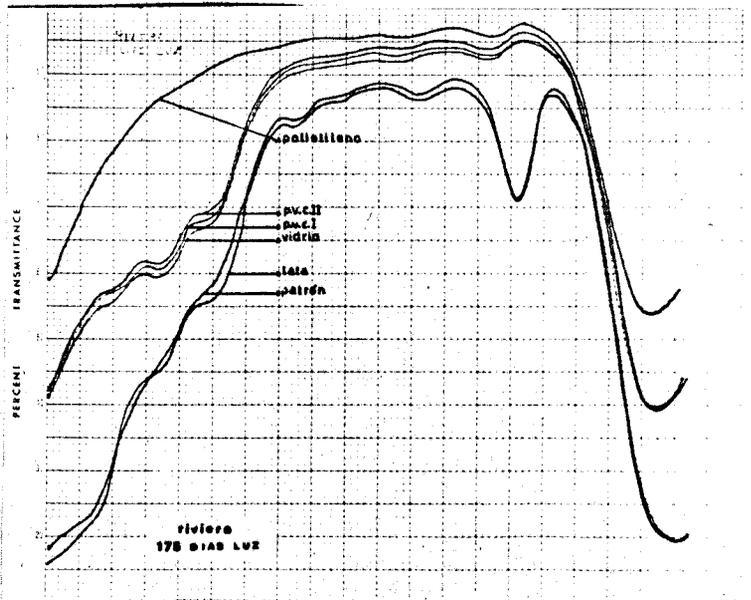
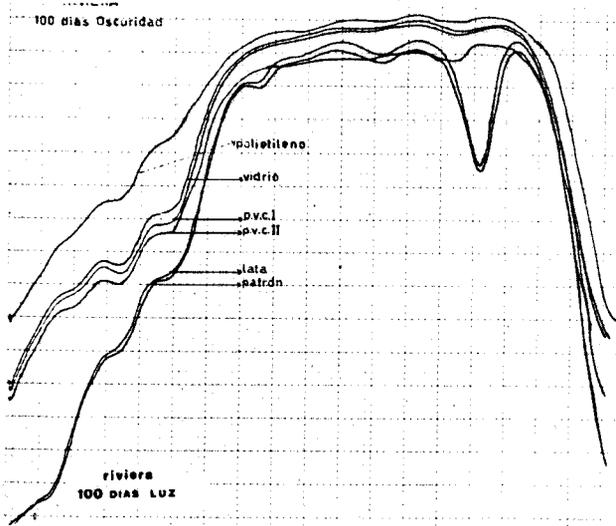
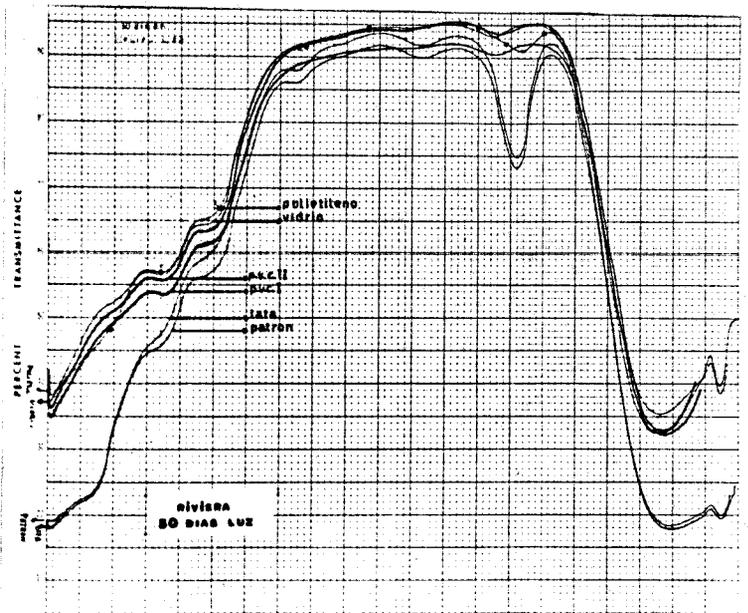
GRUPO E

n°5



GRUPO E

nº6



3.6. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DEL CONTE-
NIDO EN TOCOFEROLES Y MATERIAS RE-
DUCTORAS (gráficos del grupo F)

En este grupo se recoge la marcha de la concentración de tocoferoles y otras materias reductoras, a lo largo del almacenamiento.

De la observación simultánea de los gráficos nº 1 al 6, se deduce que, los patrones de los aceites virgenes I y II y del tipo rivierra, conservan prácticamente inalterable la concentración de tocoferoles a lo largo del periodo de almacenamiento.

En las muestras de los aceites virgenes y rivierra envasados en recipientes transparentes a la luz e impermeables al oxígeno atmosférico (vidrio, PVC I PVC II), conservados en la oscuridad (gráficos nº 1, 2 y 3) se aprecia una pequeña disminución en la concentración de estos compuestos, como consecuencia del oxígeno presente (el del espacio de cabeza y el que naturalmente lleva disuelto el aceite), que, según se vio al estudiar el I.P., ocasiona una pequeña oxidación, que ha de reflejarse naturalmente en el consumo natural de una parte de estas sustancias antioxidantes. En todas estas muestras, la pérdida se cifró, aproximadamente, en unas 60-80 p.p.m. lo que en el virgen I supuso una disminución del 8%, en el virgen II del 12% y en el tipo rivierra del 26%.

En los envases transparentes a la luz y permeables al oxígeno atmosférico (polietileno), esta pérdida es algo

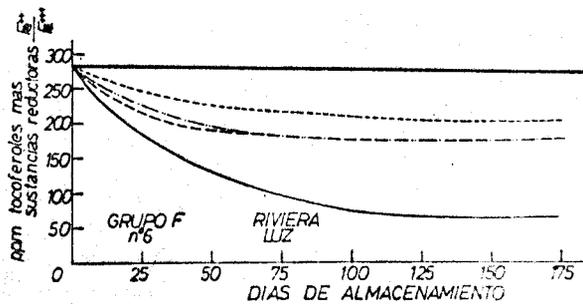
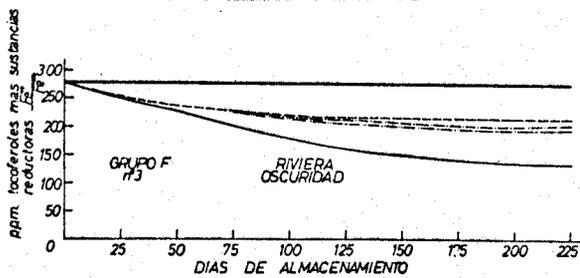
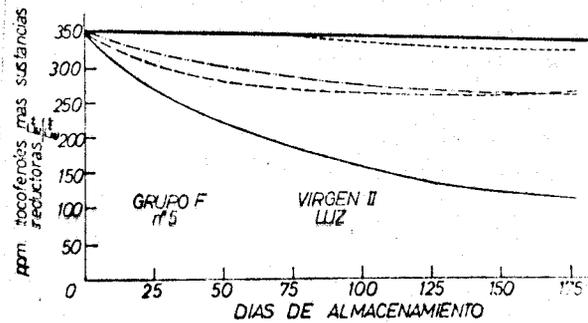
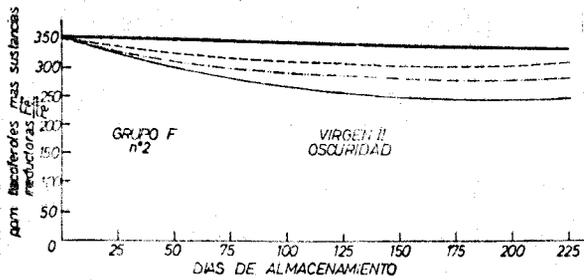
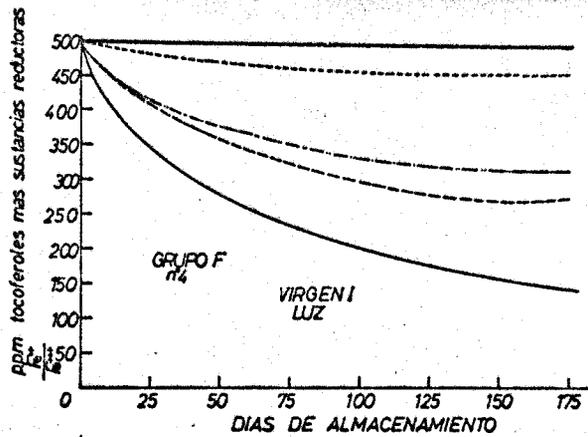
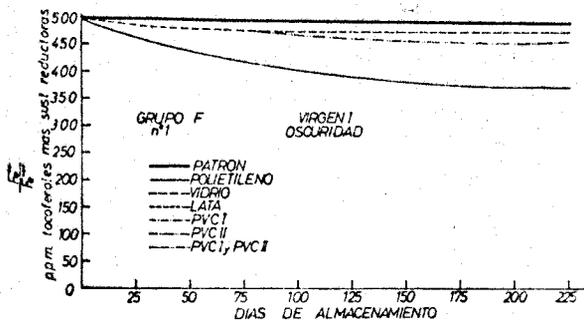
mayor como consecuencia del oxígeno, que se filtra a través de las paredes del material. Por término medio la pérdida, en los tres aceites, sobrepasa las 100 p.p.m. y refiriéndolo a porcentajes, en el virgen I supone un 25% en el virgen II un 24% y en tipo riviera de 53%.

En todas las muestras, expuestas a la luz (gráficos nº 4, 5 y 6), se aprecian pérdidas mayores en relación a las experimentadas cuando se conservan en la oscuridad, hecho que no es de extrañar, dado la labilidad de estas sustancias a las radiaciones luminosas. Entre las muestras envasadas en vidrio, PVC I y PVC II, no existen diferencias apreciables dentro de un mismo tipo de aceite, pero, al comparar los diferentes aceites entre si, vemos que el virgen I es el que mayor pérdida ha experimentado, un 43%, seguido del riviera con un 35% y por último el virgen II con un 30%.

Finalmente, las muestras que mayor pérdida manifestaron, fueron las envasadas en polietileno, que en los aceites virgen I y II, experimentaron descenso del 70% y el riviera del 75%.

De las consideraciones anteriores deducimos una vez más, la gran importancia que tiene el proteger a los aceites de las radiaciones luminosas, y la necesidad de elegir un envase de adecuado grado de impermeabilidad al oxígeno atmosférico, ya que no debemos olvidar, que junto al efect

antioxidante de estas sustancias reductoras, tan íntimamente ligadas con la estabilidad del aceite frente al enranciamiento, se encuentra su actividad vitamínica.



3.7. ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LA
ESTABILIDAD A.O.M. (gráficos del
grupo G)

En estos gráficos se recoge la marcha de la estabilidad de las muestras de aceite durante el almacenamiento.

Con anterioridad habíamos anotado la carencia de una buena correlación entre las usuales pruebas químicas y la estabilidad; sin embargo, su medida, en un momento dado, resulta un buen índice de la resistencia de la grasa a los fenómenos oxidativos, estando en cierto modo relacionada con la mayor o menor disponibilidad de antioxidantes.

Como puede apreciarse en el grupo de gráficos nº 1 y 2, correspondientes a los aceites vírgenes I y II, las muestras almacenadas en la oscuridad, envasadas en recipientes transparentes, conservan su valor inicial de estabilidad igual que el patrón, hecho lógico, puesto que como se ha podido apreciar, por la marcha de las pruebas antes estudiadas, los aceites ni han sufrido una gran alteración, ni han experimentado un descenso notable de sus tocoferoles, ni de otros posibles antioxidantes fenólicos.

Por el contrario, las muestras envasadas en polietileno, como consecuencia de sus alteraciones y de la destrucción de sus tocoferoles, han experimentado una pérdida de estabilidad que, por término medio, se cifra en unas 7 horas, en ambos aceites.

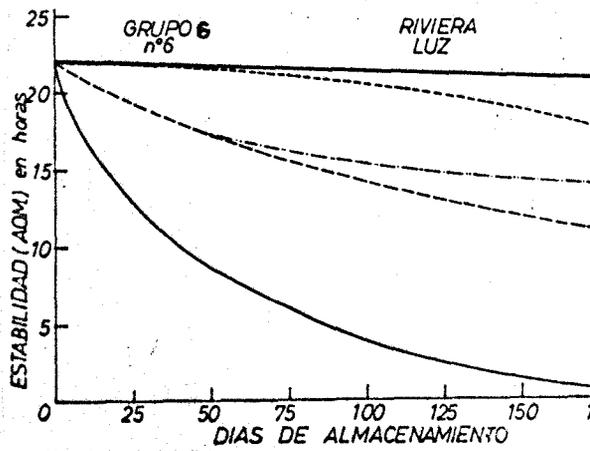
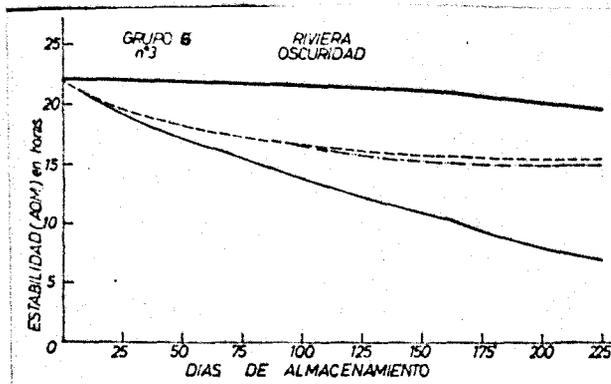
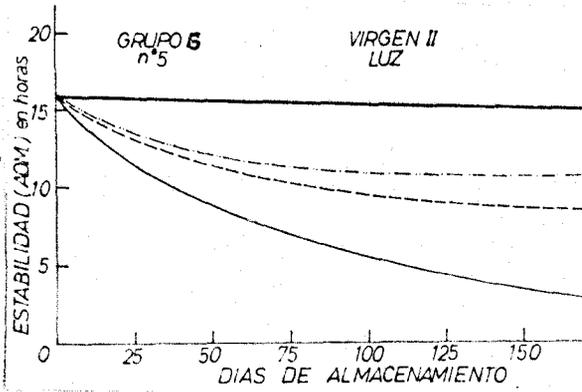
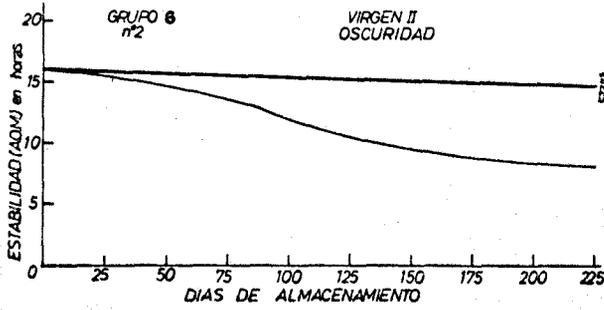
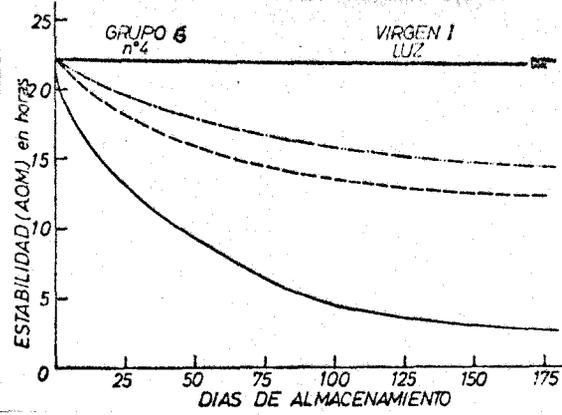
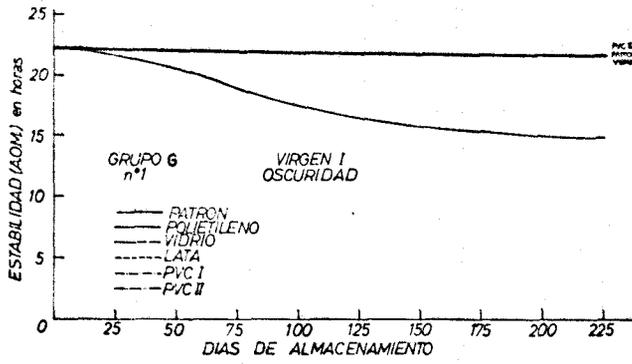
En el aceite rívier, gráfico nº 3, la única muestra que ha conservado su estabilidad inicial es el patrón,

en las demas se aprecian dos niveles diferentes: en el primero se encuentran las muestras cuyo aceite no ha sufrido gran alteración oxidativa (las envasadas en vidrio, hojalata y PVC), pero sí han experimentado descenso notable de su contenido en tocoferoles (aproximadamente 27%); en ellas la estabilidad ha disminuido en 7 horas; y en el segundo nivel se encuentra el aceite envasado en polietileno que, como consecuencia de sus alteraciones oxidativas y de su pérdida de tocoferoles, ha sufrido un descenso de estabilidad de unas 15 horas.

En las muestras de los aceites virgenes, cuando han permanecido expuestos a la luz, gráficos nº 4 y 5, se observa un fenómeno análogo al que acabamos de comentar en el aceite rivierra, conservado en la oscuridad; es decir que, tanto en el aceite virgen I como en el II, las muestras que se conservan con mayor estabilidad son las que se han envasado en recipientes impermeables. En ellos la pérdida de estabilidad es de 8 horas para el virgen I y de 7 horas para el II, hecho que resulta lógico, ya que en el virgen I ha disminuido su contenido en tocoferoles en un 40% y en el virgen II en un 30%. En las muestras conservadas en polietileno, como consecuencia de la oxidación sufrida (alcanzan un I.P. = 95) y de la disminución en tocoferoles (70%), la estabilidad se ha perdido casi totalmente, al final del

ensayo, pues en el virgen I ha disminuido 19 horas (22 horas iniciales) y en el virgen II, 14 horas (16 horas iniciales). Las muestras de aceites virgenes envasadas en hojalata, se mantienen con estabilidad idéntica a sus respectivos patrones, a lo largo del almacenamiento, lo que resulta del todo lógico a la vista de las pruebas antes comentadas.

En las muestras de tipo Riviera, almacenado a la luz, gráfico nº 6, el comentario es análogo al anterior, en el grupo de muestras envasadas en vidrio, PVC I y PVC II la estabilidad al final del ensayo descendió en 9 horas y en las envasadas en polietileno 21 horas. Las muestras de este tipo de aceite, envasadas en hojalata, a lo largo del ensayo manifiestan una pequeña disminución de su estabilidad, que llega a ser al final de unas 4 horas, hecho que no es de extrañar dada la pérdida de sustancias reductoras experimentadas (23%).



3.8. ESTUDIO DE LOS VALORES OBTENIDOS
EN LA DETERMINACION DE TRAZAS
MATALICAS (Tablas I)

Al objeto de conocer si las muestras de aceites envasadas en hojalata estañada, habían aumentado su contenido en metales pesados (posibles catalizadores de la autoxidación) después del prolongado almacenamiento, se procedió a determinar el contenido en elementos trazas de Fe, Mg, Cu y Zn, y a compararlo con el de las muestras almacenadas en vidrio, ya que este material no parece contaminar a los aceites en estos elementos.

Los contenidos metálicos determinados por el método descrito, para ambos aceites virgenes y para el de tipo rivierra se recogen en la tabla adjunta.

De la observación de la presente tabla se deduce, que en las condiciones de este ensayo, y siguiendo el método de determinación de trazas metálicas expuesto, los metales pesados presentes en las muestras conservadas en los envases indicados, no presentan entre sí diferencias suficientemente importante como para atribuirles, al menos, un efecto primordial en los cambios observados en los aceites almacenados.

Particularmente en el caso de los aceites virgenes la investigación del estaño no fue positiva al menos siguiendo la técnica descrita, no siendo posible por consiguiente atribuir a la formación de sus jabones metálicos, las alteraciones organolépticas observadas en los aceites envasados en hojalata.

T A B L A I

CONTENIDO METALICO DE LOS ACEITES DE OLIVA

Aceite	Envase	Hierro	Manganeso	Cobre	Cinc
virgen I	Vidrio	2,78	0,060	0,057	0,34
	Hojalata	2,58	0,022	0,028	0,30
virgen II	Vidrio	0,43	0,008	0,051	0,29
	Hojalata	0,71	0,012	0,078	0,20
riviera	Vidrio	3,00	0,026	0,038	0,79
	Hojalata	2,63	0,011	0,034	0,86

3.9. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DE LAS
PRUEBAS ORGANOLEPTICAS (gráficos
del grupo H)

En este grupo de gráficos, se recoge la marcha de las diferencias organolépticas, encontradas por el panel de catadores, dentro de cada tipo de aceite entre la muestra patrón y las conservadas en los distintos envases que se estudian, almacenadas en la oscuridad (gráficos nº 1,2 y 3) y a la luz (gráficos nº 4,5 y 6).

Los valores que aparecen representados en estos gráficos, son las correspondientes medias aritméticas de los valores dados por los catadores, a las diferencias por ellos apreciadas, cuando han trabajado según el formulario de puntuación de la figura D, de forma, que cuando en dicho formulario los jueces hacían una marca en el casillero "NINGUNA" (indicando así que no encontraban diferencia entre la muestra marcada en clave y el patrón), le asignábamos la puntuación 1. a efectos de los cálculos estadísticos y así sucesivamente, hasta dar el valor 9 a las notas inscritas en el casillero indicador de diferencia "EXTREMA".

Estos valores fueron tratados estadísticamente por el método de Mahoney (79), como se indicó ya en la introducción, y después de eliminar a los catadores, cuya actuación era anormalmente deficiente, según las técnicas estadísticas adecuadas, se procedió al estudio de la significación de la diferencia estadística entre los valores medios, obtenidos para cada tratamiento, por el método de análisis de varianza abreviado, debido a Tukey (80).

Los resultados de estos estudios de significación estadística de las diferencias entre tratamientos, o mejor dicho, entre aceites conservados en distintos envases, encontradas por los catadores, se recogen en las tablas II y III. En la primera, representamos el grado de significación de las diferencias entre las muestras, que estuvieron almacenadas en la oscuridad, y en la segunda el grado de significación encontrado entre las muestras que permanecieron expuestas a la luz.

En estas tablas utilizamos la notación (+), indicando que la diferencia entre las puntuaciones organolépticas encontradas por los catadores, entre los aceites contenidos en los envases que se indican en la columna y fila correspondiente, son significativas al nivel $P < 0,05$, cuando el nivel de significación es $P < 0,01$ lo indicamos con (+ +).

Aún cuando con la técnica aplicada para el "Panel Test" en el presente ensayo, no hemos establecido directamente las preferencias del consumidor, entre los aceites contenidos en los distintos envases (lo cual requeriría un muestreo de la población consumidora, que no podemos realizar), se puede pensar, que si el patrón almacenado en el frigorífico se conserva, aromáticamente considerado, en perfectas condiciones, cuanto mayores sean las diferencias

encontradas entre el aroma del patrón y el de los aceites conservados en los distintos envases estudiados, serán mayores también las alteraciones sufridas por los componentes aromáticos de estos. Debemos puntualizar que dichas transformaciones aromáticas, pueden no estar relacionadas con las transformaciones oxidativas sufridas por el sustrato glicérido, o dicho de otra forma, con el mecanismo clásico que conduce a la "rancidez", en la acepción típica de esta palabra, siendo por consiguiente, los índices de peróxidos, extinción etc. poco útiles para medirlas.

Con el párrafo anterior queremos indicar que puede darse el caso, y de hecho se nos ha dado, (aceite envasado en hojalata), que el panel organoléptico encuentra notables diferencias entre el patrón y una muestra cualquiera, y sin embargo la valoración de tales diferencias no parece estar relacionada con ninguna de las alteraciones oxidativas, (rancidez, etc.), como así lo indican las pruebas químicas, en las que no se acusa aumento de componentes oxidados. Debemos pues atribuir estas variaciones, a alteraciones de los aromas naturales del aceite virgen, cuyos componentes son por ahora desconocidos.

Estudio de la evaluación organoléptica de las muestras de aceites vírgenes almacenados en la oscuridad.-

A la vista de los gráficos nº 1 y 2 y de la Tabla II

podemos deducir, para las muestras de aceites virgenes almacenados en la oscuridad, las siguientes conclusiones:

Aceite virgen I.-

A los 50 días de iniciado el almacenamiento, las diferencias entre el patrón y las muestras conservadas en los distintos envases no son estadísticamente significativas.

Las muestras envasadas en vidrio son las que primeramente se diferencian del patrón; esta diferencia es ya muy significativa ($P < 0,01$) a los 100 días de almacenamiento, conservando esta misma significación hasta el final del ensayo.

Las diferencias entre el patrón y las muestras envasadas en PVC II y polietileno comienzan a ser significativas ($P < 0,05$) a los 150 días de iniciado el almacenamiento, continuando hasta el final del ensayo con este mismo grado de significación.

Comparando entre sí las muestras almacenadas en las condiciones del ensayo, envasadas en los distintos materiales, llegamos a las siguientes conclusiones.

Entre las muestras envasadas en vidrio y las conservadas en PVC II y polietileno, las diferencias encontradas son significativas o muy significativas, a partir de los 100 días de almacenamiento. Puede resultar algo extraño,

el hecho de que diferencias muy significativas a los 100 días, pasen a ser solo significativas en los desmuestros posteriores, la razón de esto, se encuentra en la diferente velocidad de evolución del flavor de estas muestras. Es decir que mientras en las muestras envasadas en vidrio se alteran rápidamente estas características y luego llegan prácticamente a estabilizarse, en las otras muestras esta evolución es más lenta, aunque progresiva. Por ello la diferencia ha pasado de muy significativa a solo significativa lo cual no quiere decir que el aceite almacenado en vidrio haya mejorado, sino que las restantes muestras se han alterado acercándose a aquella.

Las diferencias entre las muestras envasadas en PVC II y polietileno carecen de significación a lo largo de todo el ensayo.

En la valoración de la calidad de un aceite de oliva, intervienen tanto sus índices químicos como sus propiedades organolépticas; pues bien, si comparamos entre sí ambos factores de calidad, en las muestras almacenadas en la oscuridad, observamos una falta absoluta de correlación entre ellos.

Así por ejemplo, las muestras de aceite virgen I conservadas en envases de vidrio, en términos organolépticos, son peores que las almacenadas en envases de PVC I

y polietileno, a pesar de que sus índices químicos (I.P., extinción específica a 232 y 270 nm. Kreis, etc.) poseen valores muy similares durante los primeros meses del almacenamiento; aún más, a medida que el ensayo se prolonga, las muestras conservadas en polietileno, son las que experimentan una oxidación más elevada, pero a pesar de ello, los catadores siguen considerándolas mejores que las envasadas en vidrio, cuyos índices químicos son apreciablemente más bajos.

Es importante destacar, que la falta de correlación entre índices químicos y pruebas organolépticas, solo es válida en niveles de oxidación en los que el olor "típico a rancio" no aparece normalmente; ya que en niveles superiores, cuando dicho olor aparece, el aroma genuino del aceite de oliva se transforma en "rancio" y entonces la correlación se hace claramente perceptible.

Aceite Virgen II.-

Al final de los 50 días de almacenamiento, al igual que ocurría en el aceite virgen I, el panel de catadores no encuentra diferencias significativas entre la muestra patrón, almacenada en el frigorífico, y las conservadas en los distintos envases estudiados.

En el desmuestre correspondiente a los 100 días de almacenamiento, aparecen ya diferencias muy significati-

vas entre el patrón y los aceites envasados en PVC I, vidrio y polietileno; conservando esta misma significación hasta el final del ensayo, sin embargo las muestras envasadas en PVC II presentan diferencias muy significativas en el desmuestra correspondiente a los 100 días, mientras que en los realizados a los 150 y 225 días la diferencia se hace solo significativa.

Aún cuando todas las diferencias reseñadas son significativas o muy significativas, la que más destaca cuantitativamente, es la existente entre la muestra patrón y la correspondiente envasada en vidrio, ya que como se puede ver en el gráfico nº 2, a partir de los 100 días de almacenamiento, adquiere una diferencia, que el panel califica de grande (recordar el formulario de puntuación, figura E) mientras que en las restantes comparaciones solo se alcanza el calificativo de ligera o moderada.

Comparando entre si las muestras envasadas en los distintos materiales estudiados, almacenadas en las condiciones del ensayo, llegamos a las siguientes conclusiones:

Las muestras de este aceite envasadas en PVC I, comparadas con las conservadas en PVC II y polietileno no presentan diferencias significativas a lo largo de todo el ensayo.

Las diferencias entre las muestras envasadas en PVC II y polietileno no alcanzan significación estadística hasta los 150 días de almacenamiento, pero posteriormente (225 días) esta significación se pierde. Este cambio de significación estadística puede ser circunstancial, a causa de un aumento o disminución fortuito de la percepción sensorial de los catadores, que ha influido positiva o negativamente (225 días) en el establecimiento de estas diferencias. Esto puede ser atribuible, bien a una oscilación, entre ambos desmuestres, del umbral de diferencia del panel, probablemente causado por la sustitución de algunos catadores, de un desmuestra a otro.

Las muestras envasadas en vidrio, después de 50 días de almacenamiento no presentan diferencias significativas con las conservadas en los distintos envases; pero a partir de los 100 días, las diferencias se hacen estadísticamente muy significativas, conservándose esta significación hasta el final del almacenamiento.

Estudio de la evaluación organoléptica de las muestras de aceites virgenes almacenadas a la luz.-

En los gráficos nº 4 y 5 se han representado las puntuaciones de diferencias con el patrón, de las muestras de los aceites virgenes I y II, conservados en los diferentes envases que se estudian, expuestos a la luz. En la ta-

bla III se dan las significaciones estadísticas de estas diferencias. De la observación simultánea de ambos se deducen las siguientes conclusiones:

Aceite virgen I.

En el primer desmuestre, realizado a los 50 días de iniciado el almacenamiento, aparecen ya diferencias muy significativas, entre la muestra patrón y las conservadas en envases transparentes (vidrio, PVC II y polietileno). En la muestra envasada en hojalata, el panel encuentra una diferencia algo menor, que estadísticamente alcanza la calificación de significativa ($P < 0,05$); pero a partir del segundo desmuestre (100 días de almacenamiento) esta diferencia se hace muy significativa, al igual que las restantes, conservando esta significación hasta el final del ensayo.

De la comparación entre sí, de las muestras que han estado sometidas a las condiciones del ensayo, se deducen las siguientes conclusiones:

Las muestras envasadas en hojalata, a los 50 días de almacenadas, son significativamente diferentes a las conservadas en PVC II, pero en los desmuestres posteriores esta significación desaparece. Esta pérdida de significación parece ser debida a la diferente velocidad de evolución del aroma del aceite en estos envases, fenómeno análogo al comentado al comparar las muestras del aceite virgen I, envasados en vidrio y PVC II, almacenados en la oscuridad, y de

modo análogo a lo comentado allí, la razón de esta pérdida de significación nos indica una transformación del aroma mas lenta, pero progresiva, en las muestras envasadas en hojalata en comparación con las variaciones experimentadas en las muestras envasadas en PVC II.

Las diferencias entre las muestras envasadas en hojalata y vidrio no se hacen significativas hasta los 100 días del ensayo, conservándose ésta en el siguiente.

Las diferencias entre las muestras envasadas en hojalata, en comparación con las envasadas en polietileno son estadísticamente significativas, en todas las determinaciones realizadas.

Las pequeñas diferencias organolépticas apreciadas por el "panel", en todos los ensayos, entre las muestras envasadas en PVC II, vidrio y polietileno, carecen de significación estadística con excepción de la encontrada, a los 175 días, entre las muestras de PVC II y polietileno que llega a ser significativa.

Considerando en conjunto todas las diferencias antes reseñadas, y los comentarios realizados para las muestras de este mismo aceite almacenadas en la oscuridad, merece destacarse el hecho de que, en las comparaciones de las muestras conservadas a la luz, las diferencias oscilan dentro del intervalo que abarca los calificativos de diferencia "ligera" a "grande", mientras que en las comparaciones reali-

zadas entre las muestras de este mismo aceite, conservadas al abrigo de la luz, las diferencias están comprendidas entre "ligera" y "moderada". Todo ello parece indicar que el efecto de la luz sobre la evolución del aroma de este aceite, es muy importante, minimizando cualquier otro factor que pueda influir sobre él.

Aceite virgen II

Del gráfico nº 5 y del apartado correspondiente de la tabla III se deduce que:

En este aceite, al igual que ocurre en el virgen I, todas las muestras conservadas en envases transparentes expuestos a la luz, presentan diferencias, estadísticamente muy significativas al compararlas con el patrón, a lo largo de todo el ensayo.

La diferencia con la muestra envasada en hojalata no se hace muy significativa hasta el segundo desmuestre, conservando esta significación hasta el final del ensayo.

Entre las muestras envasadas en hojalata y las conservadas en PVC I y PVC II, en el desmuestre realizado a los 50 días de iniciado el ensayo, aparecen diferencias muy significativas, pero en los posteriores se pierde todo grado de significación. Analizando el comportamiento de estas muestras, en el gráfico nº 5, volvemos a encontrar que la causa que lo determina es la diferente velocidad a que

evolucionan las transformaciones de los compuestos que constituyen el aroma del aceite, pues como se puede observar, mientras que en las muestras envasadas en PVC I y PVC II las transformaciones tienen lugar rápidamente, estabilizándose a partir de los 100 días de almacenamiento, el aroma del aceite envasado en hojalata se transforma lentamente, hasta alcanzar una diferencia, con respecto al patrón de magnitud análoga a las anteriores.

Las muestras envasadas en hojalata, presentan a lo largo de todo el ensayo, diferencias estadísticamente muy significativas al compararlas con las conservadas en vidrio y polietileno.

Las pequeñas diferencias apreciadas por el panel de catadores, entre las muestras envasadas en PVC I y PVC II, a lo largo de toda la experiencia, carecen de significación estadística. Por el contrario cuando ambas muestras se comparan con las envasadas en vidrio y polietileno, adquieren diferencias estadísticamente muy significativas. En esta comparación hay que hacer la salvedad, de que, en el desmuestre realizado a los 50 días, la diferencia entre las muestras envasadas en PVC II y vidrio es sólo significativa.

Entre las muestras envasadas en vidrio y polietileno, sólo se aprecian diferencias significativas en el primer desmuestre, pero en los posteriores desaparece esta significación.

Efectuando una visión conjunta de los comentarios realizados con las muestras de aceite virgen II, almacenadas tanto a la luz como en la oscuridad, podemos concluir, al igual que en el aceite virgen I, que la luz, junto con las características del material del envase, son los factores que más influyen sobre las transformaciones que sufre el aroma original de un aceite envasado.

Por último, en estos aceites virgenes envasados, uno de los hechos que más nos llama la atención, es el comportamiento organoléptico de las muestras envasadas en hojalata, ya que por las características del envase podía preverse un estado de conservación, destacadamente más satisfactorio; pero antes los resultados que se iban obteniendo en las determinaciones realizadas, se consultó a los catadores para que intentasen definir las características aromáticas de los aceites envasados en este material, en relación a las de la muestra patrón. Los catadores nos indicaron una diferencia claramente sensible a favor del patrón, y nos especificaron que en los aceites envasados en hojalata se desarrollaba un olor extraño, que algunos calificaban como "olor a pepino". Igualmente nos aclararon, que el no poder establecer diferencias a partir de la segunda determinación entre las muestras envasadas en PVC I, PVC II y hojalata conservadas a la luz, se debía a que las diferencias de cada una con respecto al patrón eran de una magnitud

similar, pero en cuanto a características de cada aroma, éstas eran diferentes, pues mientras que en la muestra envasadas en hojalata se desarrollaba un olor a pepino, en las conservadas en PVC I y PVC II el aroma recordaba el olor a hierba u hojas verdes.

Aceite rivierra.

En el gráfico nº 3 se han representado las diferencias organolépticas, que el panel de catadores ha encontrado, entre las muestras del aceite rivierra, almacenadas en los diferentes envases, que se han conservado en la oscuridad. En la Tabla II, en su apartado correspondiente, se dan las significaciones estadísticas de estas diferencias, en ellas se observa que:

Dentro de los 100 primeros días de almacenamiento, no se aprecian diferencias organolépticas, estadísticamente significativas, entre el patrón y las restantes muestras.

A partir del tercer desmuestre (150 días), las diferencias entre la muestra patrón y las envasadas en vidrio y polietileno, se hacen estadísticamente muy significativas ($P < 0,01$) manteniendo este grado de significación hasta el final del ensayo.

Las diferencias entre la muestra patrón y la envasada en PVC I, solo adquieren significación estadística ($P < 0,05$) al final del ensayo (225 días), mientras que con la envasada

en PVC II, en el tercer desmuestre se hace significativa y en el siguiente pasa a muy significativa.

Al hacer las comparaciones, entre las muestras que han estado sometidas a las condiciones del ensayo, observamos que hasta los 150 días de iniciado éste, no se aprecian diferencias significativas; pero a partir de esta tercera determinación, entre las muestras envasadas en vidrio y las conservadas en PVC I y PVC II, aparecen diferencias muy significativas, manteniéndose éste grado de significación hasta el final del ensayo. Cuando se compara la muestra conservada en vidrio con la envasada en polietileno, aparece diferencia muy significativa sólo en el tercer desmuestre, pero posteriormente esta significación se pierde, al empeorar más rápidamente el aceite envasado en polietileno.

Entre las muestras conservadas en cloruro de polivinilo, no se aprecian diferencias significativas, a lo largo de todo el ensayo. La muestra envasada en PVC I, a los 150 días de iniciado el almacenamiento, adquiere diferencias significativas con respecto a la envasada en polietileno, y en el desmuestre siguiente, ésta diferencia pasa a ser muy significativa. Por último, entre las muestras envasadas en PVC II y polietileno, a lo largo de todo el ensayo, no se aprecia significación estadística en sus diferencias; a pesar de esto, los valores representados en el gráfico nº 3 parecen indicar que el aceite envasado en PVC II se mantie-

ne., a lo largo del ensayo, con características organolépticas más próximas al patrón.

Al contrastar estos resultados con los encontrados para las muestras del aceite virgen I, que fue el utilizado para encabezar el tipo riviera (80% refinado con 20% de virgen I), destaca en primer lugar, el hecho de que las diferencias entre las muestras de aceite riviera, sólo comienzan a ser significativas a partir del tercer desmuestre (150 días), mientras que en el aceite virgen I, las significaciones comienzan a los 100 días; pero sin embargo las significaciones son más grandes en las comparaciones entre las muestras del aceite riviera, que en las del virgen, como nos lo demuestra el hecho de tener ésta, 5 diferencias muy significativas y 8 sólo significativas, mientras que en el riviera, 8 son muy significativas y sólo 1 es significativa. (Hemos de aclarar, que estas comparaciones se han realizado sobre la base del mismo número de muestras, ya que en el virgen no existen muestras envasadas en PVC I).

Esto parece confirmar también lo expuesto en otras ocasiones, de que los aromas del aceite virgen se alteran previamente, sin depender al menos de una forma absoluta de la alteración oxidativa de los glicéridos; así parece lógico que las diferencias organolépticas sean más fácilmente perceptibles en el aceite 100% virgen que en el riviera con solo un 20% de éste. Por ello éstas comienzan a observarse en el virgen a los 100 días y a los 150 en los

aceites tipo riviera. Las alteraciones del riviera se comienzan probablemente a percibir, con mucha claridad, cuando el 20% de aceite virgen se altera y alcanza el nivel de umbral necesario para su percepción, o bien cuando además de los productos alterados aromáticos correspondientes a este 20%, tenemos los productos de degradación oxidativa provenientes del 80% de refinado.

Parece claro que la conservación del aroma se mejora cuando éste se diluye (aceite riviera) y que la base de aceite refinado sobre la que se prepara el tipo riviera, al cabo de cierto tiempo, comienza a influir sobre su aroma, desarrollando olores que alteran su carácter inicial.

Los resultados del ensayo organoléptico, realizado con las muestras del aceite riviera que se almacenaron a la luz, se han representado en el gráfico nº 6. La significación estadística, de estas diferencias, se dan en el apartado correspondiente de la tabla III, de ella podemos deducir las siguientes conclusiones:

Al igual que comentábamos en las muestras de los aceites virgenes I y II, la acción de la luz se deja notar sensiblemente, de forma que desde el primer desmuestre, ya se observan diferencias estadísticamente muy significativas, entre la muestra patrón y el resto de las muestras conservadas en los envases transparentes ensayados. Estas significaciones se mantienen hasta el final del ensayo para las

muestras envasadas en vidrio y polietileno, mientras que las envasadas en PVC I y PVC II pasan, en el segundo desmuestre, a significativas y en el siguiente vuelven a muy significativas.

El comportamiento organoléptico de las muestras envasadas en hojalata es excelente, como lo demuestra el hecho, de la incapacidad del panel de encontrar diferencias significativas con respecto al patrón, a lo largo de todo el período del almacenamiento.

Después del comentario antes realizado, resulta del todo lógico, que los resultados de las comparaciones de las muestras envasadas en hojalata con las restantes que han estado sometidas a las condiciones del ensayo, sean similares a los encontrados cuando se las compara con el patrón, difiriendo únicamente en la comparación de esta muestra con la envasada en vidrio, que, en el segundo desmuestre, adquiere una diferencia sólo significativa.

Las pequeñas diferencias encontradas a lo largo del ensayo, entre las muestras envasadas en PVC I, PVC II y vidrio carecen de significación estadística. Mientras que las diferencias de estas tres muestras, cuando se las comparan con las envasadas en polietileno alternan de muy significativas, en el primer y tercer desmuestre, con solo significativas en el segundo desmuestre. Pero estas oscilaciones pueden tener su explicación en la alteración del

umbral de diferencias de los catadores, de acuerdo con las oscilaciones propias introducidas por variaciones en la composición del grupo de jueces, descenso de su capacidad de diferenciación (este desmuestre corresponde al mes de enero y posiblemente algunos jueces pueden tener su capacidad olfativa disminuida) o bien porque la velocidad de desarrollo de las alteraciones aromáticas puede producirse a velocidades diferentes en las distintas muestras, como ya hemos comentado en otra ocasión.

Comparando el comportamiento del aceite rivierra con los aceites vírgenes estudiados, observamos algunas diferencias notables que son dignas de hacerse resaltar.

En primer lugar queremos destacar el comportamiento del aceite envasado en hojalata que, mientras para el aceite rivierra no se diferencia de la muestra patrón, a lo largo de todo el período de almacenamiento, en las muestras de aceites vírgenes, si lo hacen, dando lugar a los aromas extraños que ya hemos comentado.

Este comportamiento diferente entre vírgenes y rivierra, envasados en hojalata creemos se debe atribuir, principalmente, a las alteraciones de los aromas naturales del aceite virgen, que se hace notar más en éstos, puesto que lo tienen en mucha mayor cantidad, que en el rivierra, a base de un 80% de refinado. No es fácil atribuir estos aromas extraños desarrollados en los aceites vírgenes a compues-

tos de oxidación (ver gráficos del I.P., E₂₃₂, E₂₇₀, Kreis etc.) ya que entre el patrón y las muestras envasadas en hojalata no se aprecian apenas diferencias, al menos observables mediante las pruebas estudiadas.

Otro punto de notable importancia, es el diferente comportamiento desde el punto de vista organoléptico, de los aceites rivierra y vírgenes, cuando se envasan en polietileno y en vidrio. Cuando los aceites vírgenes se conservan a la luz, las muestras envasadas en polietileno mantienen el aroma inicial de un modo análogo al de las muestras envasadas en vidrio, mientras que en el caso del aceite rivierra, las muestras conservadas en polietileno son clasificadas por el panel como más alteradas que en el vidrio. Este comportamiento deficiente del rivierra en polietileno, se contradice, al parecer con otros ensayos realizados en el Instituto de la Grasa de Sevilla (46), en los que organolépticamente se conservaba mejor el aceite en polietileno que en vidrio. Desgraciadamente no podemos asegurar si esta diferencia se debe a posibles variaciones en el material del envase, al aceite, a ambos, o a las condiciones de almacenamiento, pero sí es evidente que el aceite que se estudió en el trabajo citado, solo alcanzó un I.P. de unos 50 meq/Kg de oxígeno peroxídico, después de 152 días de almacenamiento, mientras que para el aceite y los envases actuales, una subida cuantitativa semejante a la anterior se alcanza ya a

a los 50 días de almacenamiento. Todo ello parece contribuir a la hipótesis ya mencionada anteriormente, de que en el rinviera los procesos oxidativos de degradación del 80% de refinado, tienen una marcada influencia sobre el aroma de los aceites envasados de este tipo. En apoyo de esta hipótesis puede aducirse el caso de conservación de este mismo aceite en la oscuridad, donde incluso después de los 225 días de almacenamiento, el I.P. se mantiene por debajo de 30 meq/Kg de oxígeno peroxídico.

Es evidente que en los envases de polietileno, tiene una enorme importancia la densidad del polímero. Los envases hechos a base de polímeros de baja densidad, o aquellos en que la proporción de la mezcla de alta y baja densidad se inclina mucho hacia esta última, son necesariamente peores envases para el aceite de oliva(46).

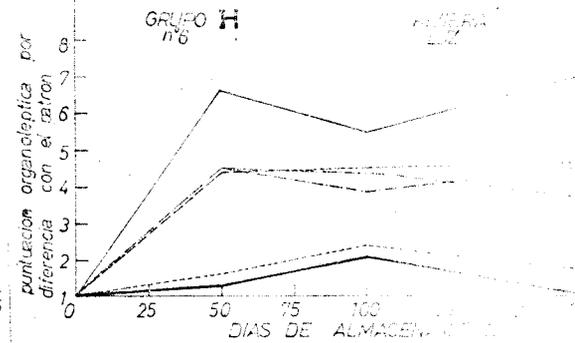
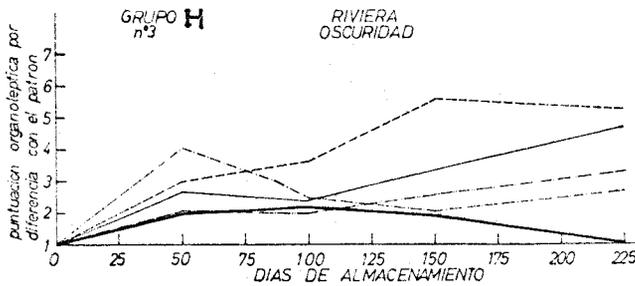
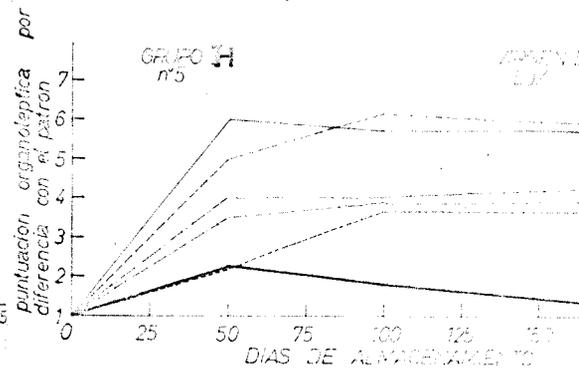
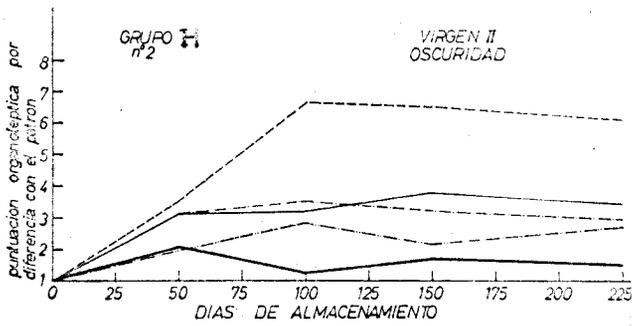
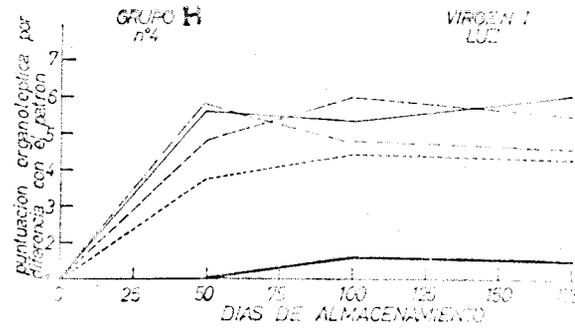
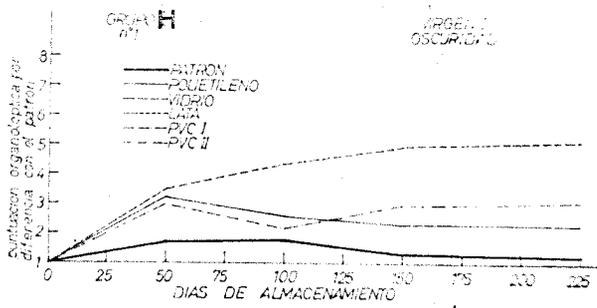


TABLA II

ALMACENAMIENTO EN LA OSCURIDAD

VIRGEN I

Días	PATRON				PVC II				VIDRIO				POLIETILENO			
	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225
PATRON	-	-	+	+	-	-	+	+	-	++	++	++	-	-	+	+
PVC II	-	-	+	+	-	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-
VIDRIO	-	++	++	++	-	++	+	+	-	-	-	-	-	++	+	+
POLIETILENO	-	-	+	+	-	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-

VIRGEN II

Días	PATRON				PVC I				PVC II				VIDRIO				POLIETILENO			
	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225
PATRON	-	++	++	++	-	++	++	++	-	++	+	+	-	++	++	++	-	++	++	++
PVC I	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-
PVC II	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	++	-
VIDRIO	-	++	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++
POLIETILENO	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++	++	-	-	-	-

RIVIERA

Días	PATRON				PVC I				PVC II				VIDRIO				POLIETILENO			
	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225	50	100	150	225
PATRON	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	++	++	-	-	++	++
PVC I	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	+	++
PVC II	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
VIDRIO	-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	++	-
POLIETILENO	-	-	++	++	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-

SIGNIFICACION ESTADISTICA

TABLA III

ALMACENAMIENTO A LA LUZ

VIRGEN I

Dias	PATRON			HOJALATA			PVC II			VIDRIO			POLIETILENO		
	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175
PATRON				+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
HOJALATA	+	++	++				+	-	-	-	+	+	+	+	+
PVC II	++	++	++	+	-	-				-	-	-	-	-	+
VIDRIO	++	++	++	-	+	+	-	-	-				-	-	-
POLIETILENO	++	++	++	+	+	+	-	-	+	-	-	-			

VIRGEN II

Dias	PATRON			HOJALATA			PVC I			PVC II			VIDRIO			POLIETILENO		
	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175
PATRON				-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
HOJALATA	-	++	++				++	-	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++
PVC I	++	++	++	++	-	-				-	-	-	++	++	++	++	++	++
PVC II	++	++	++	++	-	-	-	-	-				+	++	++	++	++	++
VIDRIO	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++				+	-	-
POLIETILENO	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-			

RIVIERA

Dias	PATRON			HOJALATA			PVC I			PVC II			VIDRIO			POLIETILENO		
	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175	50	100	175
PATRON				-	-	-	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
HOJALATA	-	-	-				++	+	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++
PVC I	++	+	++	++	+	++				-	-	-	-	-	-	++	+	++
PVC II	++	+	++	++	+	++	-	-	-				-	-	-	++	+	++
VIDRIO	++	++	++	++	+	++	-	-	-	-	-	-				++	+	++
POLIETILENO	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	++			

SIGNIFICACION ESTADISTICA

- Sin significacion + Diferencia significativo ++ Diferencia muy significativa

3.10. CORRELACION ENTRE ENSAYOS ORGANO-
LEPTICOS Y AROMAGRAMAS

3.10.1. Posibilidades de correlación entre la determinación objetiva (C.G.L.) y las respuesta sensorial (Panel organoléptico).

El "perfil" organoléptico del aroma de un alimento (114), consiste en una lista de todos los estímulos detectables, expresando con palabras descriptivas de los mismos y representados por un parámetro, mayor o menor, según el grado de su intensidad.

Para la obtención de tales perfiles, los catadores deben poseer una especial educación en este trabajo, pero además si el aroma es difícilmente descomponible sensorialmente en otros estímulos más elementales, su utilidad no parece muy grande. Otra dificultad reside en encontrar las palabras o calificativos apropiados para estos estímulos fundamentales. Frecuentemente es difícil a partir de una serie de estos perfiles, separar la muestra particular a que corresponde de otras aparentemente similares.

Por otra parte, los concentrados de aromas proporcionan aromagramas complejos que contienen bastantes picos, y la correlación entre tales cromatogramas y los llamados "perfiles del flavor" no suele ser fácil.

La composición aromática de un alimento, obtenido por la técnica del espacio de cabeza, puede proporcionar un registro gráfico o aromagrama de la composición del vapor que valora el "perfil test". Aunque los catadores respondan

a mucho más compuestos que los desmostrados en el espacio de cabeza, las diferencias entre estos cromatogramas pueden concordar muy estrechamente con las evaluaciones del "Panel".

Por ello, la técnica del espacio de cabeza, puede ser usada, en cierto número de casos, para distinguir entre calidades (108) o variedades de alimentos (122), teniendo en cuenta que un aromagrama debe ser considerado como una "fotografía instantánea" y no como la imagen permanente de la calidad aromática de un alimento, si bien esta evolución puede ser de corta o larga duración. En relación a esto último, es sabido que los olores se forman a partir de "precursores", durante la obtención o preparación de un alimento, previo a su consumo (123 a 127), cosa que también sospechamos en los aceites de oliva virgenes, ya que recién extraídos de aceitunas sanas, no excesivamente maduras, dan lugar a un olor a hoja verde que evoluciona poco a poco hacia el olor típico. Este se produce por supuesto si el aceite se obtiene de aceitunas en su justo grado de madurez.

Una importante objeción a la técnica del espacio de cabeza la constituye el hecho de que componentes de baja volatilidad, escapan más fácilmente a la detección que aquellos otros de bajo punto de ebullición (123), lo cual puede ser un grave problema para la correlación con la percepción subjetiva, ya que los diferentes compuestos pueden tener umbrales muy diferentes para la sensibilidad humana.

Se sabe, por ejemplo, que los umbrales de percepción de los aldehidos, estan comprendidos entre 1 p.p.b. y 1 p.p.m. mientras que los alcoholes varian entre 0,4 p.p.m. y 6 p.p.m. y los esteres entre 0,2 y 80 p.p.m.

Por otra parte, es conocido el hecho de que sustancias odorantes pueden presentar efectos enmascarantes, de forma que, por contraste, un componente determinado puede ser "potenciado" (125) por otro, o bien "compensado" (125) por él. De ello se deduce, que para el catador, suele tener menos valor la mayor o menor concentración absoluta de un compuesto, que las diferencias encontradas entre los componentes del conjunto, "cuyo conjunto percibe el catador dentro de los límites de un umbral de diferencias" (125).

El problema de definir y clasificar la intensidad olfativa es complicada, por la extraordinaria variedad de productos olorosos y por su cambio en intensidad y calidad con su concentración. Aunque no rigurosamente, la intensidad del olor es proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de la solución.

La respuesta de los individuos a la intensidad del olor es esencialmente la misma de acuerdo con Augh (124).

Las diferencias relativas, cuando los catadores utilizan una escala de puntos, son esencialmente las mismas, las mayores diferencias entre los jueces se observan en la

mayor o menor extensión con que ellos utilizan la escala, la localización del valor central y su habilidad de discriminación. Por todo ello, la valoración con ayuda de una escala de clasificación (125), da mucha más información en un tiempo más corto, que el procedimiento de comparaciones pareadas (125).

Timmermans (126) considera que la olfatividad esta relacionada con dos parámetros moleculares: la energía de vaporización del compuesto por unidad de volumen y su "contorno molecular". A causa de la clara relación que existe entre el peso molecular y el olor en una serie homóloga, se ha hecho un intento de correlación aproximada, considerando los siguientes compuestos alifáticos y sus intensidades olorosas.

<u>Compuestos</u>	<u>Mínimo</u>	<u>Fuerte</u>	<u>Máximo</u>
Alcoholes	C ₄	C ₈	C ₁₄
Aldehidos	C ₁	C ₁₀	C ₁₆
Cetonas	C ₈	C ₁₁	C ₁₆
Acidos	C ₁	C ₅	C ₁₄
Esteres	C ₆	C ₈	C ₁₇

Sin embargo, es evidente que en otros compuestos existen algunos parámetros tales como presión de vapor, actividad termodinámica, solubilidad, etc, que estan correlacionados con la efectividad olfativa.

3.10.2. Tratamiento matemático.-

Desde hace unos años, se observa en la bibliografía un rápido desarrollo en el tratamiento de los datos obtenidos por cromatografía, con la ayuda de ordenadores, lo que parece que ha favorecido los estudios de investigación del "flavor" de los alimentos.

En sus últimos perfeccionamientos los cromatógrafos están unidos a integradores de áreas, espectrómetros de masas y finalmente a computadoras, que ordenan y calculan los resultados, trabajando sobre una gran masa de datos.

Si existiese un sólo componente aromático, que se alterase en el aceite de oliva, sería suficiente una simple correlación entre sus concentraciones y las puntuaciones organolépticas, para definir claramente el estado de conservación del aceite, pero corrientemente las diferencias son más sutiles y generalmente debidas a diversos compuestos. Por otra parte, alimentos enjuiciados organolépticamente de forma diferente, dan a menudo cromatogramas desesperantemente iguales, de forma que se duda si las pequeñas diferencias pueden o no, ser atribuidas a la reproducibilidad de los replicados. En estas condiciones, un análisis multi-variante se hace necesario, para encontrar la significación de estas diferencias y relacionarlas con la calidad detectada sensorialmente, de acuerdo con todo lo anteriormente expuesto.

Hawkes y Wheaton (127) utilizan un procedimiento matemático-estadístico, para establecer por C.G.L., la comparación de mezclas complejas de aceites esenciales de piper-mint, así como para identificar su procedencia, realizando los cálculos necesarios en un computador IBM.

Powers (128) utiliza para el análisis de los datos procedentes de las técnicas cromatográficas (GLC) el análisis discriminante, revisando el clásico problema de Fischer (129) establecido por primera vez en 1936. Posteriormente Young (130) utiliza el mismo análisis discriminante para la evaluación de mezclas de Pepsi y Coca-Colas a partir de sus aromagramas, mientras que Milutinovic Leposava (131) utiliza similar tratamiento estadístico de los datos cromatográficos para estudiar y comparar el flavor de los volátiles de tomates y cacahuates.

Al parecer la técnica del tratamiento matemático por el análisis discriminante es uno de los caminos más lógicos usados; por ello lo hemos elegido también para el presente estudio.

3.10.2.1. Descripción del fundamento matemático del análisis discriminante en su aplicación a nuestro problema.-

El análisis discriminante establecido por Fischer (129) tiene por objeto diferenciar dos poblaciones A y B, sobre la base de una serie de medidas, en cada una de las

muestras de ambas poblaciones. En nuestro caso, éstas estarán formadas por los aromagramas de las muestras de aceites envasados que se estudian.

El discriminante Z se define como una función lineal de una serie de determinaciones, capaz de separar en nuestros estudios, los aceites inalterados de los alterados.

$$\text{Así. } Z = \lambda_1 P_1 + \lambda_2 P_2 + \dots + \lambda_n P_n$$

Donde P_1, P_2, \dots, P_n son los valores de los picos correspondientes a cada uno de los aromagramas y $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ son coeficientes, que se calcularán de forma que el carácter diferenciador de la función sea el máximo posible.

Un aromagrama de un aceite de oliva está compuesto por una serie de picos, caracterizados por sus tiempos de retención y sus porcentajes de áreas respecto a la suma total de estas. Cada uno de estos picos puede considerarse como un carácter diferenciador del aromagrama. Cuando muestras de un mismo aceite de oliva se almacenan en envases de diferentes materiales, aún cuando se conservan en idénticas condiciones, sus aromas sufren transformaciones diferentes, lo que se traduce al obtener sus aromagramas, en variaciones cuali y cuantitativas en sus picos, ahora bien, no todas las variaciones son significativas, es decir no todos los picos tienen un carácter diferenciador. Se necesita, por lo

tanto establecer un criterio con el fin de determinar, que picos han sufrido transformaciones significativas y cuales no.

La obtención de un aromagrama acarrea una serie de manipulaciones, que llevan implícitos ciertos errores producidos al azar. En consecuencia un aromagrama "medio" sera el resultado de una serie de ellos, lo que además nos permite calcular la varianza de cada pico. En estas condiciones, es posible establecer una prueba de significación entre picos, de idéntico tiempo de retención, de dos muestras que hayan sufrido transformaciones diferentes. El límite de significación que se ha tomado en nuestro estudio es del 5% y en él se determinan los picos que han sufrido una transformación significativa, siendo éstos los que nos sirvan para establecer la función de discriminación.

Una vez determinados los parámetros que van a intervenir en la función, el problema se centra en la determinación de los coeficientes.

Llamemos a las muestras de un aceite conservado en perfectas condiciones A y a las muestras alteradas B, y obtengamos los aromagramas correspondientes a ambas, los cuales estaran compuestos por los picos $P_{A1}, P_{A2} \dots P_{An}$ y $P_{B1}, P_{B2} \dots P_{Bn}$, donde los subíndices A y B caracterizan las muestras y los números 1, 2 n, corresponden a picos de igual tiempo de retención en ambas muestras.

Como hemos dicho, los valores de $\lambda_1, \lambda_2 \dots \lambda_n$, han de buscarse de forma que minimicen el error de clasificación de A frente a B, cuando se emplea Z como medio de discriminación.

Se puede designar por \bar{Z}_A el valor de Z para el aceite A y por \bar{Z}_B el correspondiente a Z del aceite B. La diferencia entre \bar{Z}_A y \bar{Z}_B la llamaremos D.

$$\text{Entonces: } \bar{Z}_A = \lambda_1 \bar{P}_{A1} + \lambda_2 \bar{P}_{A2} + \dots + \lambda_n \bar{P}_{An}$$

$$\bar{Z}_B = \lambda_1 \bar{P}_{B1} + \lambda_2 \bar{P}_{B2} + \dots + \lambda_n \bar{P}_{Bn}$$

$$\text{y } D = \lambda_1 d_1 + \lambda_2 d_2 + \dots + \lambda_n d_n$$

$$\text{donde } d_1 = \bar{P}_{A1} - \bar{P}_{B1} ; d_2 = \bar{P}_{A2} - \bar{P}_{B2} ; d_n = \bar{P}_{An} - \bar{P}_{Bn}$$

Hemos dicho que los coeficientes $\lambda_1, \lambda_2 \dots \lambda_n$ son constantes, cuyos valores se determinan de manera que el discriminante Z, de las dos clases investigadas, los diferencie lo más posible. Es decir, que aún cuando en las dos clases (aceites alterados o no alterados) las distribuciones de algunos, o todos los valores de P_i , se superpongan parcial o completamente, las distribuciones de Z no se deben superponer absolutamente nada o como mucho, en una medida que no entorpezca la seguridad de la clasificación. La superposición de los valores de Z es tanto menor cuanto mayor es la diferencia de sus valores medios, (que hemos llamado D) y

cuanto menor es la varianza de cada una de las dos poblaciones. Las dos exigencias se pueden formular matemáticamente por la expresión

$$\frac{D^2}{V_A + V_B}$$

donde V_A y V_B son las sumas de los cuadrados de las desviaciones de ambas clases de aceites.

Dicha expresión depende de los coeficientes $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$. Para calcular el valor máximo de dicha expresión, habrá que derivar parcialmente con respecto a $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ e igualar a cero, obteniéndose de esta manera, el siguiente sistema donde las incógnitas son los referidos coeficientes.

$$\begin{aligned} q_{11} \lambda_1 + q_{12} \lambda_2 + \dots + q_{1n} \lambda_n &= d_1 \\ q_{21} \lambda_1 + q_{22} \lambda_2 + \dots + q_{2n} \lambda_n &= d_2 \\ \vdots & \\ q_{n1} \lambda_1 + q_{n2} \lambda_2 + \dots + q_{nn} \lambda_n &= d_n \end{aligned}$$

donde $q_{ij} = \sum (P_i - \bar{P}_i)(P_j - \bar{P}_j)$ obtenidos los coeficientes tenemos determinada la función de discriminación Z .

Conviene sin embargo saber, si la función establecida clasifica verdaderamente o no a los aceites en una u otra clase, o dicho de otro modo, si ambas clases A y B son distintas o pertenecen a una única población.

La clasificación se establece del siguiente modo:

Con la función de discriminación se calculan los valores correspondientes a Z en la clase A y lo mismo a la clase B, se calculan las medias de ambas clases \bar{Z}_A y \bar{Z}_B . El valor medio de ambas medias Z_M , será el límite que nos separe ambas clases, una prueba de significación entre esta Z_M y una cualquiera de las otras, nos dará la probabilidad de mala clasificación. Como es lógico una probabilidad alta indica que ambas clases pertenecen a un mismo universo y una probabilidad baja, que ambas clases están perfectamente separadas.

3.10.3. Plan a seguir para el estudio de la correlación propuesta.-

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, para nuestro intento de correlacionar las pruebas organolépticas, "PANEL TEST", con los perfiles de los aromagramas obtenidos por C.G.L., necesitamos tomar como base los siguientes puntos.

1º.- Disponer de los datos obtenidos por el panel sobre las diferencias organolépticas encontradas entre cada muestra y el patrón, así como de los índices químicos necesarios para poder decidir si la alteración puede ser considerada o no, como rancidez oxidativa. (Datos que ya han sido obtenidos u ordenados en la primera parte de esta Tesis).

2º.- Una vez estudiadas las técnicas cromatográficas y de concentración de volátiles y obtenidos los aromagramas de todas las muestras por triplicado, se enumerarán sus picos, de acuerdo con sus tiempos de retención y se procederá al cálculo de sus áreas, tabulando estos resultados.

3º.- Una vez que dispongamos de los datos de los apartados anteriores, se hará necesario buscar y aplicar a ellos, el tratamiento matemático adecuado, para comparar los resultados de ambos métodos.

3.10.4. Muestras elegidas para este estudio.-

Para el estudio de posibles correlaciones entre pruebas sensoriales (panel organoléptico) y cromatografía gaseosa de los aromas, se han tomado las muestras del séptimo desmuestre, que estuvieron 175 días expuestas a la luz, ya que por los resultados de las pruebas químicas y de los ensayos organolépticos consideramos que presentan unas características suficientemente diferenciadas, muy idónea para someterlas a este estudio.

A continuación, en los apartados 3.10.4.1. y 2 , recogemos el estado de sus índices químicos más característicos, así como el resultado de los análisis organolépticos. Estos datos que ya han sido expuestos para cada una de las muestras en apartados anteriores, hemos considerado intere-

sante volverlos a reseñar ya que pensamos que pueden facilitar cualquier consulta sobre dichas muestras.

3.10.4.1. Índices químicos de las muestras.-

Las características químicas que presentan las distintas muestras, después de 175 días de almacenamiento, quedan resumidas en la tabla IV.

A la vista de estos resultados, las únicas muestras que pueden catalogarse como rancias, tanto en el aceite virgen II, como en el tipo riviera, son las envasadas en polietileno. En las restantes muestras, aunque se observan algunas variaciones en los índices determinados, estas no parecen ser importantes, desde el punto de vista de su alteración oxidativa.

TABLA IV

Aceite Virgen I

<u>MUESTRA</u>	<u>I.P.</u>	<u>E₂₇₀^{nm.}</u>	<u>A.O.M.</u>	<u>Tocof. mas mat. reductoras de $\frac{Fe^{++}}{Fe^{+++}}$</u>
Patrón	11,2	0,15	22h. 15 min.	476
Hojalata	9,8	0,18	22h. 15 min.	455
PVC	8,0	0,29	15h. 10 min.	312
Vidrio	3,2	0,39	13h. 30 min.	270

Aceite Virgen II

Patrón	11,5	0,16	16h. 5 min.	322
Hojalata	10,3	0,16	16h. 5 min.	313
PVC	9,9	0,24	12h. 5 min.	276
Vidrio	7,3	0,25	9h. 15 min.	256
Polietileno	10,5	0,32	2h. 15 min.	101

Aceite rivierra

Patrón	5,2	0,52	20h. 45 min.	303
Hojalata	5,2	0,55	20h. 45 min.	208
PVC	3,6	0,51	16h. 5 min.	185
Vidrio	1,0	0,51	11h. 36 min.	185
Polietileno	9,5	0,46	0h. 55 min.	58

NOTA: En el aceite virgen I no existe muestra envasada en polietileno, ya que accidentalmente se perdió antes de realizar su aromagrama.

3.10.4.2. Pruebas organolépticas de diferencias con el patrón.-

En la tabla V se dan los resultados de los ensayos organolépticos. La puntuación con que aparece cada muestra, es la media de los valores dados por todos los catadores, y expresa su diferencia con respecto al patrón. El asterisco o asteriscos que acompañan a cada puntuación, indica el grado de significación estadística de dichas diferencias.

TABLA V

ACEITE	VIRGEN I		VIRGEN II		RIVIERA	
<u>Comparación</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Sig.</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Sig.</u>	<u>Puntuación</u>	<u>Sig.</u>
Patrón-Hojal.	4,6	+ +	5,4	+ +	1,7	=
Patrón-PVC	3,7	+	2,6	+	3,7	+
Patrón-Vidrio	4,6	+ +	5,9	+ +	4,6	+ +
Patrón-Poliet.	-	-	5,7	+ +	7,3	+ +

= Sin diferencia significativa

+ Diferencia significativa ($P < 0,05$)

+ + Diferencia significativa ($P < 0,01$)

Como puede observarse los catadores encuentran las mayores diferencias, dentro de cada grupo de aceite, entre el patrón y las muestras envasadas en vidrio y polietileno..

De los valores obtenidos para las muestras conservadas en PVC, se deduce, que las alteraciones producidas deben ser menores a las experimentadas por las anteriores.

En las muestras de aceites virgenes, envasados en hojalata, se observa que los catadores acusaban diferencias, con respecto al patrón, de magnitud similar a las conservadas en vidrio y polietileno, aunque con características aromáticas diferentes, ya que cuando se les pedía que definiesen en que basaban estas diferencias, ellos indicaban que el aceite envasado en hojalata les olía a "pepino", mientras que las muestras conservadas en vidrio y PVC eran catalogadas como: "un olor que recuerda a hierba fresca"; finalmente el aceite envasado en polietileno era calificado como: "algo rancio".

Por último las muestras de aceite tipo rivierra conservadas en hojalata, mantienen su aroma inicial inalterado hasta el fin del ensayo. La razón de dicho comportamiento, parece encontrarse en la dilución de los componentes aromáticos del aceite virgen en el resto de aceite refinado, de forma que las alteraciones que se pueden producir en los aromas de aquella fracción, quedan diluidos, o bien sus concentraciones no alcanzan los umbrales de sensibilidad necesarios.

3.10.4.3. Aromagrama de las muestras.-

Como antes hemos apuntado, nuestro deseo de estudiar por un método más objetivo, las alteraciones aromáticas de los aceites de oliva envasados, nos llevó a aplicar las técnicas de cromatografía gaseosa, a las muestras ya estudiadas por el panel de catadores.

Con ayuda de las técnicas de concentración de aroma y cromatografía ya expuestas, se obtuvieron tres replicados de cada muestra. Como puede verse en los cromatogramas correspondientes (fig. I) de los aceites virgen I, II y rivierra, los picos parecen numerados de izquierda a derecha, de forma que los números dados se correlacionan con los iguales tiempos de retención, entre las distintas muestras correspondientes al mismo tipo de aceite.

Dado que en el desarrollo de un aromagrama, no todos los picos quedaban dentro de la carta del registrador, hubo que cambiar en muchos casos la atenuación del detector lo que impide, a simple vista, hacerse una idea exacta de las variaciones cuantitativas sufridas por los componentes aromáticos de las distintas muestras. Por ello, para facilitar esta comparación, al calcular sus áreas absolutas, por el método de triangulación, éstas se refirieron a una misma atenuación.

Anteriormente, cuando hemos descrito el procedimiento de concentración de volátiles y la técnica de inyección seguida en nuestro trabajo, apuntábamos la dificultad de introducir en el cromatógrafo cantidades de muestra exactamente conocidas, lo que da lugar a aromagramas de distinta riqueza. Con el fin de homogeneizar en los cromatogramas obtenidos las áreas de cada uno de los picos registrados, éstas se han referido al porcentaje total de ellas. De este modo el total de las áreas de los picos de cualquier aromagrama sumará cien y será posible comparar las variaciones relativas entre los componentes aromáticos de cada muestra.

Los mencionados porcentajes de áreas, correspondientes a cada pico, calculados sobre los replicados de los aceites virgen I, virgen II, y rivierra, se recogen en las tablas VI, VII, VIII respectivamente, en las que aparecen también los valores medios y sus respectivas varianzas (S^2).

Cada uno de los picos que constituyen un aromagrama puede considerarse como un componente característico del mismo, pero al comparar los aromagramas de dos muestras entre sí, puede ocurrir que no todos los picos de éstos posean efectivamente, desde el punto de vista de apreciación objetiva, ese carácter diferenciador, al menos con la misma intensidad; por ello parece necesario establecer, que picos son

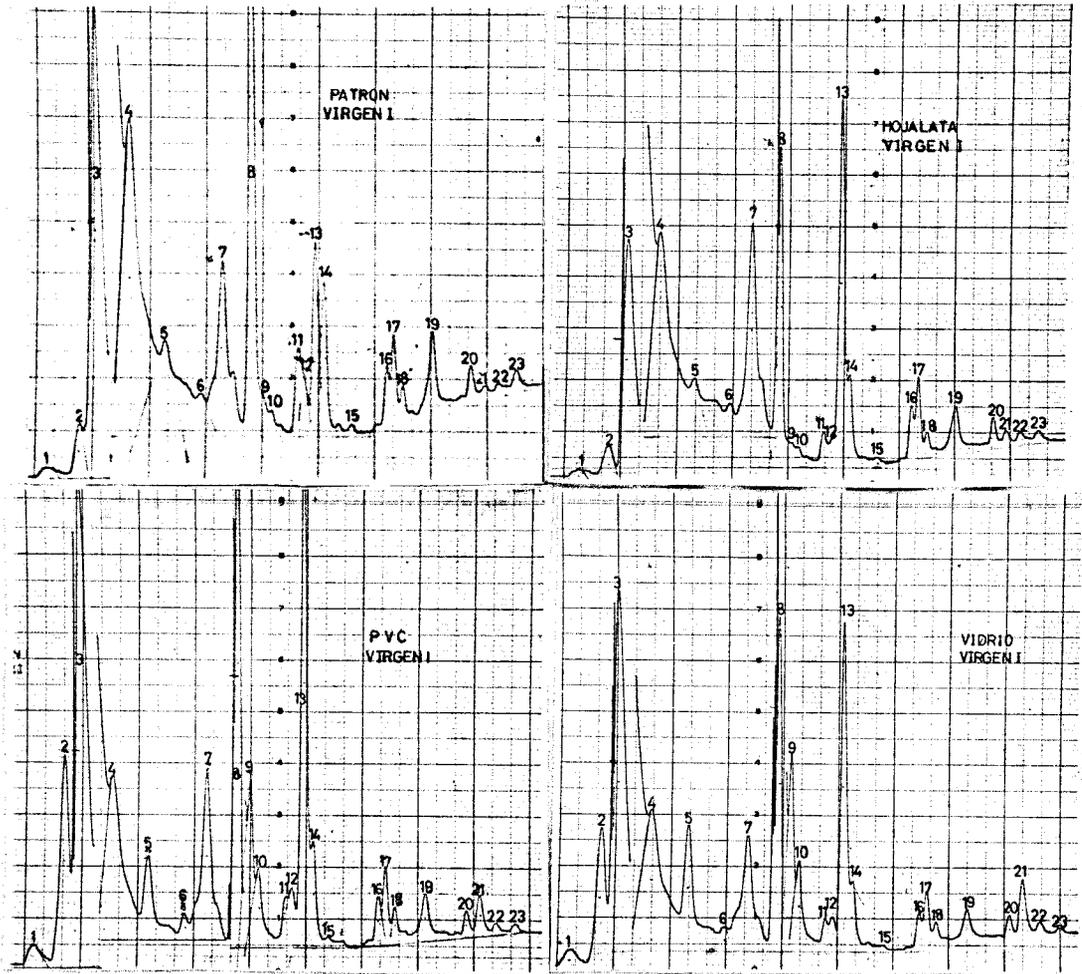


FIG. I

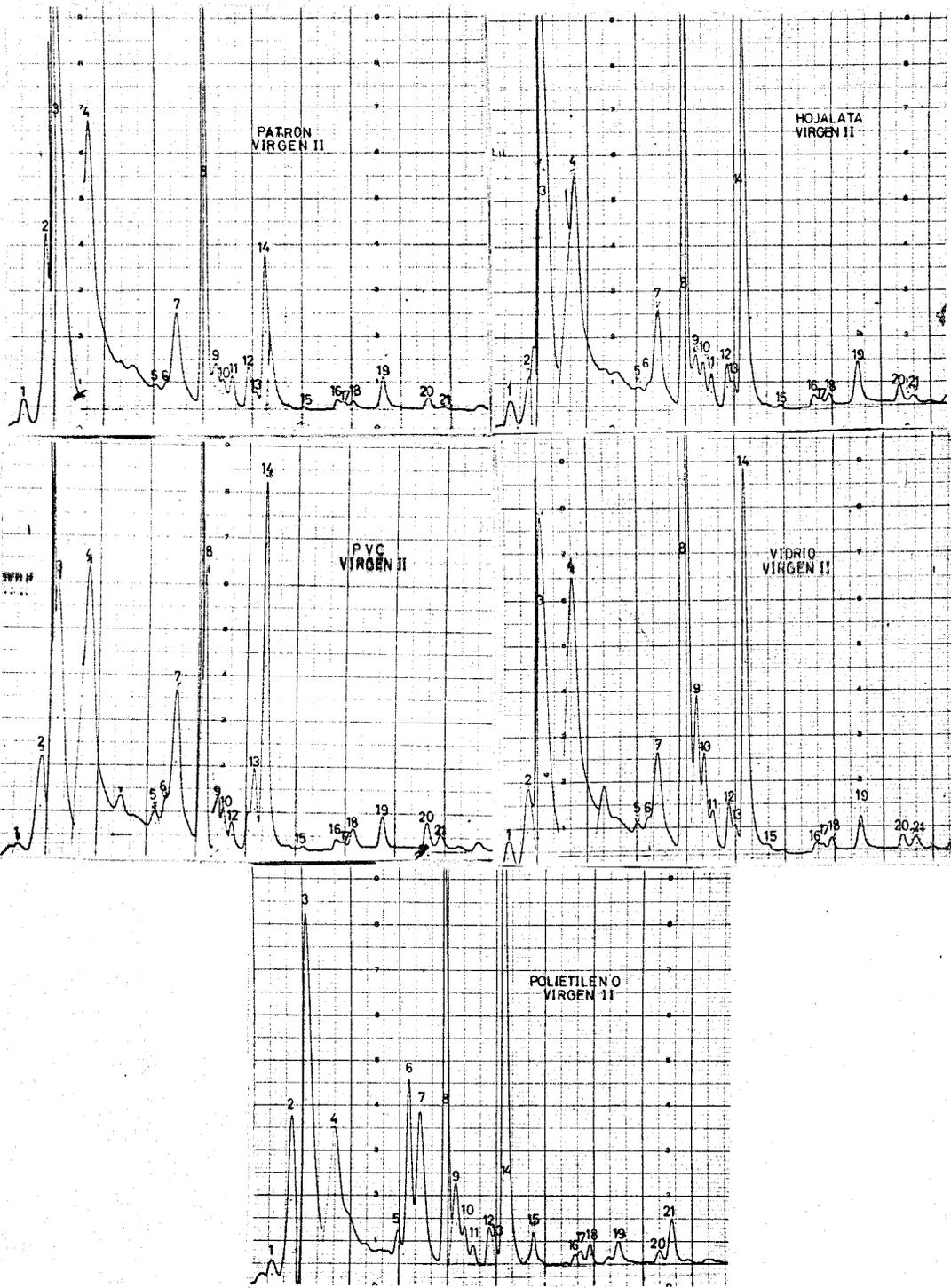


FIG. I

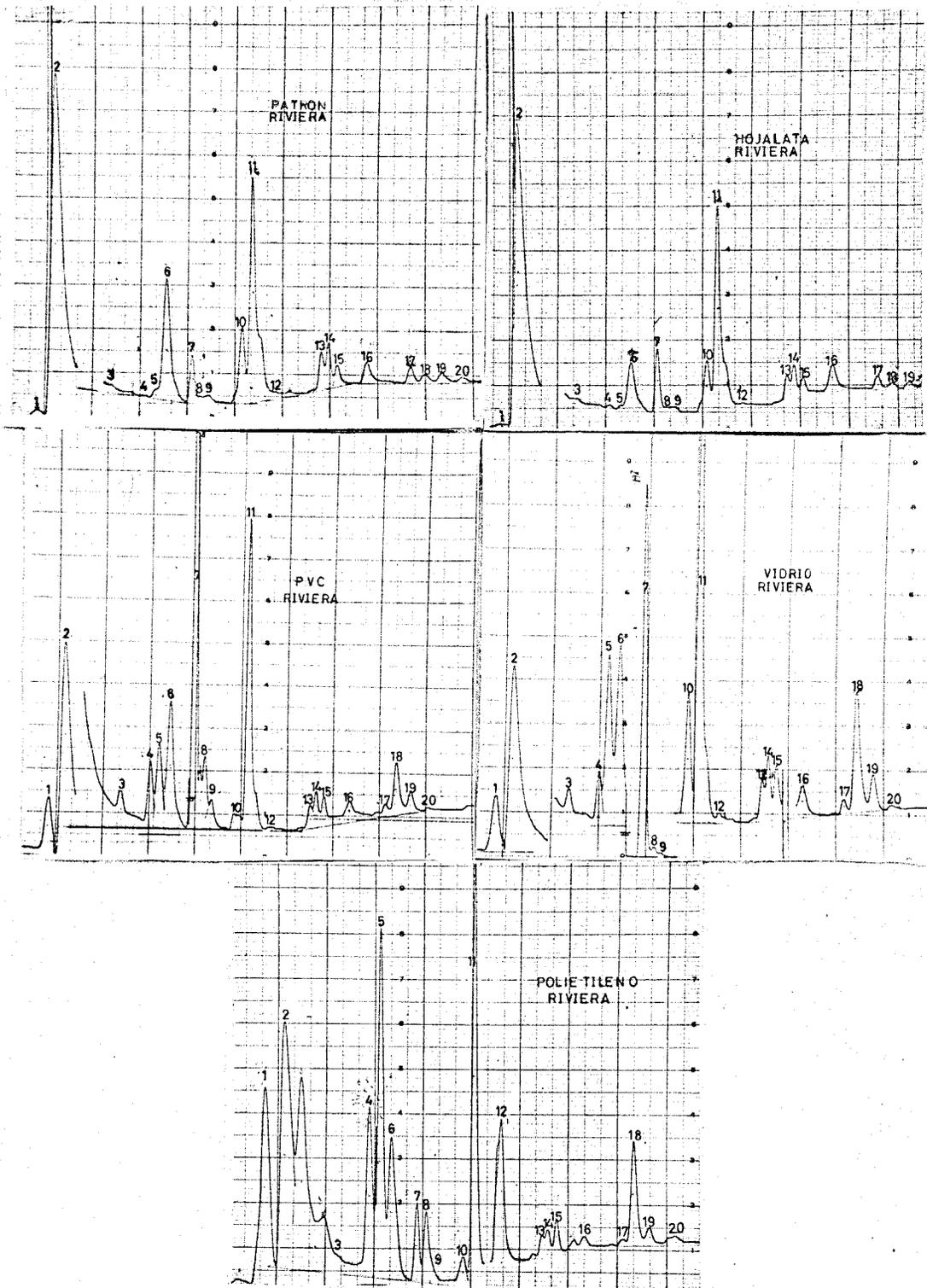


FIG. I

son los que contribuyen más efectivamente a establecer determinadas diferencias organolépticas.

Para estudiar este punto se ha recurrido a una prueba de significación estadística, comparando, dentro de un mismo aceite, los valores medios de las áreas de cada pico de la muestra patrón, con los correspondientes de los aromagramas de las otras muestras. La prueba que nos permite establecer diferencias entre medias es "t" de Student.

$$t = \frac{M_A - M_B}{\sqrt{S_A^2 + S_B^2}} \sqrt{n}$$

donde M son las medias del mismo pico en los distintos aromagramas (A,B), S^2 sus respectivas varianzas y n el número de replicados.

Los resultados de esta comparación se muestran en la tabla IX,X,XI.

En las diferentes comparaciones realizadas entre el Patrón y las restantes muestras del aceite virgen I, tabla IX, se aprecian un mínimo de cinco picos con diferencia significativa, lo que parece justificar los resultados del panel de catadores. Si observamos detenidamente los picos significativos dentro de estas comparaciones, se aprecia que

TABLA - VI

Aceite virgen I

MUESTRA PATRON

<u>Pico</u>	<u>REPLICADO</u>			<u>MEDIA</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,29	0,27	0,22	0,26	0,0013
2	0,87	1,40	3,13	1,80	1,3969
3	61,63	67,67	75,30	68,20	46,9279
4	8,25	9,21	6,08	7,85	2,4928
5	3,57	3,49	1,91	2,99	0,8764
6	1,11	1,33	0,61	1,02	0,1260
7	6,56	2,59	2,14	3,77	5,8413
8	6,20	4,28	2,46	4,31	3,5409
9	0,39	0,41	0,12	0,30	0,0323
10	0,24	0,31	0,09	0,21	0,0148
11	1,58	0,60	0,34	0,84	0,4276
12	0,81	0,57	0,22	0,54	0,0773
13	1,91	2,48	2,30	2,23	0,0849
14	2,02	1,70	1,61	1,78	0,0465
15	0,16	0,12	0,11	0,13	0,0007
16	0,72	0,77	0,62	0,70	0,0129
17	1,06	0,85	0,65	0,86	0,0249
18	0,38	0,03	0,31	0,24	0,0343
19	0,97	0,85	0,93	0,91	0,0220
20	0,46	0,51	0,38	0,45	0,0043
21	0,20	0,19	0,15	0,18	0,0007
22	0,26	0,15	0,11	0,17	0,0078
23	0,36	0,22	0,21	0,26	0,0097

TABLA-VI

Aceite virgen I

MUESTRA HOJALATA

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,10	0,35	0,44	0,30	0,0281
2	0,63	1,07	1,32	1,01	0,1120
3	58,23	48,24	49,82	52,10	28,3165
4	4,89	7,16	7,45	6,50	1,9651
5	0,37	2,47	2,42	1,75	1,4534
6	0,14	0,60	0,76	0,50	0,1036
7	4,56	4,34	4,65	4,52	0,0198
8	5,19	8,70	6,74	6,88	3,0253
9	0,88	0,55	0,63	0,69	0,0228
10	0,24	0,45	0,48	0,39	0,0171
11	0,73	1,28	1,21	1,07	0,1004
12	0,92	1,30	1,40	1,21	0,0521
13	7,32	10,08	10,22	9,21	2,5825
14	7,08	4,10	2,83	4,67	4,7593
15	0,23	0,32	0,36	0,30	0,0075
16	1,72	1,80	1,70	1,74	0,0028
17	1,54	1,90	2,30	1,91	0,1637
18	0,66	0,60	0,68	0,64	0,0146
19	2,12	1,89	1,85	1,96	0,0408
20	0,75	1,04	0,99	0,93	0,0148
21	0,70	0,56	0,68	0,64	0,0486
22	0,51	0,60	0,51	0,54	0,0027
23	0,49	0,60	0,56	0,55	0,0031

TABLA- VI

Aceite virgen I

MUESTRA PVC

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,54	0,22	0,40	0,39	0,0219
2	2,94	1,62	1,68	2,08	0,5556
3	43,16	33,00	35,92	37,36	27,3616
4	5,16	3,52	4,34	4,34	0,6724
5	1,37	1,16	1,51	1,35	0,0176
6	0,34	0,35	0,44	0,37	0,0105
7	1,85	2,32	2,56	2,24	0,1529
8	34,05	42,39	38,99	38,48	17,2018
9	1,38	2,32	2,28	1,99	0,3025
10	0,83	1,22	1,10	1,05	0,0399
11	0,36	0,62	0,82	0,60	0,0532
12	0,39	1,13	0,82	0,78	0,1381
13	4,05	4,92	4,54	4,50	0,2353
14	1,18	2,12	1,65	1,65	0,2209
15	0,05	0,05	0,07	0,06	0,0002
16	0,38	0,48	0,49	0,45	0,0037
17	0,48	0,72	0,63	0,61	0,0147
18	0,20	0,34	0,29	0,28	0,0023
19	0,44	0,59	0,57	0,53	0,0120
20	0,25	0,24	0,23	0,24	0,0001
21	0,39	0,44	0,48	0,44	0,0020
22	0,11	0,12	0,11	0,11	0,0001
23	0,10	0,11	0,08	0,10	0,0003

TABLA- VI

Aceite virgen I

MUESTRA VIDRIO

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,16	0,28	0,17	0,20	0,0065
2	0,98	1,11	1,98	1,36	0,2821
3	23,39	26,48	30,97	26,95	14,2580
4	4,37	4,05	3,32	3,91	0,3288
5	1,74	1,80	1,43	1,66	0,0229
6	0,33	0,30	0,19	0,27	0,0082
7	1,73	1,83	1,83	1,80	0,0034
8	54,31	51,70	49,86	51,96	4,4805
9	2,80	2,50	1,68	2,32	0,3826
10	1,23	1,29	1,02	1,18	0,0201
11	0,54	0,53	0,60	0,56	0,0015
12	0,69	0,50	0,41	0,53	0,0205
13	3,24	3,16	2,58	2,99	0,1597
14	1,15	1,12	0,76	1,01	0,0471
15	0,05	0,07	0,05	0,06	0,0002
16	0,48	0,47	0,44	0,46	0,0005
17	0,59	0,54	0,59	0,57	0,0009
18	0,28	0,29	0,28	0,28	0,0001
19	0,54	0,56	0,50	0,54	0,0010
20	0,30	0,33	0,27	0,30	0,0009
21	0,67	0,76	0,73	0,72	0,0021
22	0,26	0,22	0,22	0,23	0,0006
23	0,17	0,11	0,12	0,14	0,0011

TABLA- VII

Aceite virgen II

MUESTRA PATRON

Pico	Replicado			Media	s ²
	I	II	III		
1	1,20	2,08	1,21	1,50	0,2553
2	0,21	0,50	0,21	0,31	0,0281
3	60,92	56,38	66,21	61,17	24,2041
4	16,45	19,00	11,58	15,68	14,2127
5	0,46	0,40	0,99	0,61	0,1055
6	0,42	0,60	0,94	0,65	0,0698
7	4,18	2,60	3,54	3,44	0,6316
8	8,01	10,00	8,67	8,89	1,0275
9	1,56	1,69	0,71	1,32	0,2833
10	1,48	1,33	0,77	1,19	0,1401
11	0,96	0,81	0,94	0,90	0,0067
12	0,80	0,66	0,58	0,68	0,0124
13	0,32	0,15	0,12	0,20	0,0117
14	1,43	1,93	2,03	1,80	0,1034
15	0,20	0,16	0,08	0,15	0,0038
16	0,28	0,32	0,16	0,25	0,0070
17	0,28	0,22	0,12	0,21	0,0066
18	0,28	0,16	0,16	0,20	0,0048
19	0,38	0,73	0,66	0,59	0,0343
20	0,14	0,24	0,24	0,21	0,0034
21	0,04	0,04	0,08	0,05	0,0006

TABLA- VII

Aceite virgen II

MUESTRA HOJALATA

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,49	0,61	0,40	0,50	0,0111
2	1,13	1,38	1,50	1,34	0,0357
3	70,54	69,96	61,45	67,32	25,8975
4	11,05	11,80	11,30	11,38	0,1459
5	0,22	0,22	0,33	0,26	0,0041
6	0,28	0,22	0,41	0,30	0,0095
7	1,81	2,01	2,84	2,22	0,2983
8	5,78	6,05	7,95	6,59	1,3987
9	0,81	0,82	1,77	1,13	0,3041
10	0,69	0,51	1,19	0,80	0,1242
11	0,41	0,42	0,77	0,54	0,0421
12	0,53	0,44	0,98	0,65	0,0837
13	1,05	0,44	0,58	0,69	0,1041
14	3,89	3,87	5,65	4,47	1,0444
15	0,03	0,07	0,06	0,05	0,0005
16	0,15	0,18	0,29	0,21	0,0055
17	0,22	0,16	0,20	0,19	0,0010
18	0,19	0,18	0,33	0,23	0,0071
19	0,54	0,52	1,41	0,83	0,2583
20	0,15	0,03	0,37	0,18	0,0298
21	0,04	0,11	0,22	0,12	0,0083

TABLA-VII

Aceite virgen II

MUESTRA PVC

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>s²</u>
	I	II	III		
1	0,09	0,14	0,15	0,13	0,0011
2	0,95	1,06	1,00	1,00	0,0031
3	52,20	51,19	41,28	48,22	36,4125
4	7,31	6,63	8,99	7,64	1,4758
5	0,41	0,46	0,93	0,60	0,0823
6	0,42	0,49	0,72	0,54	0,0247
7	2,07	2,67	2,63	2,45	0,1126
8	20,88	22,42	29,14	24,15	19,2930
9	1,29	1,69	2,53	1,84	0,4006
10	1,05	1,29	1,71	1,35	0,1116
11	0,52	0,69	0,74	0,65	0,0133
12	0,81	0,85	1,18	0,95	0,0413
13	1,78	0,64	0,68	1,03	0,4186
14	6,97	6,52	5,48	6,32	0,5841
15	0,07	0,06	0,09	0,07	0,0003
16	0,19	0,23	0,14	0,19	0,0021
17	0,15	0,18	0,14	0,16	0,0005
18	0,55	0,46	0,37	0,46	0,0081
19	0,79	0,91	0,84	0,85	0,0037
20	0,78	0,77	0,72	0,76	0,0011
21	0,72	0,65	0,54	0,64	0,0083

TABLA -VII

Acete virgen II

MUESTRA VIDRIO

<u>Piço</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>S²</u>
	I	II	III		
1	0,35	0,32	0,69	0,45	0,0423
2	0,79	0,82	1,26	0,96	0,0693
3	59,61	61,55	57,68	59,61	3,7443
4	7,50	5,15	10,46	7,70	7,0801
5	0,48	0,67	0,62	0,59	0,0097
6	0,42	0,72	0,59	0,58	0,0227
7	2,10	3,84	2,16	2,70	0,9756
8	17,29	15,66	14,97	15,98	1,4193
9	1,98	2,06	2,23	2,09	0,0163
10	1,48	1,27	1,42	1,39	0,0117
11	0,65	0,66	0,73	0,68	0,0019
12	0,64	0,48	0,71	0,61	0,0139
13	0,42	0,44	0,49	0,45	0,0013
14	4,82	4,03	4,61	4,49	0,1675
15	0,12	0,08	0,05	0,08	0,0013
16	0,12	0,17	0,13	0,14	0,0007
17	0,09	0,13	0,11	0,11	0,0004
18	0,35	0,34	0,22	0,30	0,0053
19	0,41	0,61	0,44	0,49	0,0117
20	0,19	0,61	0,22	0,34	0,0549
21	0,19	0,39	0,21	0,26	0,0122

TABLA.VII

Aceite virgen II

MUESTRA POLIETILENO

Pico	Replicado			Media	s ²
	I	II	III		
1	0,47	0,51	0,87	0,62	0,0486
2	2,05	2,75	2,02	2,27	0,1707
3	50,38	50,60	63,39	54,79	55,4821
4	2,75	6,95	3,74	4,48	4,8207
5	1,20	0,89	1,00	1,03	0,0247
6	3,06	3,75	3,00	3,27	0,1737
7	6,87	4,64	3,50	5,00	2,9383
8	7,26	7,69	4,77	6,57	2,4853
9	3,10	2,21	1,87	2,39	0,4035
10	1,48	1,05	0,82	1,12	0,1123
11	0,59	0,39	0,33	0,44	0,0186
12	0,86	0,92	0,87	0,88	0,0011
13	0,52	0,49	0,87	0,63	0,0447
14	14,06	13,02	9,52	12,20	5,6572
15	0,85	0,65	0,49	0,66	0,0441
16	0,33	0,16	0,14	0,21	0,0109
17	0,33	0,23	0,19	0,25	0,0052
18	0,52	0,43	0,41	0,46	0,0035
19	0,80	0,63	0,55	0,66	0,0163
20	0,44	0,63	0,47	0,51	0,0105
21	1,85	1,18	1,00	1,34	0,2007

NOTA: Además de los picos reseñados, que son comunes en todas las muestras de este tipo de aceite, existe otro, que solo se encuentra en esta muestra. Este puede o no tener influencia en el aspecto olfativo, pero en el supuesto que la tuviese no haría mas que aumentar las diferencias encontradas.

TABLA- VIII

Aceite Riviera

MUESTRA PATRON

Pico	Replicado			Media	S ²
	I	II	III		
1	0,50	0,41	0,49	0,47	0,0025
2	71,33	76,02	65,88 ³⁰	70,88	28,8793
3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
6	5,84	6,03	8,94	6,94	3,0191
7	1,63	1,85	2,05	1,84	0,0442
8	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
9	0,50	0,76	0,55	0,60	0,0191
10	3,55	0,32	3,82	2,56	3,7927
11	8,35	7,59	9,83	8,59	1,2976
12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
13	1,47	1,43	1,91	1,60	0,0710
14	1,56	1,22	2,01	1,60	0,1571
15	1,48	0,73	1,09	1,10	0,1407
16	1,60	1,75	1,20	1,52	0,0809
17	0,89	0,84	0,93	0,89	0,0021
18	0,55	0,46	0,61	0,54	0,0057
19	0,55	0,41	0,75	0,57	0,0292
20	0,15	0,13	0,47	0,25	0,0364

TABLA- VIII

Aceite Riviera

MUESTRA HOJALATA

Pico	Replicado			Media	s ²
	I	II	III		
1	0,23	0,66	0,59	0,49	0,0533
2	67,00	72,85	73,75	71,20	13,4325
3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
6	3,96	3,08	3,72	3,59	0,2070
7	4,55	2,77	3,19	3,50	0,8657
8	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
9	0,52	0,31	0,53	0,45	0,0155
10	3,72	4,23	1,58	3,17	1,9666
11	10,92	8,32	8,75	9,33	1,9423
12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
13	1,45	1,39	1,51	1,45	0,0036
14	1,76	1,70	1,93	1,80	0,0143
15	1,20	1,14	1,10	1,15	0,0026
16	2,32	1,66	1,59	1,86	0,1596
17	0,86	0,77	0,70	0,77	0,0065
18	0,52	0,54	0,31	0,46	0,0163
19	0,60	0,35	0,39	0,45	0,0181
20	0,34	0,18	0,31	0,28	0,0076

TABLA-VIII

Aceite Riviera

MUESTRA PVC

Pico	Replicado			Media	s ²
	I	II	III		
1	2,00	2,08	3,11	2,40	0,3833
2	39,29	26,80	37,54	34,54	45,7551
3	0,70	1,14	0,87	0,90	0,0493
4	2,09	1,88	2,68	2,22	0,1721
5	2,58	2,68	3,42	2,89	0,2106
6	4,38	4,34	4,79	4,50	0,0621
7	34,33	45,16	32,15	37,22	48,5503
8	1,42	1,88	1,98	1,76	0,0892
9	0,62	0,97	1,07	0,89	0,0559
10	0,52	0,56	0,48	0,52	0,0016
11	7,23	6,86	6,29	6,79	0,2243
12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
13	0,42	0,78	0,48	0,56	0,0372
14	0,47	0,94	0,85	0,76	0,0623
15	0,45	0,75	0,79	0,66	0,0346
16	0,61	0,81	0,91	0,78	0,0234
17	0,50	0,38	0,42	0,43	0,0038
18	1,56	1,36	1,52	1,48	0,0112
19	0,73	0,54	0,59	0,62	0,0097
20	0,09	0,08	0,05	0,07	0,0005

TABLA-VIII

Aceite Riviera

MUESTRA VIDRIO

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>S²</u>
	I	II	III		
1	0,83	0,82	0,90	0,85	0,0019
2	12,97	14,70	15,65	14,44	1,8463
3	0,61	0,75	0,38	0,58	0,0349
4	0,74	0,66	0,48	0,63	0,0178
5	2,16	2,76	2,41	2,44	0,0909
6	2,77	3,24	2,51	2,84	0,1369
7	65,78	59,90	63,21	62,96	8,6893
8	2,31	1,69	2,13	2,04	0,1016
9	0,84	0,76	0,86	0,82	0,0028
10	0,62	1,50	1,61	1,24	0,2945
11	5,63	6,13	5,16	5,64	0,2353
12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
13	0,51	0,57	0,52	0,53	0,0011
14	0,59	0,90	0,68	0,73	0,0254
15	0,43	0,73	0,58	0,58	0,0225
16	0,61	0,93	0,53	0,69	0,0448
17	0,34	0,50	0,13	0,33	0,0345
18	1,65	2,57	1,70	1,97	0,2677
19	0,48	0,79	0,50	0,59	0,0301
20	0,12	0,09	0,05	0,09	0,0013

TABLA- VII i

Aceite Riviera
MUESTRA POLIETILENO

<u>Pico</u>	<u>Replicado</u>			<u>Media</u>	<u>S²</u>
	I	II	III		
1	7,47	5,39	6,65	6,50	1,0978
2	8,06	9,54	14,13	10,58	10,0173
3	0,42	0,50	0,57	0,50	0,0057
4	4,07	4,36	4,71	4,38	0,1027
5	15,33	15,40	15,60	15,44	0,0197
6	12,31	11,00	10,38	11,23	0,9709
7	3,92	5,76	3,39	4,36	1,5473
8	4,34	3,24	3,49	3,69	0,3325
9	0,76	0,52	0,51	0,60	0,0201
10	2,65	2,17	1,84	2,22	0,1659
11	17,93	18,72	16,89	17,85	0,8425
12	4,05	3,54	4,26	3,95	0,1371
13	0,40	0,64	0,56	0,53	0,0150
14	0,56	0,80	0,71	0,69	0,0147
15	0,81	1,12	0,69	0,87	0,0493
16	0,40	0,64	0,30	0,44	0,0306
17	0,23	0,22	0,17	0,21	0,0011
18	2,73	2,37	2,41	2,50	0,0390
19	0,68	0,67	0,46	0,60	0,0155
20	0,33	0,48	0,40	0,40	0,0057

NOTA: Además de los picos reseñados, que son comunes en todas las muestras de este tipo de aceite, existen otros cuatro que solo se encuentran en esta muestra. Estos puede o no tener influencia en el aspecto olfativo, pero en el supuesto que la tuviesen no harían mas que aumentar las diferencias encontradas.

éstos no coinciden de una a otra muestra, lo que resulta lógico, ya que los catadores, cuando se les interrogaba si la diferencia apreciada era debida a aromas similares, ellos respondían negativamente.

El comentario para las comparaciones entre las muestras del aceite virgen II, tabla X, es similar al realizado anteriormente, siendo quizás digno de destacar el hecho de que el número de picos significativos es menor; pero ésto no debe de sorprender, ya que al tratarse de aceites diferentes, los caminos seguidos para las transformaciones aromáticas no tienen por qué ser los mismos y el hecho de que las diferencias encontradas por el panel en este tipo de aceite, sea similar a las del anterior, teniendo éste menos picos diferentes, no parece extraño, ya que su fundamento se debe encontrar en el umbral de sensibilidad de los compuestos, el cual hasta ahora es desconocido.

Por último en el aceite tipo rivierra (tabla XI) nos encontramos que la comparación patrón-hojalata carece de diferencias significativas, y está totalmente de acuerdo con lo indicado por el panel de catadores. En las restantes comparaciones el comentario es análogo al realizado para los tipos de aceite virgen.

Debe destacarse, que el sistema de detección de diferencias, establecido con ayuda del "Panel" y el estudiado mediante cromatografía, discrepan en su mismo fundamento.

El panel de catadores, cuando lleva a cabo un análisis de diferencias, realiza una valoración global de los compuestos que están en el espacio de cabeza, con todos sus problemas de "contraste" y "compensación", por el contrario, el registro cromatográfico y el tratamiento matemático seguido para la comparación entre los picos, contrasta componentes individuales, lo que escapa totalmente del alcance del panel. Por ello, para resolver este problema, buscamos un método que fuese capaz de incluir a todos los compuestos, responsables de estas diferencias aromáticas, y que resumiese numéricamente los componentes de cada aromagrama en un solo valor.

TABLA - IX

Aceite virgen I

Pico	PATRON HOJALATA		PATRON PVC		PATRON VIDRIO	
	t	sig.	t	sig.	t	sig.
1	0,40	-	1,44	-	1,20	-
2	1,11	-	0,35	-	0,59	-
3	3,22	-	6,20	+	9,14	+
4	1,10	-	3,44	-	4,10	-
5	1,41	-	3,04	-	2,46	-
6	1,86	-	2,96	-	3,57	-
7	0,54	-	1,08	-	1,42	-
8	1,74	-	13,09	++	29,23	++
9	3,00	-	5,12	+	5,46	+
10	1,80	-	6,46	+	8,82	+
11	0,55	-	0,60	-	0,75	-
12	3,35	-	0,92	-	0,06	-
13	8,49	+	7,09	+	2,71	-
14	2,29	-	0,24	-	4,27	-
15	3,40	-	3,50	-	3,50	-
16	14,86	++	3,57	-	3,43	-
17	4,20	-	2,28	-	3,22	-
18	3,08	-	0,36	-	0,36	-
19	7,43	+	3,80	-	4,11	-
20	6,00	+	5,25	+	3,75	-
21	5,75	+	8,66	+	18,00	++
22	6,17	+	1,20	-	1,20	-
23	4,83	+	3,20	-	2,00	-

TABLA - X

Aceite virgen II

Pico	PATRON HOJALATA		PATRON PVC		PATRON VIDRIO		PATRON POLIETILENO	
	t	sig.	t	sig.	t	sig.	t	sig.
1	3,44	-	4,72	+	3,38	-	2,84	-
2	6,86	+	6,90	+	3,61	-	7,84	+
3	1,50	-	2,90	-	0,51	-	1,23	-
4	1,97	-	3,52	-	3,00	-	4,46	+
5	1,84	-	0,04	-	0,10	-	2,10	-
6	2,18	-	0,61	-	0,39	-	9,36	+
7	2,21	-	2,02	-	1,01	-	1,43	-
8	2,58	-	5,82	+	7,88	+	2,14	-
9	0,43	-	1,10	-	2,48	-	2,27	-
10	1,34	-	0,55	-	0,90	-	0,24	-
11	2,77	-	3,12	-	4,40	+	5,11	+
12	0,16	-	2,08	-	0,77	-	2,85	-
13	2,45	-	2,18	-	4,16	-	3,07	-
14	4,37	+	9,61	+	8,97	+	7,53	+
15	1,66	-	2,00	-	1,75	-	4,25	-
16	0,66	-	1,20	-	2,20	-	0,50	-
17	0,40	-	1,00	-	2,00	-	0,66	-
18	0,50	-	4,33	+	1,66	-	5,20	+
19	0,77	-	2,36	-	0,83	-	0,58	-
20	0,30	-	13,75	++	0,93	-	4,28	-
21	1,40	-	11,80	++	3,50	-	5,16	+

TABLA - XI

Aceite Riviera

Pico	PATRON HOJALATA		PATRON PVC		PATRON VIDRIO		PATRON POLIETILENO	
	t	sig.	t	sig.	t	sig.	t	sig.
1	0,15	-	5,36	+	9,50	+	10,05	++
2	0,07	-	7,29	+	17,64	++	16,75	++
3	0,00	-	6,84	+	5,18	+	12,25	++
4	0,00	-	9,21	+	7,75	+	23,00	++
5	0,00	-	10,66	++	14,29	++	192,88	+++
6	3,25	-	2,41	-	3,90	-	3,73	-
7	3,02	-	8,80	+	35,95	+++	3,45	-
8	0,00	-	10,35	++	11,27	++	11,15	++
9	1,36	-	1,81	-	2,75	-	0,00	-
10	0,44	-	1,82	-	1,12	-	0,29	-
11	0,71	-	2,53	-	4,15	-	11,02	++
12	0,00	-	0,00	-	0,00	-	18,76	++
13	0,94	-	5,47	+	7,13	+	6,29	+
14	0,83	-	3,11	-	3,35	-	3,79	-
15	0,23	-	1,82	-	2,17	-	0,92	-
16	1,21	-	3,89	-	4,15	-	5,68	+
17	2,40	-	11,50	++	1,09	-	22,66	++
18	1,00	-	13,73	++	4,77	+	16,33	++
19	0,92	-	0,45	-	0,14	-	0,25	-
20	0,25	-	1,63	-	1,45	-	1,25	-

3.10.5. Función de discriminación.-

El resultado de unos estudios previos nos llevó a utilizar las funciones de discriminación, ya que a nuestro modo de ver, son las únicas capaces de dar un solo valor en función de los picos de cada aromagrama.

Dado que el análisis discriminante tiene por objeto diferenciar dos poblaciones A y B, sobre la base de un determinado número de parámetros de dichas poblaciones, el establecerla, en nuestro estudio, presenta dos problemas fundamentales. El primero de ellos, es decidir cuales han de ser las poblaciones A y B, que vamos a considerar diferentes, y el segundo, cuales serían los parámetros sobre los que vamos a establecer estas diferencias.

3.10.5.1. Elección de las poblaciones A y B.-

Es evidente, que una de las poblaciones que se han de tomar, ha de ser el patrón (población A) de cada uno de los tipos de aceites; pero el elegir la segunda población ya resulta más problemático. El criterio que se ha seguido, es el de tomar aquella muestra, cuya alteración aromática fuese la más representativa, dentro de un determinado tipo de alteración, que ha de ser el más generalizado entre las muestras.

En nuestro caso, dadas las características de los envases, pueden sospecharse tres posibles variantes: a) la alteración oxidativa, muy próxima a la rancidez, producida en los envases de polietileno, ya que en estos al ser transparentes a la luz y permeables al oxígeno atmosférico, la oxidación puede progresar, como se demuestra por la rápida subida de su I.P., (ver pag.85). b) Las alteraciones aromáticas, producidas en los envases transparentes a la luz, pero no permeables al aire, en los que el aceite no puede incrementar más que muy limitadamente, (e incluso desciende por destrucción, ver pag.85) su contenido peroxídico a partir del oxígeno atmosférico; tales son las muestras envasadas en botellas de vidrio, y PVC, en las que el aceite no puede alcanzar los niveles necesarios de productos de oxidación de olor a rancio, pero que por descomposición parcial de los peróxidos existentes inicialmente (ver pag.85), así como por las alteraciones de sus propios aromas, dan lugar a olores extraños ya calificados organolépticamente como a hierba, pepino, etc. (ver pag.128); y finalmente, c) las muestras envasadas en hojalata, las cuales son conservadas en un envase opaco e impermeable al oxígeno, y que por lo tanto no sufren apenas alteraciones en sus índices químicos, indicativos de alteraciones oxidativas (ver pag.85) pero que organolépticamente presentan alteraciones muy ligeras que recuerdan también a los olores del grupo b.

En resumen, podemos decir que en las muestras de aceites envasados, que estamos estudiando, existen tres tipos de alteración: la debida a un claro enranciamiento oxidativo (polietileno), la causada por alteraciones aromáticas, asociadas a pequeñas alteraciones oxidativas (vidrio y PVC) y finalmente, las de las muestras en las que las únicas alteraciones importantes, son las aromáticas (muestras envasadas en hojalata).

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, el grupo b debe reunir en sus alteraciones aromáticas componentes, que al registrarse cromatográficamente, incluyan a los otros dos grupos a y c; consiguientemente este es el tipo de alteración que nos interesa elegir, y dentro de este grupo de alteración, las muestras envasadas en vidrio han sido las elegidas, porque organolépticamente son clasificadas más cerca del polietileno (ver pag.126).

Esta es la razón por la que hemos escogido a las muestras de aceites en vidrio, como las más representativas para esta segunda población (B), necesaria para establecer la deseada "clasificación objetiva" con ayuda de la función discriminante.

Así pues, en los tres tipos de aceites, la función discriminante se establecerá entre la muestra "patrón" y la envasada en vidrio.

3.10.5.2. Elección de los parámetros diferenciadores.-

En un aromagrama ya hemos visto que existen picos que presentan diferencias significativas respecto al patrón y otros que no las presentan; puesto que el panel de catadores ha establecido diferencias organolépticas, de distinto nivel de significación entre las muestras, es de suponer que estas diferencias deben atribuirse a las encontradas entre los picos de los aromagramas que las presentan.

De acuerdo con esto, hemos seguido el criterio de elegir como parámetros de la función discriminante, a aquellos picos que presentan, al menos, en uno de los aromagramas diferencias con respecto al patrón, prescindiendo de aquellos otros que permanecen sin significación; puesto que al no presentar diferencias, su utilización podía enmascarar a causa de "su peso cuantitativo", las diferencias que deseamos encontrar entre los distintos aromagramas, así pues, de las tablas IX, X, XI se establece que en la función de discriminación, para el aceite virgen I han de intervenir, como parámetro los picos:

Nº 3, 8, 9, 10, 13, 16, 19, 20, 21, 22 y 23

En el aceite virgen II los picos:

Nº 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 18, 20 y 21

Y por último para el aceite tipo rivierra los picos:

Nº 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 16, 17 y 18

3.10.6. Cálculo de la función de discriminación.-

Recordando lo expuesto en la introducción matemática (3.10.2.), una vez elegidas las poblaciones A y B y los parámetros que las definen, podemos ya establecer las funciones de discriminación.

3.10.6.1. Aceite virgen I.-

Como ya se ha indicado el paso previo a la obtención de la función, es el cálculo de sus coeficientes. El determinante correspondiente al sistema de ecuaciones que ha sido necesario plantear, se da en la figura J, y su resolución se ha efectuado en un ordenador del Centro de Cálculo Electrónico del Patronato Juan de la Cierva del C.S.I.C. de Madrid. Con los valores obtenidos para los correspondientes coeficientes se ha planteado la siguiente función:

$$Z = 0,64 P_3 - 0,50 P_8 + 27,06 P_9 - 101,21 P_{10} - 19,85 P_{13} - 831,91 P_{16} + 643,02 P_{19} + 1036,54 P_{20} + 145,06 P_{21} + 305,86 P_{22} - 322,89 P_{23}$$

3.10.6.2. Aceite virgen II.☉

En este aceite, el sistema de ecuaciones planteado conduce al determinante que se da en la figura K y sus soluciones, efectuadas en el mismo ordenador da lugar a la siguiente función:

$$Z = 18,21 P_1 - 285,18 P_2 + 17,19 P_4 + 111,31 P_6 - 16,17 P_8 - \\ - 9,23 P_{11} + 17,05 P_{14} - 203,44 P_{18} + 2,12 P_{20} - 22,39 P_{21}$$

3.10.6.3. Aceite riviera.-

Por último, en el aceite riviera, el sistema planteado se da en la figura L, la función obtenida, de acuerdo con los coeficientes calculados es:

$$Z = - 23,81 P_1 + 5,15 P_2 - 308,81 P_3 + 374,45 P_4 - 399,49 P_5 \\ + 1,96 P_7 + 18,83 P_8 - 48,37 P_{11} + 587,18 P_{13} + 257,33 P_{16} - \\ - 494,21 P_{17} + 346,41 P_{18}$$

SISTEMA DE ECUACIONES ACEITE VIRGEN I

122,75	-41,54	-6,06	-1,96	-0,10	-0,85	-0,05	-0,72	-1,04	-0,98	-0,15	λ_3	41,26
41,54	16,60	2,79	0,69	0,63	0,24	0,01	0,19	0,32	0,31	-0,05	λ_8	-47,61
-6,06	2,79	0,68	0,17	0,38	0,04	0,0	0,04	0,02	0,01	-0,01	λ_9	-2,02
-1,96	0,69	0,17	0,06	0,10	0,02	0,0	0,02	0,0	0,0	0,0	λ_{10}	-0,97
-0,10	0,63	0,38	0,10	0,42	0,01	-0,02	0,02	-0,02	-0,04	0,01	λ_{13}	-0,76
-0,85	0,24	0,04	0,02	0,01	0,01	0,0	0,01	0,0	0,0	0,0	λ_{16}	0,24
-0,05	0,01	0,0	0,0	-0,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	λ_{19}	0,36
-0,72	0,19	0,04	0,02	0,02	0,01	0,0	0,01	0,0	0,0	0,0	λ_{20}	0,15
-1,04	0,32	0,02	0,0	-0,02	0,0	0,0	0,0	0,01	0,01	0,0	λ_{21}	-0,06
-0,98	0,31	0,01	0,0	-0,04	0,0	0,0	0,0	0,01	0,01	0,0	λ_{22}	0,11
-0,15	-0,05	-0,01	0,0	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	λ_{23}	-0,54

Figura J

SISTEMA DE ECUACIONES ACÉITE VIRGEN II

0,57	0,27	3,74	-0,04	0,66	-0,06	0,18	-0,07	-0,02	-0,03	λ_1	1,04
0,27	0,19	2,10	-0,01	-0,09	-0,01	0,08	-0,05	-0,04	-0,03	λ_2	-0,61
3,74	2,10	40,59	-1,79	2,00	-0,27	0,53	-0,25	-0,96	-0,54	λ_4	7,84
-0,04	-0,01	-1,79	0,18	-0,17	0,0	0,02	-0,03	0,08	0,03	λ_6	0,08
0,66	-0,09	2,00	-0,17	4,66	-0,21	0,92	0,02	-0,11	-0,08	λ_8	-7,11
-0,06	-0,01	-0,27	0,0	-0,21	0,01	-0,01	0,0	-0,01	0,0	λ_{11}	0,23
0,18	0,08	0,53	0,02	0,92	-0,01	0,52	-0,05	-0,15	-0,07	λ_{14}	-2,70
-0,07	-0,05	-0,25	-0,03	0,02	0,0	-0,05	0,02	0,01	0,01	λ_{18}	-0,10
-0,02	-0,04	-0,96	0,08	-0,11	-0,01	-0,15	0,01	0,12	0,05	λ_{20}	-0,14
-0,03	-0,03	-0,54	0,03	-0,08	0,0	-0,07	0,01	0,05	0,02	λ_{21}	-0,21

Figura K

SISTEMA DE ECUACIONES ACEITE RIVIERA

0,01	-0,27	-0,02	-0,01	-0,01	0,05	0,0	0,03	0,01	-0,03	-0,01	-0,02	λ_1	-0,39
-0,27	61,35	-0,24	-0,32	0,46	-5,89	-0,36	-12,60	-2,58	2,93	-0,62	-0,50	λ_2	56,44
-0,02	-0,24	0,07	0,04	0,05	-0,49	-0,07	0,18	0,01	0,07	0,07	0,14	λ_3	-0,57
-0,01	-0,32	0,04	0,03	-0,02	0,18	0,01	0,08	0,0	0,02	0,03	0,02	λ_4	-0,62
-0,01	0,46	0,05	-0,02	0,18	-1,74	-0,18	0,17	0,02	0,10	0,06	0,28	λ_5	-2,43
0,05	-5,89	-0,49	0,18	-1,74	17,41	1,82	-1,34	-0,06	-1,08	-0,53	-2,96	λ_7	= -61,12
0,0	-0,36	-0,07	0,01	-0,18	1,82	0,20	-0,22	-0,02	-0,12	-0,07	-0,31	λ_8	-2,03
0,03	-12,60	0,18	0,08	0,17	-1,34	0,22	3,07	0,59	-0,44	0,26	0,59	λ_{11}	2,95
0,01	-2,58	0,01	0,0	0,02	-0,06	-0,02	0,59	0,14	-0,13	0,03	0,06	λ_{13}	1,07
-0,03	-2,93	0,07	0,02	0,10	-1,08	-0,12	-0,44	-0,13	0,25	0,05	0,17	λ_{16}	0,82
-0,01	-0,62	0,07	0,03	0,06	-0,53	-0,07	0,26	0,03	0,05	0,06	0,15	λ_{17}	0,55
-0,02	-0,50	0,14	0,02	0,28	-2,96	-0,31	0,59	0,06	0,17	0,15	0,53	λ_{18}	-1,43

Figura L

3.10.7. Prueba de significación de las distintas funciones de discriminación calculadas y clasificación de las muestras, establecidas por medio de estas.-

Una vez establecidas las funciones, es conveniente averiguar si verdaderamente éstas clasifican o no a las muestras de un mismo aceite en una u otra clase (alteradas o no alteradas), y saber con que error se establecen estas clasificaciones. Por ello se ha seguido el criterio ya expuesto en la introducción matemática (pag.153).

3.10.7.1. Aceite virgen I.-

Es la tabla XII se recogen los valores de la función en cada replicado, así como su media y desviación típica.

TABLA XII

MUESTRA	REPLICADO	Z	S ²
PATRON (Población A)	1	478,55	
	2	408,70	
	3	459,15	
	\bar{X}	448,80	1.300,10
VIDRIO (Población B)	1	255,48	
	2	318,62	
	3	255,67	
	\bar{X}	276,59	1.324,90

El valor medio separador resulta:

$$\bar{X} = \frac{\bar{X}_A + \bar{X}_B}{2} = 362,70$$

Luego podemos establecer que:

Muestras no alteradas $Z > 362,70$ > muestras alteradas
Z.

El error de mala clasificación se calcula por medio de una prueba de "t" de Student, entre el valor Z "medio separador," y el valor Z de la población A o B.

Operando de este modo resulta:

$t = 2,92$ que corresponde a una probabilidad de 0,1, lo que quiere decir que el 10% de los aceites clasificados pueden serlo erróneamente.

El criterio adoptado, en virtud del valor "medio separador" ($Z = 362,70$), nos lleva a clasificar las muestras del aceite virgen I como sigue:

<u>Valor Z</u>	<u>Muestra no alterada</u>	<u>Valor Z</u>	<u>Muestra alterada</u>
448.80	Patrón	147,10	PVC
676.68	Hojalata	276,59	Vidrio

$\left. \begin{array}{l} \text{Patrón} \\ \text{Hojalata} \end{array} \right\} 362,70 \left. \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\}$

3.10.7.2. Aceite virgen II.-

Siguiendo el mismo razonamiento para este tipo de aceite tendremos:

MUESTRA	REPLICADO	Z	S ²
Patrón (Población A)	1	119,92	
	2	119,48	
	3	117,75	
	\bar{X}	119,05	1,32
Vidrio (Población B)	1	-321,70	
	2	-326,56	
	3	-320,47	
	\bar{X}	-322,91	10,37

El valor medio separador será: $-101,93$

O sea que para las muestras de este tipo de aceite se tendrá:

Muestras no alteradas $Z > -101,93 >$ Muestras alteradas Z.

El error de mala clasificación, establecido por la prueba de t resulta

$t = 116,30$ a lo que corresponde una probabilidad ($P < 0,001$) mucho menos del 0,1%

La clasificación de las muestras de este aceite según el valor medio separador queda como sigue:

<u>Valor Z</u>	<u>Muestra no alterada</u>	<u>Valor Z</u>	<u>Muestra alterada</u>
119,05	Patrón $> -101,93 >$	-486,83	PVC
		-322,91	Vidrio
		-227,81	Hojalata
		-219,61	Polietileno

3.10.7.3. Aceite rivierra.-

Para este aceite, repitiendo el razonamiento anteriormente expuesto, tendremos:

MUESTRA	REPLICADO	Z	S ²
Patrón (Población A)	1	977,16	
	2	1.049,29	
	3	1.032,02	
	\bar{X}	1.019,49	1418,43
Vidrio (Población B)	1	32,94	
	2	39,01	
	3	39,56	
	\bar{X}	37,17	13,50

El valor separador será: 528,33

Así pues para las muestras de este aceite tendremos

Muestras no alteradas $Z > 528,33 >$ Muestras alteradas Z.

El valor "t" obtenido es 22,53 lo que corresponde a una probabilidad comprendida entre 0,01 y 0,001, luego el error de mala clasificación estará entre el 1% y 0,1%, aunque más próximo a este último.

La clasificación de las muestras de este aceite, según el valor medio separador queda como sigue:

Valor Z	Muestra no alterada	Valor Z	Muestra alterada
1019,49	Patrón $> 528,33 >$	120,74	PVC
1010,90	Hojalata	37,17	Vidrio
		-4.375,19	Polietileno

3.10.8. Comparación entre los resultados obtenidos de los ensayos organolépticos (método semiobjetivo del "panel") y los obtenidos por cromatografía gaseosa (método objetivo).-

Reiteradamente se ha comentado que, el panel organoléptico nos ha clasificado la muestra dentro de cada tipo de aceite, por diferencias con respecto al Patrón. El análisis de varianza aplicado a los resultados de este ensa-

yo, nos ha permitido conocer la significación estadística de estas diferencias.

Por otra parte la función discriminante nos ha permitido clasificar a las muestras, dentro de cada tipo de aceite, en dos grupos: alterados e inalterados.

De acuerdo con lo expuesto en la Pag. 169, es nuestro deseo designar un número al conjunto de picos (componentes cromatográficos) que intervienen en un aromagrama y pensamos que este debe estar asociado a los valores de Z .

Establecido que el patrón de cada aceite, conservado en el frigorífico (representado por Z_p) no ha variado, podemos suponer que los valores de Z_i , constituyen un número asociado a las restantes muestras.

En este punto cabe preguntarse si aplicando una prueba de significación (t de Student) entre los distintos valores de Z_i con el valor Z_p , en cada tipo de aceite, estos números son capaces de diferenciarnos las muestras, y si las posibles diferencias encontradas, se corresponden o no con las establecidas por el "panel de diferencias".

Los resultados de estas comparaciones se recogen en las tablas XIII, XIV y XV, para los aceites virgen I, II y rivierra respectivamente. En la última columna se indica el grado de significación de las diferencias establecidas.

TABLA-XIII

Aceite virgen I

<u>Muestra</u>		<u>Z</u>	<u>S²</u>	<u>t</u>	<u>sig.</u>
PATRON	1	478,55			
	2	408,70			
	3	459,15			
Valor medio		448,80	1.300,10	-	-
HOJALATA	1	697,93			
	2	662,67			
	3	669,44			
Valor medio		676,68	350,13	9,37	+
PVC	1	167,41			
	2	135,41			
	3	138,48			
Valor medio		147,10	311,73	13,06	++
VIDRIO	1	255,48			
	2	318,62			
	3	255,67			
Valor medio		276,59	1.324,90	5,83	+

TABLA- XIV

Aceite virgen II

<u>Muestra</u>		<u>Z</u>	<u>s²</u>	<u>t.</u>	<u>sig.</u>
PATRON	1.	119,92			
	2	119,48			
	3	117,75			
Valor medio		119,05	1,32	-	-
HOJALATA	1	-162,37			
	2	-229,85			
	3	-291,21			
Valor medio		-227,81	4.153,06	9,32	+
PVC	1	-446,82			
	2	-495,47			
	3	-518,20			
Valor medio		-486,83	1.329,76	28,85	++
VIDRIO	1	-321,70			
	2	-326,56			
	3	-320,47			
Valor medio		-322,91	10,37	232,61	+++
POLIETILENO	1	-217,57			
	2	-256,59			
	3	-184,67			
Valor medio		-219,61	1.296,24	14,34	++

TABLA- XV

Aceite Riviera

<u>Muestra</u>		<u>z</u>	<u>s²</u>	<u>t</u>	<u>sig.</u>
PATRON	1	977,16			
	2	1.049,29			
	3	1.032,02			
Valor medio		1.019,49	1.418,43	-	-
HOJALATA	1	1.020,67			
	2	1.009,17			
	3	1.002,86			
Valor medio		1.010,90	81,54	0,38	-
PVC	1	131,66			
	2	111,63			
	3	118,93			
Valor medio		120,74	102,76	39,94	+++
VIDRIO	1	32,94			
	2	39,01			
	3	39,56			
Valor medio		37,17	13,50	45,06	+++
POLIETILENO	1	-4.474,25			
	2	-4.333,59			
	3	-4.317,73			
Valor medio		-4.375,19	7.422,55	99,53	+++

Por último en la Tabla XVI se contrastan los resultados de estas comparaciones con los obtenidos por medio del panel organoléptico.

A la vista de estos resultados, creemos que existe un paralelismo bastante aceptable entre ambas pruebas ya que todas las comparaciones, diferentes y no diferentes coinciden.

El hecho de que no exista un paralelismo perfecto en el grado de significación, era de esperar, puesto que los distintos compuestos olorosos, que intervienen en los aromas, poseen diferentes umbrales de sensibilidad para la percepción humana, y por consiguiente no pueden corresponderse exactamente con las áreas de los picos, que a su vez están relacionadas con la sensibilidad del detector cromatográfico

TABLA - XVI

<u>Comparación</u>	<u>Aceite virgen I</u>		<u>Aceite virgen II</u>		<u>Aceite Riviera</u>	
	<u>"Panel"</u>	<u>Z</u>	<u>"Panel"</u>	<u>Z</u>	<u>"Panel"</u>	<u>Z</u>
PATRON-HOJALATA	* *	*	* *	*	=	=
PATRON-PVC	*	* *	*	* *	*	***
PATRON-VIDRIO	* *	*	* *	***	* *	***
PATRON-POLIETILENO	-	-	* *	*	* *	***

- = Sin diferencia significativa
 * Diferencia significativa $P < 0,05$
 ** Diferencia significativa $P < 0,01$
 *** Diferencia significativa $P < 0,001$

C O N C L U S I O N E S

- 1º.- Cuando se sigue el proceso de alteración oxidativa de los aceites de oliva envasados, con ayuda de las determinaciones químicas características, (I.P., K_{270} , etc.) se obtienen valores diferentes según la clase de envases, el tipo de aceite y las circunstancias de almacenamiento.
- 2º.- La influencia de la permeabilidad del envase, al oxígeno y a la luz, es decisiva sobre la evolución de los índices químicos de los aceites. De acuerdo con esto, el envase de hojalata es el que conserva al aceite en mejores condiciones. Los restantes envases se comportan de forma diferente, según se almacenen a la luz o a la oscuridad.
- 3º.- El estado de conservación determinado por las pruebas químicas usuales, basado fundamentalmente en las transformaciones oxidativas y degradativas de los glicéridos no se corresponden exactamente con las alteraciones organolépticas debidas a sus compuestos aromáticos.
- 4º.- De una visión conjunta de todo el estudio realizado, se deduce que no existe actualmente ninguna prueba química aplicable a los aceites envasados, que permita, en un momento dado, tomar una decisión clara sobre su estado de conservación. Esta ha de basarse en un conjunto de determinaciones a las que, imprescindiblemente

debe acompañar el análisis organoléptico.

5^o.- De las variaciones observadas en el contenido peroxídico, a lo largo del almacenamiento, podemos concluir:

- a) Las muestras de aceite envasadas en polietileno sufren un notable aumento del I.P., cuando se exponen a la luz. De acuerdo con las limitaciones del C.O.I para el contenido peroxídico, la capacidad de conservación en este tipo de envase se reduciría a unos 10-20 días de almacenamiento. Muestras similares, mantenidas en la oscuridad, tienen periodos de conservación comprendidos entre cuatro y seis meses de almacenamiento.
- b) En los envases impermeables al oxígeno atmosférico, indistintamente sean opacos o no a la luz, la determinación del contenido peroxídico, es totalmente ineficaz como medida del envejecimiento del aceite.

6^o.- Del estudio de las extinciones específicas a 232 nm para los aceites vírgenes se deduce que:

- a) Las muestras de estos aceites envasados en polietileno expuestas tanto a la luz como en la oscuridad son las únicas en las que se observa un progresivo aumento de su extinción a esta longitud de onda.

- b) Para las restantes muestras envasadas en recipientes impermeables al oxígeno atmosférico, tanto si se conservan a la luz como en la oscuridad, los valores de la extinción a 232 nm, se mantienen prácticamente constantes y próximos a los valores iniciales.

7².- Del estudio de las variaciones de la extinción específica a 270 nm y de acuerdo con las limitaciones establecidas por el C.O.I. para el aceite de oliva (virgenes, 0,25; riviera 0,90) se deduce que:

- a) Los aceites virgenes envasados en recipientes transparentes y expuestos a la luz: (vidrio, PVC I, PVC II y Polietileno), sufren un rápido aumento de su extinción específica. El límite 0,25 se sobrepasa aproximadamente entre uno y dos meses de almacenamiento.
- b) Las mismas muestras almacenadas en la oscuridad, aunque presentan extinciones específicas superiores al control, no sobrepasan el límite de extinción establecido, ni aún después de ocho meses de almacenamiento.
- c) El aceite tipo Riviera presenta un curioso comportamiento:

Las muestras almacenadas en la oscuridad mantienen sus valores de extinción prácticamente constantes, cualquiera que sea el envase utilizado. Las muestras expuestas a la luz, muy particularmente las muestras envasadas en polietileno, presentan un ligero

descenso de valor en su extinción a esta longitud de onda. En ambas circunstancias resulta ineficaz el límite 0,9 establecido como medida del envejecimiento.

8º.- Del estudio de la evolución de la prueba de Kreis se deducen las siguientes conclusiones:

- a) Las muestras de aceites, envasadas en polietileno, son las que sufren un aumento más notable del color rojo que da esta prueba.
- b) Las muestras en vidrio, PVC I, PVC II y polietileno, expuestas a la luz, sufren un incremento más acusado que las conservadas en la oscuridad.

De acuerdo con lo anterior, se deduce que la formación de los compuestos aldehídicos responsables de la prueba, están relacionados íntimamente con un proceso oxidativo, catalizado por la luz.

9º.- El estudio de las curvas de transmisión de los aceites en el visible nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- a) El color de todos los aceites conservados en la oscuridad se mantiene inalterable a lo largo del almacenamiento.
- b) En las muestras expuestas a la luz, de los aceites vírgenes y rivierra, envasados en vidrio, PVC I y PVC II, se presenta ya a los 50 días, una notable decoloración, tanto en la zona de los carotenos (amarillo) como en la de la clorofila (verde); lo que nos indica la acción destructora de la luz sobre estos pigmentos.
- c) En las muestras envasadas en polietileno, el color del aceite se conserva mejor durante los primeros 50 días, pero posteriormente comienza la decoloración y su curva de transmisión se superpone (a los 100 días de almacenamiento) con las de los aceites envasados en vidrio, PVC I y PVC II, superándolas de una manera notable a los 175 días.

10º.- En relación al contenido en tocoferoles y materias reductoras podemos concluir que:

- a) En todas las muestras almacenadas en la oscuridad, excepto para las envasadas en polietileno, se observa inicialmente un descenso de su contenido en tocoferoles y materias reductoras.

En los desmuestres posteriores la concentración de estos productos se mantienen prácticamente estable hasta el final del ensayo.

En el caso del polietileno estas sustancias presentan un descenso continuo a causa de la permeabilidad del envase al oxígeno atmosférico.

- b) En todas las muestras expuestas a la luz se aprecian mayores pérdidas que en las conservadas en la oscuridad, dada la labilidad de estos compuestos a la radiaciones luminosas.

11º.- En relación con la pérdida de estabilidad A.O.M. llegamos a las siguientes conclusiones:

- a) Todas las muestras de aceites virgenes almacenadas a la oscuridad se mantienen estables, salvo las de los aceites envasados en polietileno.

Las muestras del tipo rivierra sufren pérdidas de estabilidad en el vidrio, PVC y polietileno siendo en este último en el que el descenso es más destacado.

- b) En todas las muestras expuestas a la luz se observan importantes descensos de estabilidad. En el polietileno el fenómeno es más acusado, a causa de su menor protección a la entrada del oxígeno atmosférico.

12º.- En relación al contenido en trazas metálicas, no se observan variaciones significativas a lo largo del ensayo, ni aún en las muestras envasadas en hojalata.

13º.- De los ensayos organolépticos efectuados, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Comparando todas las muestras de ambos tipos de aceites, con sus patrones respectivos, se observa que las más diferentes son las envasadas en vidrio.
- b) Todas las muestras de aceites expuestas a la luz, cualquiera que sea el tipo de envase, sufren una mayor y más rápida alteración, que las correspondientes conservadas en la oscuridad.
- c) Las diferencias encontradas por los catadores, aunque en algunos casos coinciden en su valor, no corresponden siempre a olores de idénticas características, de forma que, según los envases, son asociadas a estímulos que recuerdan a: "pepino" "hierba fresca" o "rancio".

14º.- El análisis de la significación estadística de estas diferencias, nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Para los aceites vírgenes almacenados en la oscuridad, las diferencias comienzan a ser estadísticamente significativas, respecto a los correspondientes patrones, aproximadamente a los 100 días de almacenamiento.

- b) Para los aceites rivierra las diferencias comienzan a ser significativas, para todos los envases, a partir de los 150 días de almacenamiento. En el caso de las muestras envasadas en hojalata no se observan diferencias significativas ni al final del ensayo.
- c) En todas las muestras expuestas a la luz, cualquiera que sea el tipo de aceite y envase, las diferencias comienzan a ser estadísticamente significativas respecto al patrón, a partir del 1^{er} de muestra.

15^o. - Los aromagramas obtenidos de las muestras almacenadas durante 175 días a la luz, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Limitándonos a los picos comunes en todos los aromagramas y comparando las muestras del aceite virgen I con su patrón, se aprecian diferencias cuantitativas en un mínimo de cinco picos diferentes.
- b) En el aceite virgen II, el número de diferencias en relación a su patrón, oscila entre 2 picos; en las muestras envasadas en hojalata, y 7 para las de PVC y polietileno.

En ambos casos, parecen ser diferencias suficientes, para justificar las encontradas por los catadores.

c) En el aceite rivierra la muestra conservada en hojalata presenta un aromagrama idéntico a su patrón. Las restantes muestras presentan como mínimo 9 picos cuantitativamente diferentes al patrón.

16º.- A partir de una función discriminante, establecida para cada uno de los aceites y basada sobre las áreas de los picos, que presentan diferencias significativas entre las muestras conservadas en distintos envases y su patrón, se han conseguido separar dos grandes grupos: muestras alteradas e inalteradas.

Asociando al aromagrama de cada muestra su valor Z correspondiente, se efectuaron pruebas de significación y se confrontaron con las de los resultados de los ensayos organolépticos. A la vista de estas comparaciones, llegamos a la conclusión, de que existe un paralelismo aceptable entre la valoración semisubjetiva ("PANEL"), con las alteraciones aromáticas, medidas objetivamente, con ayuda de los aromagramas obtenidos por C.G.L.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- E.H. Farmer y Sutton J.Chem.Soc. (1943)122
- 2.- E.H. Farmer.-H.P. Koch y D.A. Sutton J.
Chem. Soc. (1943)514
- 3.- E.H. Farmer y Sundralingam.- J.Chem Soc. (1942)121
- 4.- E.H. Farmer, Bloomfield. Sundraligam y P.A.
Sutton.- Trans Faraday Soc. 38(1942)348
- 5.- E.H. Farmer.- Trans Faraday Soc. 42(1946)228
- 6.- J.Ross y J. Gerecht.- J.A.O.C.S. 71(1949)282
- 7.- J. Bolland y H.P. Koch.- J.Chem.Soc. (1945)445
- 8.- J. Pritzker y R. Jungkuns.-Z.Untersuch.
Lebensm. 57(1929)419
- 9.- J. Ruiz y R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 16(1965)167
- 10.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 17(1966)1
- 11.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 17(1966)125
- 12.- E. Winter.-Fette, Seifen,Anstrichmittel 67(1965)124
- 13.- E. Hugoni.- Riv. Ital. Sostanze Grasse 42(1965)584
- 14.- A. Ricotti.-Riv. Ital. Sostanze Grasse 42(1965)599
- 15.- M.A. Baldwin.- Rev. Franc. Corps. Grass II(1964)649
- 16.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 12(1961)234
- 17.- W.L. Morgan.- Ind. Eng. Chem. 27(1935)1287
- 18.- A. Ramunni.- Am.Fac. Sci. Agrar. Unir.
Studi Napoli Portici 30(1964)1
- 19.- V. Gottardi.- Riv. Ital Sostanze Grasse 43(1966)52
- 20.- H.L. Barton And. A. Davies.-J. Soc.
Chem. Ind. 58(1939)189
- 21.- J.M. Rodriguez de la Borbolla y R. Vaz-
quez.- Grasas y Aceites II(1960)163

- 22.- J.M. Rodriguez de la Borbolla y R. Vazquez
Grasas y Aceites 13(1962)75
- 23.- J.M. Rodriguez de la Borbolla y R. Vazquez
Grasas y Aceites 14(1963)12
- 24.- P.G. Garoglio.- Riv. Ital. Sostanze.Grasse 41(1964)181
- 25.- A. D' Ambrosio.- Riv. Ital. Sostanze.Grasse 42(1965)523
- 26.- B.Ostrie.- Riv. Ital. Sostanze. Grasse 43(1966)104
- 27.- G. Hartmann y W. Hubig.- Fette, Seifen,
Anstrichmittel 71(1969)685
- 28.- D. Petrovici.- Lucr.Inst. Cetr. Alim. 8(1966)93
- 29.- H. Hardorn y K. Zurcher.- Deutsche Lebensm-
Rundschau 63(1967)99
- 30.- T. Garlanda. M. Masoero, A. Giussani.-
Simposio sullo Alterazioni delle Sostanze
Grasse anche in relazione ai contenitori
Milano-Settembre 1965
- 31.- H.E. Rost.-Fette, Seifen, Anstrichmittel 72(1970)552
- 32.- H. Woggon, U.J. Wolf. G. Zydek.- Z. Lebensm
Unters. Forsch. 138(1968)169
- 33.- U.J. Wolf, H. Woggon, U. Kochler.- Die
Nahrung 12(1968)813
- 34.- U.J. Wolf, H. Woggon.- Die Nahrung 12(1968)825
- 35.- C. Franzke, U.J. Wolf, Woggon.- Plaste Kaut 17(1970)327
- 36.- K. Figge, H. Piater.- Deutsche Lebensm.-
Rundschau 67(1970)9
- 37.- K. Figge, H. Piater.- Deutsche Lebensm.-
Rundschau 67(1970)110
- 38.- M. Nortz.- Inform. Oleic. Intern. 26(1964)111

- 39.- P.G. Caroglio. Simposio sulle alterazioni Chimiche delle sostanze grasse anche in relazione ai contenitori Milano-Settembre 1965
- 40.- A. R. Dos Santos.- Inform. Oleic. Intern. 32(1965)105
- 41.- P. Aubry.- Simposio sulle alterazioni Chimiche delle sostanze grasse anche in relazione ai contenitori Milano- Settembre 1965
- 42.- F. Alcaraz.- Rev. Plasticos modernos 120(1966)492
- 43.- J. Gracián, G. Arévalo.- Grasas y Aceites 17(1966)135
- 44.- J. Gracián, G. Arévalo.- Grasas y Aceites 19(1968)187
- 45.- G. Petruccioli.- Industrie Agrarie 2(1964)419
- 46.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 17(1966)1
- 47.- R. Gutiérrez, M. Nosti, J.M. Olias, F. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 20(1969)74
- 48.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 17(1966)125
- 49.- Naoki Iwata y colbs.- J. of Japan Oil Chem. Soc. 16(1967)113
- 50.- A. Prevot.- Rev. France. Corps. Grass. 18(1971)517
- 51.- R. Gutiérrez y M. Nosti.- Grasas y Aceites 5(1968)191
- 52.- R. Gutiérrez y colbs.- Grasas y Aceites 20(1969)74
- 53.- Comunicación nº 255 Congreso I.S.F. Sep. (1970) Chicago
- 54.- Comunicación nº 256 Congreso I.S.F. Sep. (1970) Chicago
- 55.- D.H. Wheeler.- Oil & Soap 9(1932)89
- 56.- C.H. Lea.- J.Soc. Chem. Ind. 65(1946)286
- 57.- J.H. Skellon y E. D. Wills.- Analyst. 73(1948)78
- 58.- J.H. Skellon y M.N. Turston.- Analyst. 73(1948)97
- 59.- J.M. de la Borbolla y R. Gutiérrez.- Boletín de Oleicultura Internacional 55(1960)

- 60.- J.P. Wolf.- Rev. Franc. Corps. Gras. 1(1954)214
- 61.- H.J. Kohn.- M. Libersedge.- J. Pharmacol 82(1944)292
- 62.- E.A. Prill.- Oil&Soap 19(1942)107
- 63.- Kreis.- Chem. Zeit. 23(1899)23
- 64.- W.C. Powick.- J. Agric. R. 26(1923)323
- 65.- A. Scala.- Satz. Sper. Agric. Ital. Vol.30 Pag. 613
- 66.- S. Patton y colbs.- J.Am.Oil.Chem.Soc. 28(1951)391
- 67.- R. Gutiérrez.- J.M.R. de la Borbolla y R. Vázquez.- Grasas y Aceites 8(1957)207
- 68.- J.M.R. de la Borbolla y R. Gutiérrez.- Grasas y Aceites 10(1957)61
- 69.- A. Taffel y C. Revis.- J.Soc. Chem. Ind. 50(1931)875
- 70.- B. Watts y R. Major.- J. Am. Oil. Chem. Soc. 23(1946)222
- 71.- H.M. Evans y colbs.- J. Biol. Chem. (1936)319
- 72.- H.S. Olcott y O.H. Emerson.-J. Am. Chem. Soc.59(19 7)1006
- 73.- M.H. Stern y D.G. Baxter.- Anal. Chem. 17(1947)902
- 74.- A. Vioque.- T. Albi y M.A. Albi.- Grasas y Aceites. 17(1966)902
- 75.- S.W. Thompson.- Quartermaster Corps Manuel 17-7(1945)
- 76.- A. Vioque.- Grasas y Aceites 11(1960)71
- 77.- A. Vioque.- Mikrochimica Acta (1966)545
- 78.- A. Kramer.- A. Twigg.- Quality Control for the food Industry the AVI.- 1962
- 79.- C.H. Mahoney y colbs.- Food Technol 11(1957) Sim-
posion "Methodology of Sensory Testing" Pag. 37
- 80.- J. W. Tukey.- Trans N.Y. Acad. Sci. Serie II 16(2)(1953)

- 81.- Sensory Methods for Masuring Differences in Food
Analitty Agric. Information Bcill. nº 34 Dept of
Agric. E.E.U.U. Washington D.C. August 1951
- 82.- A. Wald.- Sequential analysis.- John Wiley and
Sons N.Y. 1947
- 83.- H. Doll y colbs.- Verpaekungs.-Rundeschan nº 10 (1963)895
- 84.- R. Gutiérrez.- Grasas y Aceties 11 (1960)3
- 85.- J. Strating y A. Venema.- Journal of the Insti-
tute of Bewing LXIII nº 6 (Nov-Dic. 1961)525
- 86.- E.A. Day y colbs.- J. Dairy sci. 43 (1960)585
- 87.- B.S. Luh. y colbs.- Food Techonology 9 (1955)639
- 88.- S. Leonard y colbs.- Food Techonology 7 (1953)480
- 89.- L. Gasco y colbs. J.E.N. Comunicación presen-
tada. Simposio cromatografia ANQUE Barcelona 1968
- 90.- S.S. Chang. T. Kawada y colbs. J.A.O.C.S.
38(1961)669, 44(1967)131 y 44(1967)509
- 91.- W.F. Wilkens y F.M. Lin.- J. Agric. Food Chem18 (1970)333
- 92.- R. Barrera y colbs. CEN.Report S.P.R. 20-Madrid-1967
- 93.- H. Brandenberguer y S. Muller.- J. Chomot. 7 (1962)137
- 94.- D.M. Hin y P.G. Shewer.-J. Food Sci. 26 (1961)557
- 95.- I. Horstein y P.F. Crowe.-J.Agr.Food Chem 8 (1960)494
- 96.- W.J. Jennings.- J.Food. Sci. 26 (1961)578
- 97.- D.E. Smith y J.R. Coffman.- Anal. Chem 23 (1960)1733
- 98.- M. Vobeck y colbs.-Food.Sci. 26 (1961)569
- 99.- N.P. Wong y O.W. Parks.-J.Dairy Sci. 51 (1968)1768
- 100.- J. De Brugh y J.C.M. Schogt.-J.A.O.C.S. 38 (1961)557

- 101.- C.H. Lea y P.A. Swodoba.-J.Sci.Food Agr. 13(1962)148
- 102.- H.A. Salke y colbs.- J.A.O.C.S. 47(1970)393
- 103.- W. Nawar y colbs.- Anal. Chem. 32(1960)1534
- 104.- A. Strachi.- Ind. Agrarie VIII(1970)20
- 105.- W.J. Jennings y colbs.-J.Food. Sci. 37(1972)69
- 106.- M.E. Morgany E.A. Day.- J. Dairy Sci. 48(1965)1382
- 107.- M. Gottanf.- Z. Anal. Chem. 218(1966)175
- 108.- H. Boggs y colbs.- J. Food.Sci. 29(1964)487
- 109.- R.E. Kepner y colbs.- Anal. Chem. 36(1964)77
- 110.- R.A. Bernard.- Arch. Biochem Biphys 107(1964)137
- 111.- C. Weurman.- "Developments in Head Space
Food odour analysis. Proceedings. Inst.
Congress. Food. Sci. Tech. (1966) Public.
nº 469 Central Inst. Vol Voedingsonderzoek T.N.D.
- 112.- A. Prevot y F. Cabeza.- Rev. Frac.Corps. Grass7(1960)33
- 113.- E. Bayer y R. Widder.- Anal. Chem. 36(1964)1452
- 114.- P.A. Crnickshank y J.A. Sheehan.Anal.Chem. 36(1964)1191
- 115.- R.J. Soukup y colbs. Anal. Chem. 36(1964)2255
- 116.- L.N. Wniter y P.W. Albro.J.Gas.Chromatog. 2(1964)1
- 117.- E. Fedeli y G. Jacini.-La Chimice e L'In-
dustria. 52(1970)161
- 118.- R.G. Scholz y L.R. Plak.- J.A.O.C.S. 43(1966)596
- 119.- O. Warburg.- Biochem. Zeit. 42(1923)317
- 120.- Barcroft y J.S. Haldan.- J. Phys. 28(1902)232
- 121.- W.O. Lundberg.- R.T.Holman y colbs.- Oil&
Soap. 23(1946)10
- 122.- R.W. Wolford y colbs.- J.Food. Sci. 28(1963)320

- 123.- W. Nawar.- Food Technol 20(1966)115
- 124.- C.S. Augh y colbs.- J. Food. Sci. 29(1964)499
- 125.- J.L. Magnen. Vocabulaire Technique des caracteres organoleptiques et les degustation des produits alimentaires C.N.R. Sc.
15 Anatole France, Paris (1962)
- 126.- J. Timmermans.- Nature 174(1954)235
- 127.- S.J. Hawkes y M.D. Wheaton.- J. Food Sci. 32(1967)629
- 128.- J.J. Powers.- Food Technol 22(1968)383
- 129.- R.A. Fischer.- Metodos Matematicos para investigadores. Aguilar, Madrid Pag. 260
- 130.- L.L. Young y colbs.- J. Food Sci. 35(1970)219
- 131.- L. Milutonic y colbs.- J. Food Sci. 35(1970)224

