



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado



EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y ADEREZADO CON PLANTAS AROMÁTICAS MEDIANTE MARCADORES VOLÁTILES



Autor: Ana Alcalá Galán





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Analítica

Grado en Farmacia

**EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE
OLIVA VIRGEN Y ADEREZADO CON PLANTAS AROMÁTICAS
MEDIANTE MARCADORES VOLÁTILES**

Trabajo Fin de Grado
Trabajo experimental

Autor: Ana Alcalá Galán

Tutor: María Teresa Morales Millán

Co-tutor: María Dolores Hernanz Vila

Sevilla, 4 de Julio de 2016

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Aceite de oliva: Definición y clasificación	3
1.2. Composición	4
1.3. Compuestos volátiles	5
1.4. Vida útil del aceite de oliva (“Shelf-life”)	8
1.5. Aceite de oliva virgen aromatizado	11
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1. Muestras	14
3.2. Reactivos y materiales	14
3.3. Aparatos e instrumentos	15
3.4. Metodología	16
3.4.1. Determinación del Índice de Acidez	16
3.4.2. Determinación del Índice de Peróxidos	16
3.4.3. Determinación de K_{232} y K_{270}	16
3.4.4. Análisis de compuestos volátiles	17
3.4.5. Tratamiento de datos	18
4. Resultados y discusión	20
4.1. Parámetros fisicoquímicos	20
4.2. Análisis de volátiles	21
4.2.1. Aceite de oliva virgen	21
4.2.2. Hierbas aromáticas	21
4.2.3. Vida útil del aceite de oliva virgen	23
4.2.4. Vida útil del aceite de oliva virgen aderezado	28
5. Conclusiones	31
6. Bibliografía	32
7. Anexo	36

RESUMEN

Los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen (VOO) son los responsables de su aroma, algunos de ellos originan las notas sensoriales frutadas y verdes propias de los VOO de calidad, como es el caso de los compuestos de 5 y 6 átomos de carbono, y otros originan defectos sensoriales, como la rancidez, provocando el rechazo por parte del consumidor. La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles permite conocer la vida útil del VOO como indicador del proceso de oxidación y de la aparición de defectos sensoriales.

Se ha aplicado un método analítico, basado en espacio de cabeza dinámico-cromatografía de gases, al estudio de la vida útil del VOO, almacenado durante 6 meses, observándose desde el tercer mes un aumento significativo de los compuestos característicos de la rancidez, que actúan como marcadores volátiles, tales como aldehídos insaturados, saturados y ácidos.

Por otro lado, se han adicionado plantas aromáticas al aceite para evaluar la vida útil del VOO, observándose la modificación de sus propiedades sensoriales y un retraso del proceso oxidativo. Las plantas empleadas en este estudio han sido romero y albahaca. Se ha realizado la identificación de su perfil de volátiles siendo de destacar la presencia de hidrocarburos y compuestos terpénicos.

A lo largo del almacenamiento se produce una transferencia de compuestos terpénicos al aceite desde el primer mes de almacenamiento, lo que se ha confirmado mediante análisis descriptivo cuantitativo. El análisis sensorial demuestra la presencia de atributos sensoriales propios de la albahaca y el romero en las muestras aderezadas y un aumento del atributo rancio en el aceite de oliva virgen.

Palabras clave: aceite de oliva virgen, compuestos volátiles, vida útil, romero, albahaca.

ABSTRACT

Volatile compounds present in virgin olive oils gives rise to the sensory attributes that describe its delicate aroma, some of them are responsible for the green sensory notes, which appear in high quality VOO, such as the C6 and C5 compounds. However, other compounds reach higher concentrations in the aroma of VOO affected by sensory defects, such as rancid, producing consumer's rejection. That explains why the identification and quantification of volatile compounds allow evaluating the shelf-life of the VOO, as markers of the oxidative processes and sensory defects.

An analytical method, based on dynamic headspace-gas chromatography, has been applied to study the shelf-life of VOO stored for 6 months. From the third month of storage increased significantly the concentration of the characteristic compounds of rancidity, such as unsaturated aldehydes and acids saturated.

On the other hand, aromatic plants were added to olive oil to evaluate the shelf-life. Changes in the sensory properties and a delay of the oxidative process were detected. The plants used in this study were rosemary and basil. Their volatile profile was identified being noteworthy the presence of hydrocarbons and terpene compounds.

During storage, terpene compounds were transferred to the oil since the first month, which was confirmed later by quantitative descriptive analysis. The sensory analysis showed the presence of sensory attributes from basil and rosemary in the seasoned samples, and an increase of rancid attribute in virgin olive oil.

Keywords: virgin olive oil, volatile compounds, shelf-life, rosemary, basil.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aceite de oliva: Definición y clasificación

Según el Consejo Oleícola Internacional, el aceite de oliva puede definirse como el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Éste puede comercializarse de distintas formas, según las denominaciones y definiciones siguientes:

- Aceite de oliva virgen (VOO): es aquel obtenido por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, y que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Los aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen incluyen:
 - ✓ Aceite de oliva virgen extra, cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos.
 - ✓ Aceite de oliva virgen, cuya acidez libre es como máximo de 2 gramos por 100 gramos.
 - ✓ Aceite de oliva virgen corriente, cuya acidez libre es como máximo de 3,3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva virgen lampante: es el aceite de oliva virgen no apto para el consumo en la forma en que se obtiene y cuya acidez libre es superior a 3,3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva refinado: es obtenido de los aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado, cuya acidez libre es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva: constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo. Su acidez libre es como máximo de 1 gramo por 100 gramos.

El consumo del aceite de oliva es cada vez mayor debido a su uso en la Dieta Mediterránea (Figura 1) por el efecto beneficioso que ejerce sobre la salud (Angerosa y cols., 2004; Carrasco-Pancorbo y cols., 2005; Samaniego-Sánchez y cols., 2012). Concretamente, permite prevenir enfermedades relacionadas con el daño oxidativo, como pueden ser las

enfermedades cardiovasculares o el cáncer. Este papel protector propio del VOO se debe a su composición específica, principalmente a la elevada proporción de ácidos grasos monoinsaturados (como el ácido oleico) y la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y componentes menores como los tocoferoles y los compuestos fenólicos, los cuales actúan como antioxidantes naturales (Nenadis y cols., 2010; Samaniego-Sánchez y cols., 2012; Condelli y cols., 2015).

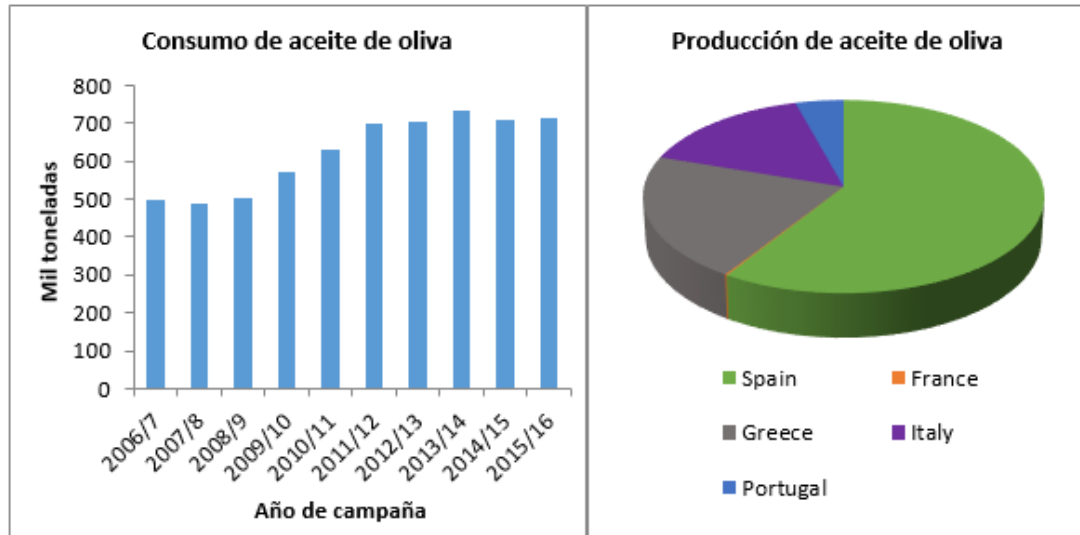


Figura 1. A la izquierda se muestra el incremento anual del consumo del aceite de oliva en países tradicionalmente no productores y a la derecha el nivel de producción de países europeos en la campaña 2015/16.

1.2. Composición

El aceite de oliva está constituido por dos fracciones, la fracción saponificable, que constituye aproximadamente el 98 % del aceite; y la fracción insaponificable, cuya presencia normalmente es inferior al 2 % y que resulta verdaderamente útil en la autenticación del aceite (Morales y León-Camacho, 2000; Escuderos, 2011). La Tabla 1 recoge la composición general de cada una de estas fracciones.

Tabla 1. Composición del aceite de oliva virgen.

FRACCIÓN SAPONIFICABLE	FRACCIÓN INSAPONIFICABLE
Triacilgliceroles	Hidrocarburos (principalmente Escualeno)
Diacilgliceroles	Tocoferoles (α -tocoferol)
Ceras	Alcoholes con estructura triterpénica
Ésteres de esteroides	4,4-Metil-esteroides
Alcoholes terpénicos	Esteroides (β -Sitosterol y Δ^5 -avenasterol)
Ácidos grasos libres	Dialcoholes terpénicos (Eritrodiol y Uvaol)
	Compuestos fenólicos y flavonoides

	Pigmentos (clorofilas y carotenoides)
	Compuestos volátiles

Los constituyentes no volátiles del aceite de oliva son los responsables del efecto beneficioso sobre la salud y, respecto a las características organolépticas, los compuestos volátiles son los responsables del aroma y los compuestos fenólicos influyen más en el sabor, dando lugar a la percepción amarga y picante, la astringencia y los atributos metálicos (Angerosa y cols., 2004; Sinesio y cols., 2015; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015).

1.3. Compuestos volátiles

Se entiende por flavor la suma de todas aquellas características detectadas al emplazar un alimento en la boca, sensaciones percibidas principalmente a través de los sentidos del gusto y el olfato, pero también por los receptores táctiles y dolorosos alojados en la boca, que son recibidas e interpretadas por el cerebro. El flavor del VOO es un factor fundamental para la aceptabilidad por parte del consumidor, es por ello por lo que la identificación de los compuestos que contribuyen a su aroma, es decir, los compuestos volátiles, se considera clave para el control de calidad, de autenticación y de vida útil del VOO (Escuderos, 2011; Gomes y cols., 2012; Zhu y cols., 2015).

La fracción volátil del VOO está constituida por compuestos carbonílicos, alcoholes, ésteres e hidrocarburos, y su composición podría asociarse tanto con los atributos positivos como con los defectos sensoriales (Angerosa y cols., 2004; Procida y cols., 2015). Sin embargo, si la concentración de compuestos volátiles está por debajo de su umbral de olor no van a contribuir al aroma aunque pueden ser de utilidad como parámetros de trazabilidad. No siempre es verdad que los compuestos volátiles presentes en mayor concentración son los principales contribuyentes del aroma debido a que factores químicos como la volatilidad, el carácter hidrofóbico, el tamaño, la forma, la estructura funcional de las moléculas, el tipo y la posición de los grupos funcionales parecen afectar más a la intensidad del olor que su concentración (Angerosa y cols., 2004; Binniecka y Caroli, 2011).

La mayor parte de la fracción volátil del VOO de alta calidad está constituida por compuestos de 5 y 6 átomos de carbono, especialmente por compuestos insaturados lineales de 6 átomos de carbono y aldehídos saturados (Morales y Tsimidou, 2000; Angerosa y cols., 2004; Gomes y cols., 2012; Morales y cols., 2013; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015). De entre estos compuestos, los aldehídos y alcoholes de 6 átomos de carbono y sus correspondientes ésteres (que constituyen el 60-80 % de los volátiles presentes) junto con los compuestos de 5

átomos de carbono son los principales responsables de las notas sensoriales verdes del VOO, que es determinante en la percepción de la calidad por parte del consumidor (Escuderos, 2011; Gomes y cols., 2012; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015; (Zhu y cols., 2016).

No obstante, la formación de nuevos compuestos volátiles como aldehídos monoinsaturados de entre 7 y 11 átomos de carbono, dienos de entre 6 y 10 átomos de carbono, aldehídos y alcoholes ramificados de 5 átomos de carbono, o algunas cetonas de 8 átomos de carbono alcanzan grandes concentraciones en el VOO con defectos sensoriales (Angerosa y cols., 2004; Morales y cols., 2005; Gomes y cols., 2012; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015)

Los compuestos volátiles se pueden producir por distintas vías, entre las que destacan las rutas biosintéticas, que son las responsables de la producción de los compuestos volátiles presentes en los aceites de calidad, y los procesos autoxidativos y fermentativos que dan lugar a los volátiles responsables de los defectos sensoriales (Angerosa y cols., 2004; Gomes y cols., 2012). La Figura 2 resume las distintas rutas por las que pueden producirse los compuestos volátiles:

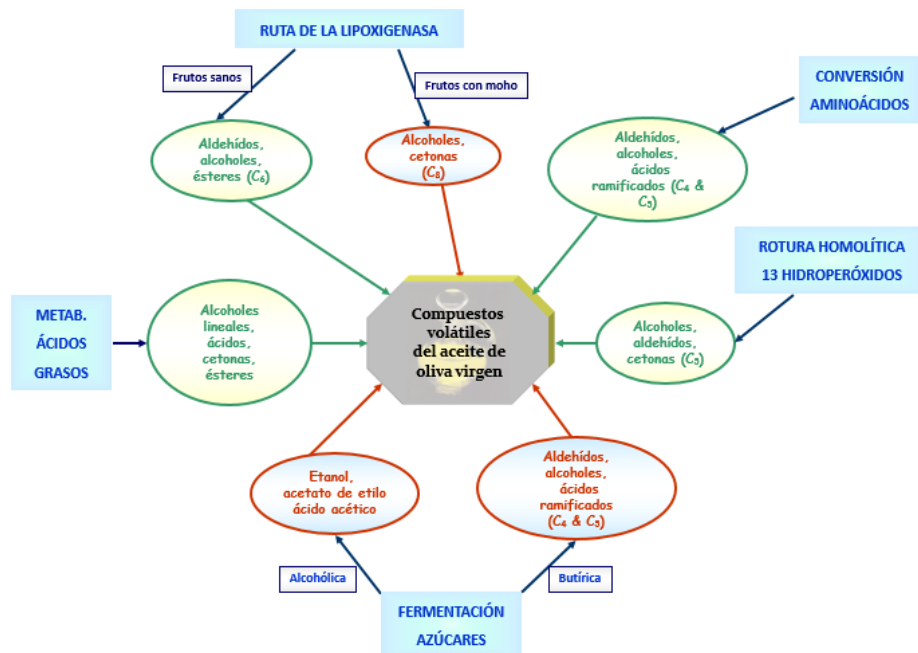


Figura 2. Rutas implicadas en la obtención de compuestos volátiles. En rojo se muestran los compuestos responsables de los defectos sensoriales y en verde los presentes en los VOO de calidad.

Las rutas biosintéticas son (Morales y cols., 2013):

- Metabolismo lipídico:
 - Metabolismo de ácidos grasos: durante la maduración el fruto desarrolla la capacidad de convertir algunos de esos ácidos grasos en ésteres, cetonas y alcoholes (Morales y cols., 2013).

- Ruta de la lipoxigenasa (LOX) (Figura 3): es la vía por la que se obtienen los compuestos de 5 (1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, 3-pentanona, pentanal, E-2-pentenal, Z-2-penten-1-ol) y 6 átomos de carbono (hexanal, hexan-1-ol, hexil acetato, Z-3-hexenal, E-2-hexenal, E-2-hexen-1-ol, Z-3-hexen-1-ol, Z-3-hexenil acetato), por lo que la concentración de estos dependerá del nivel y la cantidad de enzimas implicadas en esta vía (Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015). La ruta parte de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y el linolénico, sobre los que actúa la enzima LOX, dando lugar a la formación de 9- y 13-hidroperóxidos. A su vez, los 13-hidroperóxidos permiten la formación de aldehídos de 6 átomos de carbono por la acción de enzimas específicas hidroperóxido liasas, y aquellos que sean insaturados pueden isomerizarse y pasar de la forma cis-3 a la trans-2, que es más estable. Posteriormente, estos aldehídos pueden reducirse por la intervención de la enzima alcohol deshidrogenasa obteniéndose sus alcoholes correspondientes, que por la acción de la enzima alcohol acetil transferasa pueden dar lugar a la formación de ésteres. Sin embargo, una rama adicional de la vía de la LOX se activa cuando el sustrato es el ácido linolénico, en este caso la LOX catalizaría aparte de la formación de los hidroperóxidos, su escisión a través de un radical alcoxilo, dando lugar a la formación de radicales 1,3-penteno estables. Este último puede dimerizarse y dar lugar a hidrocarburos de 10 átomos de carbono o reaccionar con un radical hidroxilo presente en el medio dando lugar a alcoholes de 5 átomos de carbono, los cuales pueden ser oxidados enzimáticamente a sus correspondientes compuestos carbonílicos de 5 átomos de carbono (Angerosa y cols., 2004; Gomes y cols., 2012).

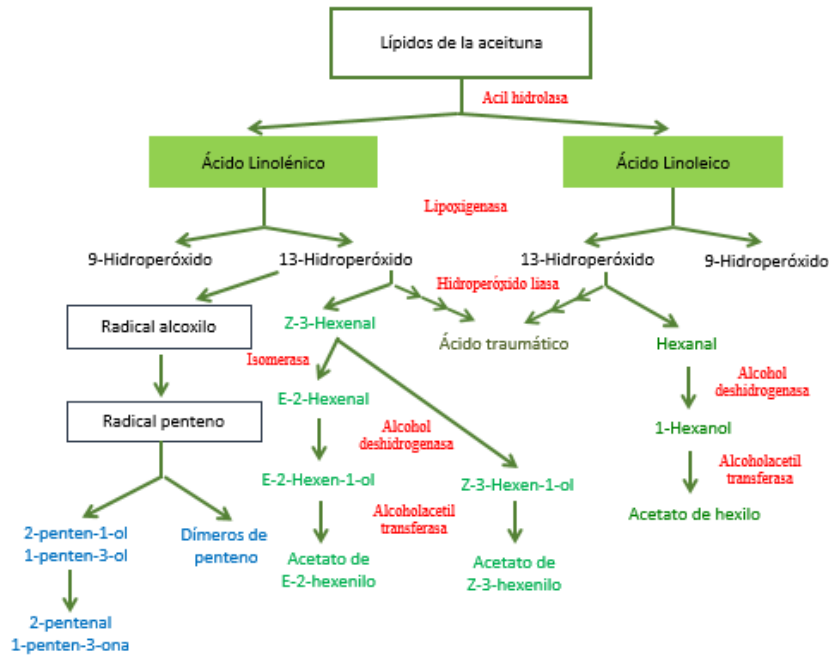


Figura 3. Producción de compuestos volátiles a través de la ruta de la lipoxigenasa.

- Metabolismo de los aminoácidos: el esqueleto de la estructura de algunos compuestos volátiles deriva de la cadena ramificada de aminoácidos como leucina, isoleucina y valina (Morales y Przybylski, 2000; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015).

El hecho de que predomine una ruta u otra depende de la calidad del fruto, del mecanismo de extracción y de las condiciones de almacenamiento. Cuando la vía más activa es la ruta de la LOX el aroma no es defectuoso ya que ésta es la vía predominante en los aceites de calidad (Morales y cols., 1997; Gomes y cols., 2012).

1.4. Vida útil del aceite de oliva (“Shelf-life”)

La formación de productos volátiles por la oxidación en el VOO es de gran interés para la industria ya que el desarrollo de sabores indeseables reduce el tiempo de vida útil de estos productos, o los convierte en no aptos para el consumo humano. El principal motivo para desechar el VOO es la rancidez, que se puede deber tanto a la auto-oxidación como a la fotooxidación (M.T. Morales y R. Przybylski, 2000; Cecchi y cols., 2010; Samaniego-Sánchez y cols., 2012; Faria y cols., 2015).

Los procesos que contribuyen de forma más importante al deterioro del aceite y que llevan a una transformación radical tanto en su valor nutricional como en su calidad sensorial

son (Bendini y cols., 2010; Genovese y cols., 2015; Sinesio y cols., 2015; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015):

- Lipólisis: tiene lugar dentro del fruto.
- Oxidación lipídica: ocurre durante la elaboración del aceite y el almacenamiento e incluye los procesos de autooxidación y foto-oxidación. La oxidación lipídica ocurre a través de la interacción de los ácidos grasos de los triacilgliceroles con oxígeno molecular dando lugar a la formación de hidroperóxidos por un mecanismo de radicales libres. La presencia de trazas de metales de transición o la exposición a la luz pueden catalizar la descomposición de los hidroperóxidos, que son los productos de oxidación primaria, produciendo compuestos volátiles y no volátiles. Algunos de estos compuestos volátiles, principalmente aldehídos, son los responsables del defecto sensorial rancio (Bendini y cols., 2010; Faria y cols., 2015; Garrido-Delgado y cols., 2015; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015).

El grado de oxidación puede evaluarse mediante la determinación del índice de peróxidos, absorbancia UV y el análisis sensorial. Un aumento en los ácidos grasos libres, en el índice de peróxidos y los coeficientes de extinción indican oxidación por el efecto de algunas de las condiciones de almacenamiento o procesamiento inadecuado (Garrido-Delgado y cols., 2015). Sin embargo, los defectos sensoriales son percibidos antes de que los cambios se observen en los parámetros de calidad, es por ello por lo que resulta importante realizar un análisis minucioso de la fracción volátil para poder detectar los estadios iniciales del deterioro del VOO (Raffo y cols., 2015).

La elevada estabilidad oxidativa del aceite de oliva se debe fundamentalmente a su composición en ácidos grasos, elevada en ácidos grasos monoinsaturados, y a la presencia de antioxidantes. Sin embargo, a pesar de su elevada estabilidad, el aceite de oliva virgen es también muy susceptible a la oxidación (Faria y cols., 2015; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015), y al comenzar el proceso de oxidación se detectan ciertos compuestos volátiles responsables de los defectos sensoriales asociados con la rancidez (Morales y cols., 1997; Psomiadou y Tsimidou, 2002). Es por eso por lo que se puede conocer el avance del proceso de la oxidación debido al incremento de los compuestos volátiles y la concentración de ciertos volátiles específicos, observándose diferencias tanto cualitativas como cuantitativas (Morales y cols., 1997; Samaniego-Sánchez y cols., 2012). Esto puede explicarse debido a sus distintos orígenes, los volátiles son de origen bioquímico fundamentalmente en el caso de los aceites con flavor agradable y de origen químico en los de flavor desagradable (Sinesio y cols., 2015).

Los compuestos que contribuyen al defecto sensorial rancio son los aldehídos saturados de entre 5 y 10 átomos de carbono y monoinsaturados, dienos de entre 6 y 9 átomos de carbono y ácidos carboxílicos. Los aldehídos insaturados 2-heptenal, 2-octenal y 2-decenal pueden considerarse los contribuyentes principales al defecto rancio, seguidos de aldehídos saturados como pentanal, hexanal, heptanal, octanal y nonanal. Además también contribuyen al perfil sensorial rancio los ácidos acético, butanoico y hexanoico (Morales y cols., 1997; Kotsiou y Tasioula-Margari, 2015). De entre los aldehídos saturados, el nonanal y el hexanal aumentan en paralelo con el proceso oxidativo, pero el hexanal no puede considerarse un indicador del proceso oxidativo porque también está presente en el aroma de los aceites de oliva virgen de calidad y se obtiene por la ruta de la LOX (Angerosa y cols., 2004; Bendini y cols., 2010; Genovese y cols., 2015). La medida de nonanal sí es exclusivo de los aceites oxidados (Morales y cols., 1997). Además, durante este tiempo también se produce una disminución de la concentración de compuestos fenólicos, lo que produce una disminución de la calidad tanto nutricional como sensorial (Genovese y cols., 2015).

Para mantener el contenido en compuestos fenólicos y volátiles responsables de las óptimas características organolépticas y propiedades nutricionales durante su almacenamiento, es esencial controlar todos los factores que promuevan la oxidación lipídica. La composición del VOO puede verse afectada por las condiciones climáticas, la madurez del fruto, el proceso de extracción y las condiciones de almacenamiento (Aparicio y Luna, 2002; Cecchi y cols., 2010; Gomes y cols., 2012; Samaniego-Sanchez y cols., 2012; Condelli y cols., 2015). Por tanto, la calidad del VOO dependerá de:

- El material de la botella y la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza. (Faria y cols., 2015). El espacio de cabeza va aumentando de forma gradual durante su consumo, introduciendo una nueva atmósfera de oxígeno (Cecchi y cols., 2010; Genovese y cols., 2015).
- Temperatura de almacenamiento: la oxidación aumenta de forma exponencial con la temperatura (Bendini y cols., 2010).
- Exposición a la luz: inicia la autooxidación y produce la foto-oxidación. Los fotosensibilizadores como la clorofila se excitan por absorción de la luz y transfieren la energía a un oxígeno triplete produciendo oxígeno singulete, los cuales reaccionarán con los ácidos grasos insaturados (Psomiadou y Tsimidou, 2002).

- Factores químicos: la oxidación se ve influenciada por la composición química, tanto los compuestos mayoritarios como los minoritarios, incluidos los productos de oxidación, pueden tener actividad pro- o antioxidante.
 - Triacilgliceroles: la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación aumenta conforme aumenta el nivel de insaturación de los ácidos grasos (Bendini y cols., 2010).
 - Ácidos grasos libres, como el ácido oleico, que tiene efecto pro-oxidante (Bendini y cols., 2010).
 - Trazas de metales: los metales de transición, principalmente hierro y cobre, pueden catalizar la descomposición de los hidroperóxidos iniciando la cadena de oxidación de radicales libres (Bendini y cols., 2010).
 - Pigmentos: los carotenoides y especialmente los β -carotenos son protectores efectivos frente a la foto-oxidación, ya que actúan como filtro de la luz (Frankel, 2010; Samaniego-Sánchez y cols., 2012).
 - Degradación de los constituyentes minoritarios: es el caso de α -tocoferol (Psomiadou y Tsimidou, 2002) y compuestos fenólicos, que frenan la oxidación lipídica (Condelli y cols., 2015). Los principales cambios en su concentración se asocia con el mayor nivel de oxígeno en la porción vacía de la botella (Bendini y cols., 2010; Faria y cols., 2015).

1.5. Aceite de oliva virgen aromatizado

Los aceites de oliva aromatizados son aquellos que son procesados junto con plantas, especias o hierbas para mejorar su valor nutricional, modificar sus características sensoriales o prolongar el tiempo de vida útil del mismo (Issaoui y cols., 2011).

Las plantas aromáticas presentan propiedades antimicrobianas y antioxidantes debido a su composición (Baiano y cols., 2009; Zunin y cols., 2010), lo que hace que aumente el interés en su uso como fuente de antioxidantes naturales. Por ello, su adición al aceite puede prolongar su vida útil, previniendo de la oxidación y de la producción de atributos sensoriales indeseables ya que la adición de estas hierbas al aceite conlleva el aumento en compuestos fenólicos del mismo y de la estabilidad oxidativa (Baiano y cols., 2009) y mejora las notas sensoriales del VOO, siendo los aceites aromatizados mucho más apreciados por los consumidores (Morales y

cols., 2005). No obstante, su concentración debe ser baja o moderada para poder ser aceptado por los consumidores y evitar sobre-aromatización (Nenadis y cols., 2010; Sousa y cols., 2015).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado consiste en el estudio de la vida útil del VOO mediante la determinación de compuestos volátiles en muestras de aceites monovarietales almacenadas durante un periodo de tiempo en las condiciones habituales de uso:

- Determinación de los parámetros de calidad en cada una de las muestras almacenadas para clasificarlas en su categoría.
- Determinación de los compuestos volátiles presentes en las muestras mediante la aplicación de un método analítico basado en espacio de cabeza dinámico y cromatografía de gases (DHS (Tenax) - GC). Se llevará a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos responsables del aroma y así poder establecer marcadores de la vida útil del VOO.
- Estudiar el efecto que ejercen distintas especies vegetales tales como romero y albahaca en el VOO, y evaluar su capacidad para prolongar la vida útil y modificar las percepciones organolépticas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una muestra comercial de Aceite de Oliva Virgen extra, variedad Manzanilla, perteneciente a la campaña 14/15. Para la realización del estudio de la vida útil se tomaron diferentes porciones de 100 ml de la muestra, que se envasaron en recipientes de 100 ml de cristal transparente con tapón de rosca (Figura 4), a los recipientes se les dejó el mismo volumen de espacio de cabeza con el fin de que todos ellos tuvieran la misma cantidad de aire en el mismo y estuvieran en las mismas condiciones durante el estudio. Todos los recipientes se situaron en una estantería a temperatura ambiente y estuvieron sometidos a periodos naturales de luz/oscuridad durante 6 meses (de Enero a Junio) (Figura 4). Cada mes se realizó el desmuestre correspondiente de forma que en un intervalo de 1 mes se llevó a cabo el análisis de compuestos volátiles de cada una de las muestras así como la determinación de los parámetros de calidad correspondientes. Para cada mes de análisis se prepararon 3 lotes de muestras:

- Lote nº 1: conteniendo solo el aceite.
- Lote nº 2: conteniendo el aceite adicionado de hojas de romero secas al 5% p/p.
- Lote nº 3: conteniendo el aceite adicionado de hojas de albahaca secas al 5% p/p.



Figura 4. Recipientes conteniendo las muestras.

Para ello, previamente las hojas se secaron en estufa a 60 °C durante 10 horas y se filtró el aceite empleando papel de filtro plegado 1320 (Filtros Anovia, S.A. Barcelona, España).

Se analizó el aceite ya filtrado sin almacenar, las hojas en fresco y secas, y cada uno de los lotes mensuales.

3.2. Reactivos y materiales

3.2.1. Determinación del Índice de Acidez

- Reactivos: Ácido benzoico, Hidróxido de potasio (KOH), Etanol 96%, Éter etílico y Fenolftaleína.

- Materiales: matraz aforado de 100 mL, pesasustancias, Erlenmeyer de 250 mL, vaso de precipitados de 100 mL y bureta de 25 mL.

3.2.2. Determinación del Índice de Peróxidos

- Reactivos: Almidón soluble, agua milliQ (Mili-Q, Millipore®), Tiosulfato sódico pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Ácido clorhídrico (HCl), Yoduro potásico (IK), Yodato potásico (KIO_3), Cloroformo y Ácido acético glacial.

- Materiales: matraz de fondo redondo de 250 mL y bureta de 25 mL.

3.2.3. Determinación de K_{232} y K_{270}

- Reactivos: Ciclohexano.

- Materiales: matraz aforado de 25 mL y cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico.

3.2.4. Análisis de compuestos volátiles

- Reactivos: Acetato de isobutilo.

- Materiales: micropipeta Gilson® de hasta 200 μL de capacidad (Francia), viales de vidrio de 20 ml (Anorsa, Barcelona, España) con tapones de aluminio-estaño de 10 mm \varnothing con septum de silicona de 10 mm \varnothing \times 3 mm de grosor (Tecknokroma, Barcelona, España), encapsulador y descapsulador (Tecknokroma, Barcelona, España).

3.3. Aparatos e instrumentos

3.3.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos

3.3.1.1. Aparatos

- Balanza analítica Mettler AT 200.
- Balanza granatario Mettler PM 2000.

3.3.1.2. Instrumentos

- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent® 8453 (Agilent Technologies®).

3.3.2. Análisis de compuestos volátiles

3.3.2.1. Aparatos

- Balanza analítica Mettler AT 200.

- Teledyne Tekmar HT3™ Headspace Autosampler con trampa adsorbente TenaxTA™ (Espacio de cabeza dinámico) (Teledyne Technologies®).

3.3.2.2. Instrumentos

- Cromatógrafo de gases (GC-FID) Varian 3900 GC (Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) con columna capilar TRB-WAX de sílice fundida (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Teknokroma, Barcelona, España).
- Cromatógrafo de gases 7820A Agilent Technologies® acoplado a espectrómetro de masas Serie MSD 5975 Agilent Technologies® (GCMS) (Santa Clara, CA) con analizador cuadrupolo y fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV). El cromatógrafo tiene un inyector split-splitless adaptado para SPME y una columna capilar TRB-WAX de sílice fundida descrita anteriormente.

3.4. Metodología

Cada análisis se realizó por duplicado, y el análisis de cada muestra comprendía:

3.4.1. Determinación del Índice de Acidez

Se realizó una volumetría ácido-base según el procedimiento descrito en el Reglamento (CEE) Nº 2568/91 de la Comisión de 11 de Julio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Si la muestra presenta un grado de acidez superior a 0,8 ° el aceite es considerado lampante.

3.4.2. Determinación del Índice de Peróxidos

Se realizó una volumetría de oxidación-reducción según el procedimiento descrito en el Reglamento (CEE) Nº 2568/91 de la Comisión de 11 de Julio de 1991. Para que la muestra sea considerada aceptable tiene que presentar un Índice de Peróxidos inferior a 20 meq O₂/Kg.

3.4.3. Determinación de K₂₃₂ y K₂₇₀

Se pesan aproximadamente 0,2 g de aceite en matraz aforado de 25 mL y se enrasa con ciclohexano. A continuación, con el espectrofotómetro se miden las absorbancias a 232 y 270 nm, frente a ciclohexano como blanco. Finalmente se procedió al cálculo de los coeficientes de extinción, que actúan como indicadores de la oxidación secundaria, indicando la presencia de dienos y trienos conjugados. Para que la muestra sea considerada de calidad, según el Reglamento Nº 1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) Nº 2568/91, el coeficiente de extinción a 232 nm debe ser menor de 2,5 y el medido a 270 nm debe ser inferior a 0,22.

3.4.4. Análisis de compuestos volátiles

El análisis de compuestos volátiles incluyó cuatro fases: preconcentración, aislamiento, separación e identificación y cuantificación.

3.4.4.1. *Técnica de espacio de cabeza dinámico (DHS)*

Se empleó como técnica para preconcentrar los compuestos volátiles, es un método de enriquecimiento para evitar trabajar cerca del límite de cuantificación del método cromatográfico. Para ello se pesaron 1,5 g de cada muestra de aceite y 150 μ L del patrón interno (acetato de isobutilo sobre una matriz de aceite refinado a una concentración exacta de 60 ppm) en viales de vidrio de 20 mL de capacidad. A continuación, el vial se introduce en el dispositivo de espacio de cabeza dinámico (DHS-Tekmar) (Figura 5). El proceso que tiene lugar en su interior consta de distintas etapas:

- Pre calentamiento del vial a 40 °C durante 18 minutos.
- Agitación durante 15 minutos.
- Barrido de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza hacia la trampa adsorbente TenaxTA™ durante 35 minutos a un flujo de 5 mL/min.
- Desorción de los compuestos presentes hacia el cromatógrafo de gases a una temperatura de 225 °C durante 5 minutos.

3.4.4.2. *Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)*

La desorción de los compuestos volátiles se llevó a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases (Figura 5), en modo splitless, calentado a 260 °C durante 5 minutos. Se empleó hidrógeno como gas portador, con una presión en cabeza de 20 psi y un flujo constante de 1,5 ml/min y nitrógeno como gas auxiliar. La temperatura inicial del horno es de 35 °C, que se mantiene en isoterma durante 10 minutos, pasado ese tiempo se aplica una programación de temperatura con rampa de 3 °C/min hasta alcanzar los 200 °C, temperatura que se mantiene en isoterma durante 1 minuto, durando todo el proceso un total de 66 minutos. La temperatura del detector se fija a 280 °C y los resultados se almacenan mediante el programa Star Chromatography Workstation, System Control versión 6 (Palo Alto, CA).



Figura 5. DHS-Tekmar acoplado a GC-FID.

3.4.4.3. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

El procedimiento de preconcentración de la muestra es microextracción en fase sólida. Se inicia pesando 2 g de aceite de oliva en un vial de 30 ml que se calientan a 40 °C durante 10 minutos, bajo agitación, en un dispositivo manual de muestreo de espacio de cabeza estático. Una vez alcanzado el equilibrio, se introduce la fibra en el vial durante 40 minutos. La desorción de los compuestos volátiles se lleva a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases, en modo splitless, que se calienta durante 5 minutos a 280 °C. La temperatura del detector se fija a 300 °C y la línea de transferencia a 280 °C. El gas portador es hidrógeno, con una presión en cabeza de 4,97 psi a flujo constante de 0,9 ml/min y el gas auxiliar es nitrógeno. El programa de control de horno es igual al que se sigue en el método anterior. El espectrómetro de masas trabaja en modo Scan con una sensibilidad ajustada a un rango de masas de 40-300. La información de las muestras se almacena mediante el programa Enhanced Chemstation MSD ChemStation E.02.02.1431. La identificación se lleva a cabo con la librería WILEY 7 (John Wiley & Sons Limited, NJ).

3.4.5. Tratamiento de datos

Para llevar a cabo el tratamiento de datos se ha utilizado el programa Excel como interfaz entre la información proporcionada por el software de los instrumentos analíticos y el programa estadístico Statistica versión 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK). En el trabajo se han usado procedimientos estadísticos univariantes y multivariantes.

El análisis exploratorio de los datos permite facilitar su interpretación y extraer la máxima información posible. Esta etapa implica algunos algoritmos estadísticos univariantes y el cálculo de diferentes parámetros para evaluar las características de las poblaciones de datos obtenidos (media, varianza, coeficiente de variación, desviación estándar, etc.), la detección de

datos anormales (“outliers”), la evaluación de los parámetros relacionados con la calidad de los procedimientos analíticos así como el uso de algoritmos básicos como gráficos Box-Whisker, o gráficos de barras. Este estudio, también conocido como pretratamiento de datos, es fundamental para no obtener conclusiones erróneas u obvias.

El objetivo de la estadística multivariante consiste en analizar simultáneamente numerosas variables. Los procesos multivariantes se dividen en dos grandes grupos, descriptivos (no supervisado) y explicativos (supervisado). En el primer caso, no existe ninguna hipótesis previa que clasifique o defina las muestras. En el caso de los procedimientos supervisados, existe una hipótesis apriorística o son simplemente modelos de dependencia que pueden englobarse dentro de la teoría general de la regresión. En el trabajo se ha utilizado el análisis de la varianza y el análisis de agrupamiento o análisis de “clusters”.

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que al menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés.

El análisis de agrupamiento, también llamado “cluster”, es un término genérico para los métodos diseñados para la compresión de la información contenida en una matriz de datos, con la finalidad de describir las similitudes y diferencias entre objetos, y agrupar los objetos similares dentro de categorías. El “cluster” es una colección de varios algoritmos que sitúan las muestras o casos en diferentes grupos. Existen diferentes tipos de análisis de clusters, en este trabajo se ha usado el análisis de agrupamiento (“cluster”) de tipo arborescente. Este agrupamiento se basa en dos tipos de procedimientos: medidas de la distancia y reglas de amalgamamiento. La distancia de unión utilizada en la construcción de los “cluster” fue la distancia “Manhattan”, que corresponde a la diferencia media entre las dimensiones y amortigua el efecto de los datos aberrantes (“outliers”). Como regla de amalgamamiento se eligió el algoritmo de Ward, que usa el análisis de la varianza para evaluar las distancias entre los grupos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros fisicoquímicos

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos para cada muestra respecto a los parámetros de calidad, como son el índice de acidez, los coeficientes de extinción a 232 y 270 nm, y el índice de peróxidos. El Anexo recoge los valores medios de los parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de aceite.

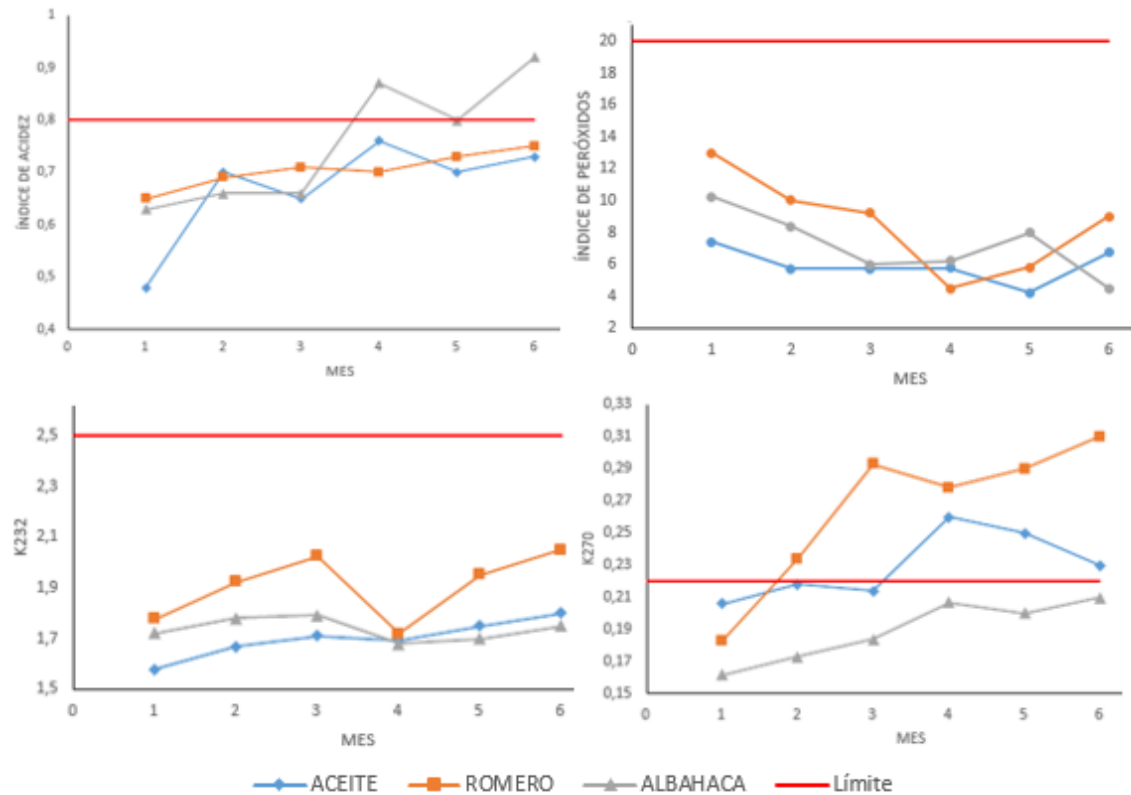


Figura 6. Resultados del análisis de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de VOO, aderezadas con romero y aderezadas con albahaca.

Como se puede observar en la Figura 6, todos los valores obtenidos del índice de acidez son inferiores a 0,8 ° a excepción de la muestra de aceite adicionado de albahaca a partir del cuarto mes, por tanto, todos serían considerados aptos para el consumo salvo esta última, que se consideraría aceite lampante.

En lo referente al índice de peróxidos podemos afirmar que todas las muestras analizadas son de calidad ya que los valores obtenidos son inferiores a 20 meq O₂/Kg.

Respecto a los coeficientes de extinción, para k₂₃₂ todos los valores son inferiores a 2,5, lo que indica que la cantidad de dienos conjugados presentes en la muestra es aceptable; sin embargo, los valores obtenidos a partir del segundo mes en las muestras adicionadas de romero y del cuarto mes en las muestras de aceite para k₂₇₀ sí superan el límite establecido en 0,22, por

lo que habría un exceso de trienos conjugados, indicando la existencia de procesos oxidativos, el cual se ve retrasado en las muestras adicionadas de albahaca.

4.2. Análisis de compuestos volátiles

4.2.1. Aceite de oliva virgen

El método utilizado para el análisis de volátiles había sido previamente validado (Fernández-Figueroa, 2014) mostrando valores de los parámetros de calidad (exactitud, precisión, linealidad y rangos de trabajo, límite de detección y cuantificación, sensibilidad y selectividad) adecuados para la determinación de estos compuestos en aceite de oliva virgen. Una vez identificados los compuestos volátiles, se llevó a cabo su cuantificación utilizando para ello las rectas de calibrado correspondientes, que se construyeron utilizando el método del patrón interno. La Figura 7 muestra algunas de las rectas de calibrado utilizadas para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos volátiles, donde se muestran sus coeficientes de correlación. Hay que destacar que corresponden a compuestos situados en diferentes zonas del cromatograma, lo que demuestra la capacidad del método en ofrecer respuestas adecuadas a compuestos de diferente estructura química y volatilidad.

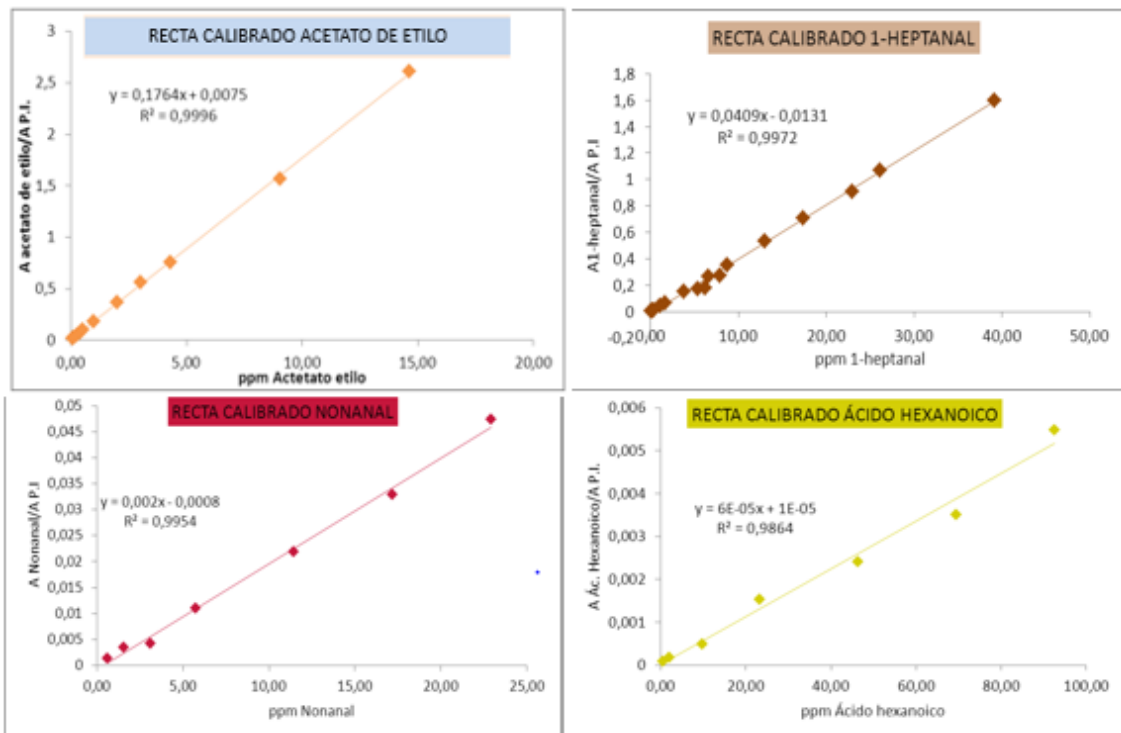


Figura 7. Ejemplos de rectas de calibrado empleadas para cuantificar los compuestos volátiles presentes en las muestras.

4.2.2. Hierbas aromáticas

Del mismo modo, se analizó el perfil volátil del romero y de la albahaca, previamente secadas en estufa (Figura 8) para poder observar posteriormente qué nuevos compuestos

volátiles aportaban al perfil del aceite de oliva virgen tras su incorporación. Tras su análisis se comprobó que ambas muestras contenían una gran cantidad de compuestos volátiles, lo que confirmó que su incorporación al aceite podría resultar de interés para prolongar su vida útil y modificar sus características organolépticas.

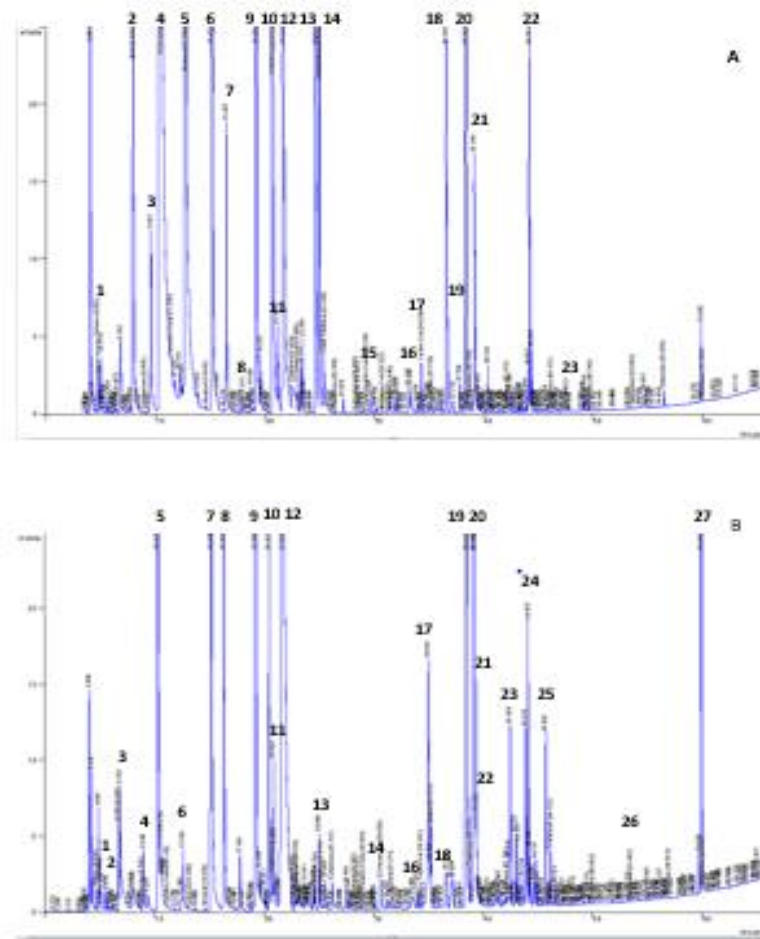


Figura 8. El cromatograma A muestra el perfil volátil del romero seco y el B el perfil volátil de la albahaca seca.

La muestra de romero seco (Figura 8A) presentó un perfil de volátiles diferente al de la albahaca (Figura 8B). El primer paso del estudio consistió en la identificación de los compuestos volátiles presentes en el romero y la albahaca, que se llevó a cabo mediante SPME-GC-MS. La identificación puso de manifiesto la presencia de un alto número de hidrocarburos y compuestos terpénicos en ambas muestras, aunque con diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre ellas. Asimismo ambos tipos de muestras presentaban compuestos volátiles comunes con el aceite de oliva virgen.

La Tabla 2 muestra los compuestos identificados en las muestras de albahaca y romero, la mayor parte de los cuales poseen propiedades sensoriales.

Tabla 2. *Compuestos volátiles identificados en las muestras de romero y albahaca.*

Código	Romero	Código	Albahaca
1	Octano	1	2-metilbutanal
2	2,6-dimetiloctano	2	3-metilbutanal
3	m-menteno	3	2,6-dimetiloctano
4	α -pineno	4	Pentanal
5	Campheno	5	2,6-dimetil-2-octeno
6	p-menteno	6	Naftaleno
7	β -mirceno	7	Hexanal
8	α -terpineno	8	β -pineno
9	Limoneno	9	Limoneno
10	1,8-cineol	10	1,8-cineol
11	γ -terpineno	11	γ -terpineno
12	3-octanona	12	p-cimeno
13	m-cimeno	13	6-metil-5-hepten-2-ona
14	α -terpinoteno	14	β -ocimeno
15	3-octanol	15	α -linalool
16	Tetrahidrolinalool	16	Tetrahidrolinalool
17	Ácido acético	17	Ácido acético
18	L-camphor	18	Copaeno
19	Camfeno	19	Dihidrolinalool
20	Acetato de bornilo	20	Linalool
21	B-cariofileno	21	α -bergamoleno
22	Borneol	22	Aristoleno
23	Octadecano	23	Ácido pentanoico
		24	β -farneseno
		25	α -curcumeno
		26	β -ionona
		27	Etil vainillina

4.2.3. Vida útil del aceite de oliva virgen

Los distintos lotes se comparan con el perfil volátil del VOO inicial (Figura 9), es decir, el aceite filtrado sin almacenar y sin hierbas añadidas, para poder estudiar cuáles son los nuevos compuestos volátiles que aparecen conforme avanza el tiempo de almacenamiento.

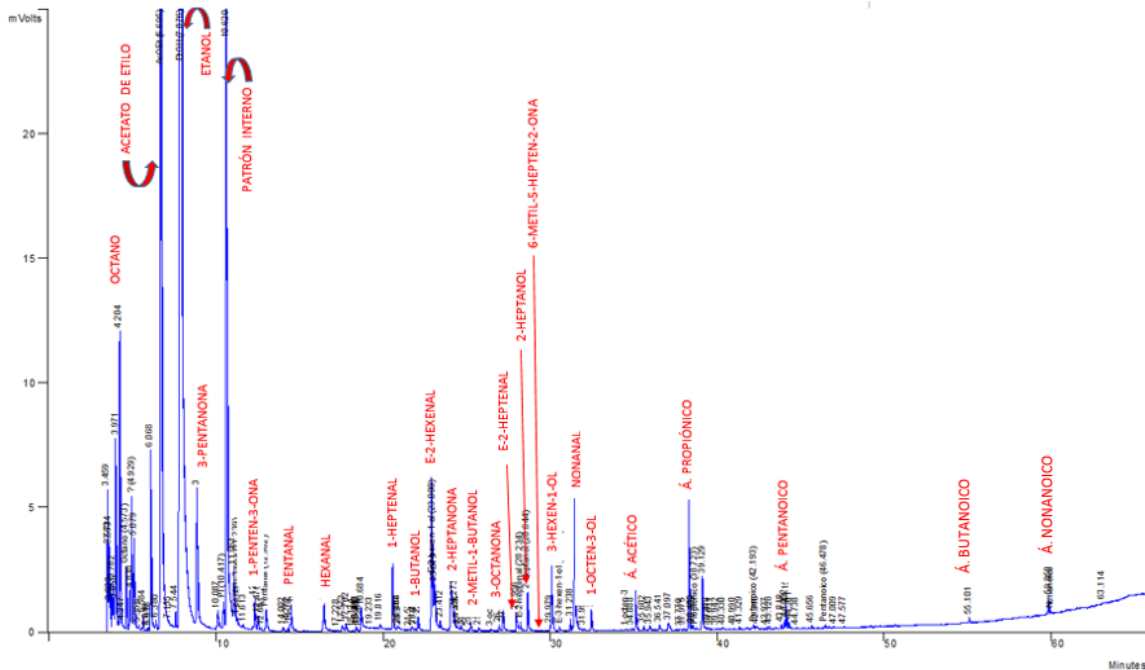


Figura 9. Cromatograma que muestra el perfil de compuestos volátiles de la muestra inicial empleada como control.

La Tabla 3 muestra todos los compuestos volátiles identificados, sus umbrales de olor y propiedades sensoriales.

Tabla 3. Compuestos volátiles analizados.

Código	Compuesto Volátil	Umbral de olor (mg/Kg)	Descriptor sensoriales
1	Octano	0,94	Alcano, disolvente
2	Acetato de etilo	0,94	Pegajoso, dulce, aromático
3	Etanol	30,00	Manzana, dulce, alcohol
4	3-Pentanona	70,00	Dulce, <, éter
5	Patrón interno	-	-
6	1-Penten-3-ona	0,70 ¹	Picante, mostaza
7	Pentanal	0,24	Aceitoso, madera, amargo, almendra
8	Hexanal	0,08	verde, verde manzana, césped, Aceitoso, graso,
9	1-Heptenal	-	-
10	1-Butanol	0,40	Empalagoso, aceitoso, medicina
11	E-2-hexenal	0,42	Frutado, verde, almendra amarga
12	2-Heptanona	0,30	Tierra mojada, jabón, canela
13	2-Metil-1-butanol	-	-
14	3-Octanona	-	Césped, moho, verde, mantequilla
15	E-2-heptenal	4,20 ¹	Jabón, grasiento, almendra, picante
16	2-Heptanol	0,01	Champiñón, tierra, dulce

17	6-Metil-5-hepten-2-ona	1,00	Frutado, verde, hierba, picante
18	3-Hexen-1-ol	1,00	Césped verde
19	Nonanal	0,15	Rancio, graso, ceras, picante
20	1-Octen-3-ol	1,00	Moho, tierra
21	Ácido acético	0,50	Amargo, avinagrado
22	Ácido propanoico	0,72	Picante, agrio, moho
23	Ácido butanoico	0,65	Rancio, queso
24	Ácido pentanoico	0,60	Rancio
25	Ácido hexanoico	0,70	Rancio, agrio, fuerte
26	Ácido heptanoico	0,10	Rancio, graso
27	Ácido octanoico	3,00	Rancio, queso, aceitoso, graso
28	Ácido nonanoico	-	Verde, graso

Nota; ¹, $\times 10^{-3}$.

Puede observarse que todos ellos son responsables de la producción de atributos sensoriales, que pueden estar relacionados con el aroma verde, frutado y fresco de los aceites de buena calidad, como es el caso de la 3-pentanona, E-2-hexenal, 3-hexenol, etc., o pueden estarlo con los aromas responsables de defectos sensoriales del aceite de oliva, como son el E-heptenal, nonanal, ácido acético, etc.

Existen algunos compuestos, como el hexanal, cuya contribución al aroma cambia dependiendo de su concentración en la matriz del aceite, a bajas concentraciones contribuye al aroma verde y frutado, mientras que a altas concentraciones lo hace al aroma rancio, característico de los aceites que han sufrido procesos de autoxidación.

Al estudiar los compuestos volátiles presentes en las muestras se observó que mostraban tendencias diferentes a lo largo del tiempo, encontrándose tres comportamientos diferentes:

- Compuestos cuya concentración disminuye a lo largo del estudio de vida útil. La principal razón para este comportamiento se encuentra en la dilución del compuesto en el espacio de cabeza de la muestra al aumentar la presencia de otros compuestos que pueden desplazar a los iniciales de su adsorción sobre el polímero adsorbente.
- Compuestos que permanecen en los mismos niveles de concentración a lo largo del estudio.
- Compuestos cuya concentración aumenta con el tiempo, su aparición se debe a procesos autoxidativos.

Con el fin de establecer qué compuestos mostraban diferencias significativas entre las muestras se aplicó una prueba t de Student de comparación de valores medios para poner de

manifiesto las diferencias existentes entre las muestras de aceites de oliva vírgenes de cada mes. El test mostró la existencia de diferencias significativas entre ellas. La Figura 10 muestra las diferencias existentes en las concentraciones de algunos compuestos volátiles entre la muestra inicial y final, pudiéndose observar los distintos comportamientos descritos anteriormente.

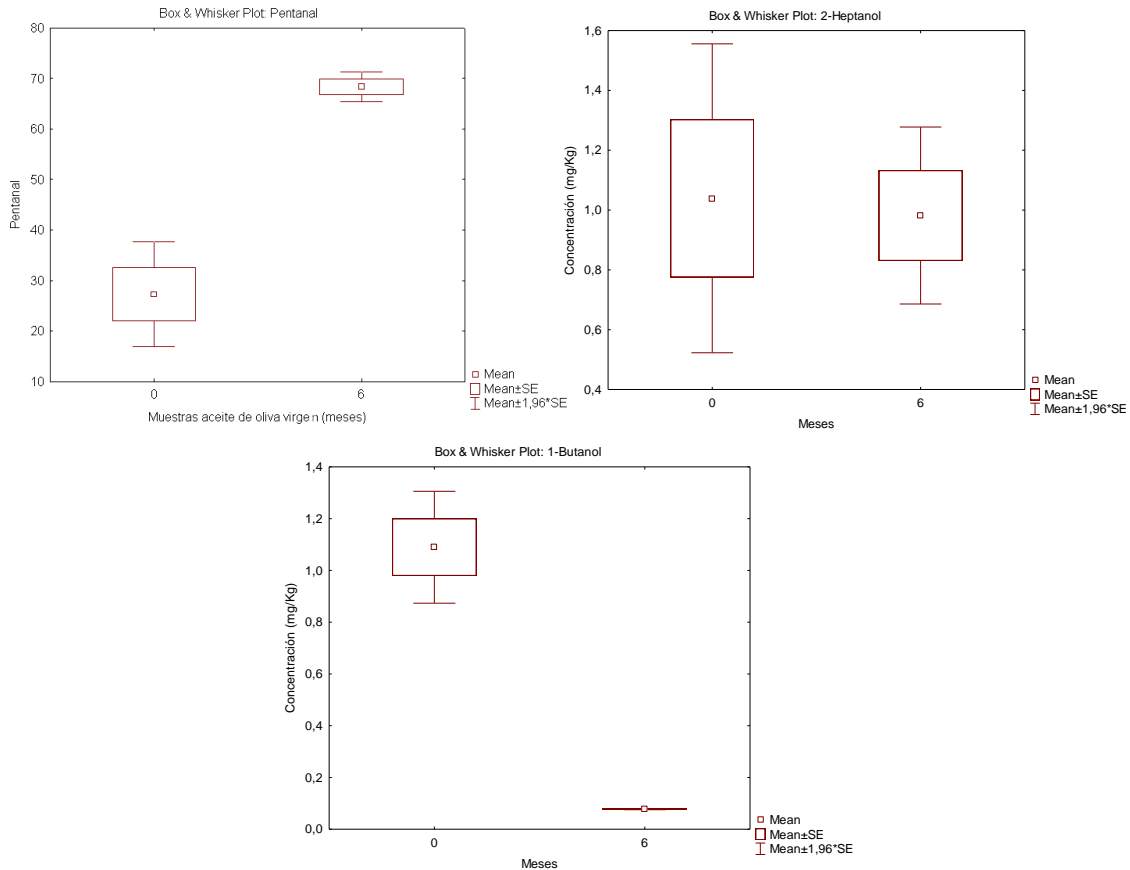


Figura 10. En la parte superior se recogen las diferencias en la concentración de pentanal (a la izquierda) y de 2-heptanol (a la derecha) inicial y final y en la parte inferior las diferencias de concentración de 1-butanol.

La composición volátil del VOO sufre modificaciones durante el almacenamiento que están relacionadas con los procesos autoxidativos que sufren sus ácidos grasos insaturados. Es a partir del tercer mes de almacenamiento cuando comienzan a apreciarse mayor número de diferencias significativas en la composición volátil de las muestras, aumentando posteriormente el número de compuestos durante los meses cuarto y quinto, y llegando a su valor más alto en la última muestra analizada, correspondiente al sexto mes de almacenamiento.

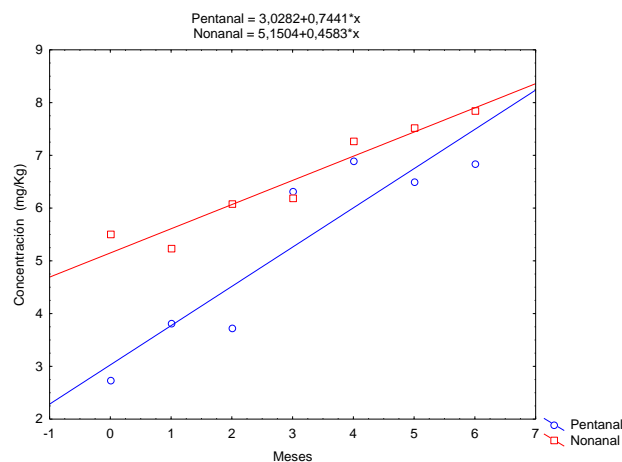
Con el fin de valorar las diferencias producidas de forma global se aplicó un análisis de varianzas que mostró que había 9 compuestos que eran los principales responsables de dichas diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Compuestos volátiles con mayores diferencias a lo largo del tiempo en las muestras de VOO.

Analysis of Variance. Marked effects are significant at $p < 0,05000$								
	SS - Effect	df - Effect	MS - Effect	SS - Error	df - Error	MS - Error	F	p
Pentanal	4936	6	823	846	7	121	6,80759	0,011652
1-Heptenal	0	6	0	0	7	0	4,35426	0,037560
1-Butanol	3	6	0	0	7	0	11,44540	0,002567
E-2-hexenal	7	6	1	1	7	0	7,67358	0,008326
E-2-heptenal	41	6	7	7	7	1	6,95623	0,010973
3-Hexen-1-ol	4	6	1	1	7	0	4,28951	0,038963
Nonanal	1418	6	236	282	7	40	5,87411	0,017412
Ácido acético	2228	6	371	29	7	4	88,41852	0,000003
Ácido hexanoico	12840	6	2140	1905	7	272	7,86286	0,007768

Todos los compuestos seleccionados mostraban comportamientos crecientes o decrecientes a lo largo del proceso. Numerosos compuestos aumentan, como es el caso del hexanal, procedente de la hidrólisis de 13-OOH linoleato; nonanal, procedente del 9-OOH oleato y 2-heptenal, por descomposición del 12-OOH linoleato. Del mismo modo, también se produce el incremento de pentanal, originado por la descomposición de 13/11-OOH linoleato. La mayoría de estos compuestos son responsables de defectos sensoriales debido a su bajo umbral de olor.

De entre estos compuestos, cabe destacar el aumento progresivo de las concentraciones de pentanal y nonanal con el paso del tiempo (Figura 10). Estos compuestos son responsables del defecto sensorial rancio, indicativo del deterioro del aceite de oliva.

**Figura 11.** Incremento de pentanal y nonanal observado en las muestras con el paso de los meses.

Se aplicó el análisis de “clusters” para poner de manifiesto las similitudes que había entre las muestras, teniendo en cuenta aquellas variables (compuestos) que mostraban diferencias significativas ($p < 0,05$). Para ello se utilizaron condiciones estrictas (método de Ward y distancia City-block). El resultado se muestra en la Figura 10, en la que puede observarse que las muestras se agrupan en dos grupos, uno de ellos formado por la muestra inicial y las almacenadas durante uno y dos meses y otro formado por las muestras almacenadas durante tres, cuatro, cinco y seis meses. En el primer grupo se aprecia una diferencia entre la muestra original, no almacenada, y las almacenadas los dos primeros meses, es decir, las muestras que habían sufrido menor deterioro oxidativo que son más parecidas a la muestra control. En el segundo grupo se observa, asimismo, una división entre las muestras, situándose las muestras con tres y cuatro meses de almacenamiento en uno de ellos y las muestras con cinco y seis meses en otro grupo a una distancia menor, lo que indica un mayor parecido entre ellas debido a una mayor alteración.

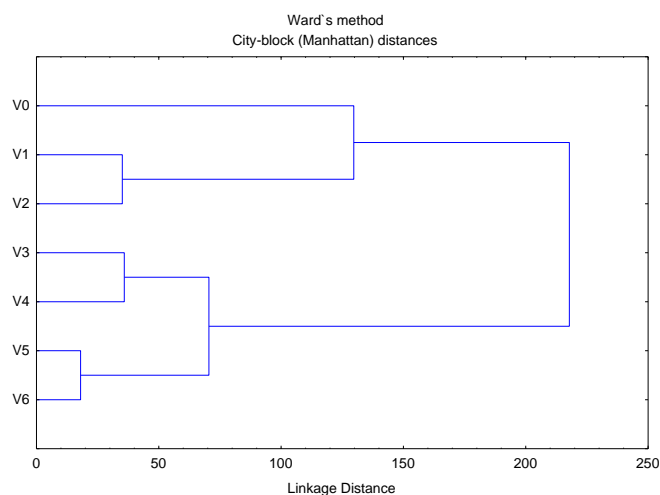


Figura 12. Resultado del análisis de “clusters”.

4.2.4. Vida útil del aceite de oliva virgen aderezado

La adición de plantas aromáticas al aceite se realiza habitualmente buscando diversos objetivos, por un lado hacer el aceite más estable, ya que su capacidad antioxidante aumenta al pasar algunos de estos compuestos desde las plantas al aceite y, por otro lado, modificar las propiedades sensoriales del aceite, ya que la maceración de las plantas modifica sus propiedades sensoriales. En este trabajo se ha evaluado el efecto de la adición de dos tipos de plantas al aceite de oliva virgen, una perenne como el romero, y otra anual como la albahaca.

Al hacer un análisis de varianza de las muestras aderezadas, se observó que los compuestos que presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo diferían de

los que las mostraban en la muestra de aceite virgen, ya que en ambos casos aumentó la concentración de algunos compuestos presentes en el aceite inicial, como la 3-octanona en el caso del romero, o la 6-metil-5-hepten-2-ona que aparece en la muestra de albahaca.

Es de destacar también la presencia de compuestos terpénicos en el aceite a partir de un mes de almacenamiento, lo que se justifica por la transferencia de estos volátiles al aceite desde las plantas originales a la matriz lipídica durante el almacenamiento. Esta transferencia se produce desde el principio del almacenamiento. Los compuestos transferidos en el caso del aceite con albahaca fueron β -pineno (aroma a pino, resina, trementina), mirceno (aroma balsámico, humedad/moho, picante) y 1,8-cineol (aroma menta dulce) que pueden justificar el aroma a albahaca originado en las muestras de aceite.

En el caso del romero, los compuestos fueron canfeno (aroma alcanfor), β -mirceno (aroma balsámico, picante), α -terpineno (aroma limón), limoneno (aroma limón, cítrico), 1,8-cineol (aroma menta dulce) y L-alcanfor (aroma alcanfor) que pueden justificar el aroma a romero que aparece en el aceite durante el almacenamiento.

Con el fin de comprobar esta transferencia de compuestos de la matriz vegetal a la oleosa, se llevó a cabo una evaluación sensorial de las muestras realizando un análisis descriptivo-cuantitativo. Este análisis consistió en evaluar sensorialmente el aroma de las muestras en los mismos periodos en que se realizaban las otras determinaciones analíticas.

Las muestras fueron evaluadas por 6 asesores, habituales consumidores de VOO, que asignaron las descripciones sensoriales a las muestras de forma libre, indicando también la intensidad de las percepciones recibidas.

Este análisis de las muestras puso de manifiesto las modificaciones sensoriales que se producían a lo largo del tiempo. La Tabla 5 muestra las diferentes notas sensoriales originadas por la muestra de aceite y las aderezadas con romero y albahaca a lo largo del tiempo.

Puede observarse que la muestra de aceite, que inicialmente presenta un aroma frutado verde propio de un aceite de buena calidad, va cambiando su perfil a lo largo del proceso, produciéndose una disminución de la intensidad de ese atributo y empezado a aparecer débilmente descriptores relacionados con la oxidación de la muestra a partir del tercer mes, que evolucionan luego hacia el rancio. Esto está justificado por el aumento que se produce de la concentración de aldehídos con bajo umbral de olor (Tabla 3).

Tabla 5. *Evaluación sensorial de las muestras durante el almacenamiento.*

MES	ACEITE DE OLIVA VIRGEN	ACEITE CON ALBAHACA	ACEITE CON ROMERO
1	Frutado, verde	Ligeramente a albahaca	Romero
2	Ligeramente verde	Albahaca	Romero más intenso
3	Ligeramente verde, calentado	Albahaca, desagradable	Romero
4	Frutado, verde, ligeramente rancio	Albahaca, desagradable, poco intenso	Ligeramente a romero
5	Ligeramente graso, rancio	Albahaca menos intenso y alterado	Romero menos intenso, hierba seca

En el caso de las muestras aderezadas puede comprobarse la transferencia de compuestos volátiles que se produce ya que desde el primer mes cada una origina una percepción relacionada con la planta añadida, menos intensa en la primera muestra y que aumenta en las muestras del segundo mes. A partir de ese momento la sensación producida cambia, en el caso de la albahaca, pasando a ser desagradable para los asesores y disminuye de intensidad en ambos casos, apareciendo notas a hierba seca en el romero durante el último mes, lo que indica un cambio en la composición de los volátiles transferidos que junto a los productos de oxidación del aceite originan el cambio de percepción.

5. CONCLUSIONES

1.- La evaluación de los parámetros de calidad físico-químicos ha permitido establecer que todas las muestras podían ser clasificadas como vírgenes en cuanto a sus valores de índice de peróxidos, K232, K270 e índice de acidez, excepto la muestra de aceite con albahaca que superó el valor límite de 0,8º de acidez a partir del cuarto mes y las muestras de aceite con albahaca y con romero que superaron el valor límite de 0,22 del K270 a partir del segundo y del cuarto mes, respectivamente.

2.- Se ha aplicado un método de espacio de cabeza dinámico-cromatografía de gases para la cuantificación simultánea de 27 compuestos volátiles, responsables del aroma del aceite de oliva virgen, con el fin de evaluar los cambios que se producen a lo largo de la vida útil durante 6 meses de almacenamiento.

3.- Los compuestos cuya variación es significativa ($p < 0,05$) son de dos tipos, unos responsables del aroma agradable del aceite de buena calidad, cuya concentración disminuye a lo largo del almacenamiento, y otros que se originan a partir de hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados como consecuencia de procesos autooxidativos, que son responsables de atributos sensoriales negativos y cuya concentración aumenta con el tiempo de almacenamiento.

4.- Se han identificado los compuestos volátiles del romero y la albahaca mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, obteniéndose perfiles complejos formados principalmente por hidrocarburos y compuestos de tipo terpénico, y observándose la presencia de compuestos comunes a los presentes en el aceite original.

5.- La vida-útil del aceite se modifica al ser aderezado con las plantas aromáticas, comprobándose que los compuestos que presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) no son los mismos que en el caso del aceite ya que se produce un aumento de la concentración de algunos compuestos presentes en el aceite original, así como una transferencia de compuestos de las plantas al aceite durante el almacenamiento, lo que está de acuerdo con el resultado de la evaluación sensorial de las muestras.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A*. 2004; 1054(1-2): 17–31.
- Aparicio R, Luna G. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2002; 104(9-10):614–27.
- Baiano A, Terracone C, Gambacorta G, Notte E La. Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage. *J Am Oil Chem Soc*. 2009; 86(11):1083–92.
- Bendini A, Cerretani L, Salvador MD, Fregapane G, Lercker G. Stability of the Sensory Quality of Virgin Olive Oil during Storage - An Overview. *Ital Food Beverage Technol*. 2010; LX:5–18.
- Binięcka M, Caroli S. Analytical methods for the quantification of volatile aromatic compounds. *TrAC - Trends Anal Chem*. Elsevier Ltd; 2011; 30(11):1756–70.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernández-Gutiérrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J Sep Sci [Internet]*. 2005; 28(9-10):837–58.
- CE. Reglamento (CEE) nº2568/1991 de la Comisión relativo a las características de los aceites de olivo y los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 248, 1-114, 1991.
- CE. Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 31-67, 2013.
- Cecchi T, Passamonti P, Cecchi P. Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. *Food Chem*. Elsevier Ltd; 2010; 120(3):730–5.
- COI. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº3/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2013.

- Condelli N, Caruso MC, Galgano F, Russo D, Milella L, Favati F. Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chem.* Elsevier Ltd; 2015; 177:233–9.
- Escuderos ME. Olive Oil Aroma Evaluation By Gas Chromatographic Method: A Critical Review. *Crit Rev Anal Chem.* 2011; 41(1):70–80.
- Fernández- Figueroa, C.D. Estudio analítico de compuestos responsables de defectos sensoriales de aceites de oliva vírgenes. Trabajo Fin de Máster, Máster en Especialización Profesional en Farmacia, Universidad de Sevilla; 2014.
- Frankel EN. Chemistry of extra virgin olive oil: Adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(10):5991–6006.
- Garrido-Delgado R, Dobao-Prieto MDM, Arce L, Valcárcel M. Determination of volatile compounds by GC-IMS to assign the quality of virgin olive oil. *Food Chem.* 2015; 187:572–9.
- Genovese A, Caporaso N, Sacchi R. Temporal changes of virgin olive oil volatile compounds in a model system simulating domestic consumption: The role of biophenols. *Food Res Int.* Elsevier Ltd; 2015; 77:670–4.
- Gomes MDR, Freitas AMC, Cabrita MJB, Garcia R. Olive Oil Composition : Volatile Compounds. En: Boskou Dimitrios, editor. *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions.* Rijeka (Croacia): InTech; 2012. p. 46-17.
- Issaoui M, Flamini G, Hajaj ME, Cioni PL, Hammami M. Oxidative evolution of virgin and flavored olive oils under thermo-oxidation processes. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88(9):1339–50.
- Kotsiou K, Tasioula-Margari M. Changes occurring in the volatile composition of Greek virgin olive oils during storage: Oil variety influences stability. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2015; 117(4):514–22.
- Morales MT, León-Camacho M. Gas and liquid chromatography: Methodology applied to olive oil. En: En: Harwood JL, Aparicio R, editores. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties.* Gaithersburg, MA (USA): Aspen Publishers, 2000. p. 159–207.
- Morales MT, Luna G, Aparicio R. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.* 2005; 91(2):293–301.

- Morales MT, Przybylski R. Olive oil oxidation. En: Harwood JL, Aparicio R, editores. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. Gaithersburg, MA (USA): Aspen Publishers; 2000. p. 459–490.
- Morales MT, Rios JJ, Aparicio R. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J Agric Food Chem.* 1997; 45(7):2666–73.
- Morales MT, Tsimidou M. The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. En: Harwood JL, Aparicio R, editores. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. Gaithersburg, MA (USA): Aspen Publishers; 2000. p. 393-458.
- Nenadis N, Moutafidou A, Gerasopoulos D, Tsimidou MZ. Quality characteristics of olive leaf-olive oil preparations. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010; 112(12):1337–44.
- Procida G, Cichelli A, Lagazio C, Conte LS. Relationships between volatile compounds and sensory characteristics in virgin olive oil by analytical and chemometric approaches. *J Sci Food Agric.* 2015; 96(1):311-318.
- Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(4):716–21.
- Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(4):722–7.
- Raffo A, Bucci R, D’Aloise A, Pastore G. Combined effects of reduced malaxation oxygen levels and storage time on extra-virgin olive oil volatiles investigated by a novel chemometric approach. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2015; 182:257–67.
- Samaniego-Sánchez C, Oliveras-López MJ, Quesada-Granados JJ, Villalón-Mir M, Serrana HLG. Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012; 114(2):194–204.
- Silva SF, Anjos CAR, Cavalcanti RN, Celeghini RMDS. Evaluation of extra virgin olive oil stability by artificial neural network. *Food Chem. Elsevier Ltd;* 2015; 179:35–443.
- Sinesio F, Moneta E, Raffo A, Lucchetti S, Pepparai M, D’Aloise A, et al. Effect of extraction conditions and storage time on the sensory profile of monovarietal extra virgin olive oil (cv Carboncella) and chemical drivers of sensory changes. *LWT - Food Sci Technol. Elsevier Ltd;* 2015; 63(1):281–8.

- Sousa A, Casal S, Malheiro R, Lamas H, Bento A, Pereira JA. Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT - Food Sci Technol.* 2015; 60(1):22–8.
- Zhu H, Wang SC, Shoemaker CF. Volatile constituents in sensory defective virgin olive oils. *Flavour Fragr J.* 2016; 31(1):22–30.
- Zunin P, Leardi R, Bisio A, Boggia R, Romussi G. Oxidative stability of virgin olive oil enriched with carnosic acid. *Food Res Int. Elsevier Ltd;* 2010; 43(5):1511–6.

7. ANEXO

Tabla A1. Resultados índice de acidez.

	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6
ACEITE	0.48	0.70	0.65	0.76	0,70	0,73
ACEITE/ALBAHACA	0.63	0.66	0.66	0.87	0,80	0,92
ACEITE/ROMERO	0.65	0.69	0.71	0.7	0,73	0,75

Tabla A2. Resultados índice de peróxidos.

	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6
ACEITE	7,41	5,73	5,71	5,75	4,20	6,72
ACEITE/ALBAHACA	10,25	8,37	5,99	6,22	8,00	4,47
ACEITE/ROMERO	13,00	10,00	9,20	4,50	5,81	8,98

Tabla A3. Resultados coeficientes de extinción a 232 y 270 nm.

	MES 1		MES 2		MES 3		MES 4		MES 5		MES 6	
	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₃₂	K ₂₇₀
ACEITE	1,58	0,21	1,67	0,22	1,71	0,21	1,69	0,26	1,75	0,25	1,80	0,23
ACEITE + ALBAHACA	1,72	0,16	1,78	0,17	1,79	0,18	1,68	0,21	1,70	0,20	1,75	0,21
ACEITE + ROMERO	1,78	0,18	1,92	0,23	2,02	0,29	1,72	0,28	1,95	0,29	2,05	0,31