



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE LA GRASA

*Decisión del momento de recolección,
según la composición de ácidos grasos de
la aceituna intacta,
mediante espectroscopía NIR*

TRABAJO FIN DE GRADO

María Ángeles Mancheño Correro

TITULACIÓN: Grado en Ingeniería Agrícola

Explotaciones agropecuarias

Sevilla, septiembre de 2016

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**INSTITUTO DE LA GRASA, CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

***Decisión del momento de recolección, según la composición de
ácidos grasos de la aceituna intacta, mediante espectroscopía NIR.***

Trabajo Fin de Grado realizado entre febrero de 2016 y julio de 2016 en:

- Departamento de Caracterización y Calidad de Lípidos Del Instituto de la Grasa de Sevilla, CSIC.**
- Departamento de Bioquímica y Biología molecular de productos vegetales del Instituto de la Grasa de Sevilla, CSIC.**
- Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla.**

Los tutores del Proyecto:

**Dr. José María García Martos,
Instituto de la Grasa de Sevilla, CSIC.**

**Dr. José Antonio Cayuela Sanchez,
Instituto de la Grasa de Sevilla, CSIC.**

**Dra. M^a del Carmen Florido Fernández,
Universidad de Sevilla.**

**Memoria presentada por María Ángeles Mancheño Correro, para optar al
título de Grado en Ingeniería Agrícola, especialidad en Explotaciones
Agropecuarias.**

Sevilla, septiembre de 2016

TÍTULO

Decisión del momento de recolección, según la composición de ácidos grasos de la aceituna intacta, mediante espectroscopía NIR.

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de establecer un marcador bioquímico de recolección de la aceituna de almazara basado en la proporción de ácidos grasos en el aceite de los frutos, susceptible de ser medido por espectroscopía de infrarrojo cercano. El principal objetivo de este marcador bioquímico es optimizar la selección del momento de recolección para que el fruto pueda proporcionar aceite de oliva de la mejor calidad posible, evitando al mismo tiempo la recolección de aceituna demasiado temprana. Esta técnica permitiría determinar en muestras de aceituna intacta de forma rápida este marcador de recolección, calculado en función de la composición de ácidos grasos de las aceitunas. Los resultados de este estudio indican que es viable la medida de la composición de ácidos grasos en aceituna intacta mediante NIR. Así mismo, se ha estudiado la evolución de dicha composición a lo largo del período de desarrollo de la aceituna hasta su envero (índice de madurez 3). Los resultados de este estudio apoyan la idea de que podría llegar a establecerse un marcador de recolección basado en la proporción de determinados ácidos grasos en la aceituna para estadíos de madurez correspondientes a valores del índice inferiores a tres, aunque se necesita más investigación para poder establecer conclusiones con suficiente base científica.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en este proyecto final a las personas que lo han hecho posible desde el comienzo de esta maravillosa etapa en la E.T.S.I.A hasta el día de hoy:

A mi familia en general por ayudarme a llevar a cabo y terminar este grado, y a mi madre en especial por hacer todo lo posible para darme un futuro.

A José Antonio Cayuela, tutor del proyecto, por toda su ayuda y horas de trabajo dedicadas a este proyecto, estando disponible cuando lo necesitaba.

A José María García, jefe del departamento, por ofrecerse a prestarme ayuda y corregir de muy buena gana mis errores.

A M^a Carmen Florido, tutora del proyecto, por sus ganas de orientarme y apoyarme en este trabajo y la forma tan amable de hacerlo.

A M^a Carmen Martínez, de quien he aprendido todo el trabajo de laboratorio, intentando enseñarme algo nuevo cada día y teniendo paciencia para ello y una gran simpatía.

A todos mis amigos que durante estos años me han aguantado y apoyado, además de animarme a seguir y creer que podía con esto y más.

Gracias a todos vosotros

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| 1.1. La recolección de la aceituna..... | 1 |
| 1.2. Variedades de olivo adaptadas a la recolección mecanizada..... | 2 |
| 1.3. Características de los aceites de las principales variedades..... | 4 |
| 1.4. Decisión fecha de recolección del fruto según el índice de madurez..... | 5 |
| 1.5. Importancia y evolución de la composición de ácidos grasos del aceite durante el desarrollo del fruto..... | 7 |
| 1.6. Biosíntesis de los ácidos grasos..... | 11 |
| 1.7. Espectroscopia NIR..... | 12 |

2. OBJETIVOS

| | |
|--------------------------------|----|
| 2. Objetivos del trabajo | 15 |
|--------------------------------|----|

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 3.1. Material vegetal | 15 |
| 3.1.1. Diseño experimental y estrategia de riego | 16 |
| 3.2. Registro espectros NIR..... | 17 |
| 3.3. Índice de madurez de la aceituna..... | 18 |
| 3.4. Quimiometría y procedimiento de calibración | 18 |
| 3.5. Validación externa de las calibraciones | 19 |
| 3.6. Extracción de aceites mediante Abencor (MC2)..... | 19 |
| 3.7. Extracción de aceites mediante Soxhlet | 20 |
| 3.8. Determinación de la composición de ácidos grasos | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS | |
| 4.1. Caracterización de la población experimental | 24 |
| 4.2. Evolución de la composición de ácidos grasos en la población | 25 |
| 4.3. Espectro de la aceituna Arbequina intacta..... | 27 |
| 4.4. Análisis PCA..... | 29 |
| 4.5. Quimiometría y selección de variables espectrales | 31 |
| 4.6. Calibración predictiva de índice de madurez..... | 32 |
| 4.7. Calibraciones predictivas de la composición de ácidos grasos | 34 |
| 4.7.1. Aceite extraído por el método Soxhlet | 35 |
| 4.7.2. Aceite extraído por el método Abencor (MC2)..... | 38 |
| 4.8. Validación externa de las calibraciones | 40 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES | |
| 5. Conclusiones..... | 43 |
| | |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | |
| 6. Bibliografía..... | 44 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La recolección de la aceituna.

El desarrollo de nuevas técnicas de cultivo o de sistemas de plantación es continuo en el olivar y, aunque en la recolección de aceituna se han realizado notables progresos en el diseño y desarrollo de máquinas, todavía se siguen buscando nuevos sistemas y nuevas soluciones.

Hace poco más de una década, 80 árboles de dos o tres pies cada uno por hectárea se consideraba una densidad normal de plantación. Eran las denominadas plantaciones tradicionales de olivar. Esta densidad se aumentó a 200-300 árboles de un solo pie en la misma superficie. Son las denominadas plantaciones intensivas que, si se tiene en cuenta el número total de pies, mantiene la misma densidad de olivos por hectárea de las plantaciones tradicionales, pero más racionalmente distribuidos, evitando la competencia por suelo, luz y agua. En la actualidad, se llegan a superar densidades de plantación de más de 1500 olivos/hectárea. Son las denominadas plantaciones superintensivas, también conocidas como plantaciones en seto (Porrás-Soriano et al., 2008).

Según datos de AEMO 2009, en España el porcentaje de hectáreas según el sistema de intensificación se encuentra repartido:

| <i>SISTEMA DE PRODUCCIÓN</i> | <i>HECTÁREAS</i> |
|----------------------------------|------------------|
| Olivar tradicional no mecanizado | 575.000 |
| Olivar tradicional mecanizado | 1.280.000 |
| Olivar intensivo | 550.000 |
| Olivar superintensivo | 45.000 |
| Total España | 2.450.000 |

Tabla 1. Número de hectáreas según producción.

España se sitúa en el primer lugar mundial en superficie y producción de aceite de oliva. La producción española representa aproximadamente el 60% de la producción de la UE y más del 45% de la mundial (Magrama 2012).

En los años cincuenta las técnicas tradicionales de cosecha eran el ordeño y vareo. El ordeño consiste en coger a mano las aceitunas del árbol y el vareo en tirar las aceitunas al suelo con ayuda de una vara larga golpeando las ramas. Una vez realizado el vareo, se

procedía a la recogida de las aceituna en el suelo y depositarlas dentro de espuestas. Cuando se acumulaba la aceituna recogida se transportaba al cargadero donde se encontraba la criba y se realizaba esta con ayuda de dos personas. Finalmente se almacenaba en sacos que posteriormente serían cargados sobre los mulos que los llevarían hasta la almazara para su molienda con molinos de piedra.

En la actualidad han cambiado mucho los métodos de recolección de la aceituna. Hasta 1965 no se veía la posibilidad de que se pudiera diseñar maquinaria con garantía de aportar alguna solución al problema de la recolección (Ministerio de Agricultura, 1969). En 1965, la Sección de Mecanización de la Dirección General de Agricultura, presentó un informe de la actuación sobre olivos de máquinas vibradoras diseñadas y destinadas, en principio, para la recolección de otros frutales. Del modo de funcionar estas máquinas se vislumbraba una pequeña esperanza de introducir con éxito la mecanización en alguno de los procesos de recolección de la aceituna (Ministerio de Agricultura, 1969). En, el Ministerio convocó un concurso de demostración práctica de maquinaria de recolección de aceituna en ese mismo año, sucediéndose otros análogos en años posteriores.

Existe maquinaria que permite acelerar la cosecha, requiriendo mucho menos esfuerzo humano. Sin propósito de una descripción exhaustiva, pueden destacarse entre ellas las máquinas sopladoras, que sirven para limpiar y dirigir la aceituna ya derribada del árbol. La barredora, pequeño vehículo que absorbe y separa la aceituna de piedras y ramas. El peine, que está basado en el vareo tradicional, pero usando una vara mecánica que golpea las aceitunas y caen al suelo. También se utiliza el vibrador, que es un brazo que se acopla a las ramas de los olivos y las hace vibrar hasta que caen todas las aceitunas. También se utiliza otra vibradora que es parecida a la anterior pero, en vez de ser utilizada por una persona, va acoplada con el tractor y su funcionamiento es muy similar: en lugar de hacer vibrar las pequeñas ramas de los olivos hace vibrar todo el tronco.

También últimamente se están utilizando unas máquinas denominadas “buggies”, que realizan la misma labor que el vibrador acoplado al tractor pero con mayor maniobrabilidad.

1.2. Variedades de olivo adaptadas a la recolección mecanizada.

El olivar tradicional se ha caracterizado por una gran diversidad de variedades seleccionadas localmente y propagadas por los propios agricultores que han permanecido confinadas durante siglos en torno a la zona donde fueron seleccionadas

El olivar intensivo, desarrollado a partir de 1970, ha utilizado muchas menos variedades. Tres variedades, ‘Picual’, ‘Hojiblanca’ y ‘Arbequina’ han copado más del

90% de las nuevas plantaciones para aceite. ‘Picual’ por su elevada rusticidad, productividad, alto contenido graso y facilidad de cultivo ha sido la base de numerosas plantaciones no solo en su zona de difusión sino en otras de nueva expansión. ‘Hojiblanca’ ha seguido implantándose en las nuevas plantaciones de su zona tradicional debido a la doble aptitud de sus frutos (aceite y mesa) y, sobre todo, a su gran adaptación a los terrenos calizos propios de su área de cultivo. El empleo de ‘Arbequina’ se ha debido a su precocidad de entrada en producción, elevada productividad y a un mayor precio inicial de su aceite en el mercado. Su plantación en numerosos olivares intensivos de Andalucía supuso la mayor difusión de una variedad en una zona alejada de su lugar de origen. Finalmente el progreso de la verticilosis en numerosos olivares, sobre todo en riego, ha conducido a la plantación de ‘Frantoio’, una variedad de la Toscana (Italia) resistente a esta enfermedad, buena productora de un aceite de calidad cuyo mayor limitación radica en su tardía entrada en producción. En aceituna de mesa las bien conocidas variedades tradicionales ‘Manzanilla de Sevilla’, ‘Gordal Sevillana’, ‘Manzanilla Cacereña’ y ‘Hojiblanca’ siguen siendo las más plantadas. Recientemente el sector ha iniciado ensayos comparativos con variedades procedentes de otros países al objeto de diversificar la producción de aceituna de mesa.

El olivar en seto estrecho o superintensivo se desarrolló a partir de 1994 (Rallo y Barranco, 2015). La diversidad varietal utilizada es muy restringida hasta la fecha, ya que muy pocas variedades tradicionales se han adaptado a este nuevo sistema que necesita variedades de precoz entrada en producción, vigor reducido y porte compacto que permitan su cultivo sin necesidad de recurrir a podas muy drásticas. ‘Arbequina’ ha sido la variedad que mejor se ha adaptado a este nuevo sistema y ha supuesto más del 95% de la superficie plantada.

En 1990 se inició el primer programa de mejora genética para obtener nuevas variedades de olivo para aceite por cruzamiento en España. Se trata de un programa conjunto de la Universidad de Córdoba y el IFAPA, que busca conseguir variedades con las características antes señaladas. Era preciso además acortar la fase juvenil, que es el plazo que media entre la germinación de las plantas de semilla procedentes de los cruzamientos y la floración. La fase juvenil representa un excesivo tiempo de espera entre la realización de los cruzamientos y la evaluación de características críticas de sus descendencias. En programas italianos previos se ha prolongado hasta 10-15 años. En este caso un protocolo de germinación y forzado de crecimiento ha acortado este período a 29 meses. Ello ha permitido ampliar los programas de mejora en nuestro país (Rallo y Barranco, 2015).

1.3. Características de los aceites de las principales variedades

En cuanto a las características varietales de los aceites, los ácidos grasos poseen un componente varietal más elevado mientras que otros parámetros tales como los antioxidantes, la estabilidad y las características sensoriales se ven influenciados de forma más importante por las condiciones agroclimáticas. Además, habría que tener en cuenta que las características del aceite se pueden ver influenciadas por la zona de cultivo (Uceda *et al.*, 2004).

La estabilidad oxidativa, parámetro que mide la resistencia a la oxidación de los aceites (OSI, Oil Stability Index), depende en gran medida de la composición en ácidos grasos y del contenido en compuestos fenólicos del aceite (Aparicio *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 1999 Uceda *et al.*, 2004). Por tanto y al igual que estos compuestos, está influenciada por la variedad. Se han establecido cinco categorías para la estabilidad oxidativa (Uceda *et al.*, 2004), considerándose la variedad 'Picual' la de mayor estabilidad oxidativa dentro del rango de $OSI > 105h$, la 'Hojiblanca' con una estabilidad media en el rango de $45h < OSI < 65h$ y la variedad 'Arbequina' se encuentra en el menor rango con una $OSI < 45h$.

El aceite de la variedad 'Arbequina' se caracteriza por su fluidez y su extraordinaria fragancia. En cuanto a su composición ácida, presenta un contenido medio-bajo en ácido oleico y un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados que le confieren su fluidez característica. Tiene un contenido medio en vitamina E y bajo en polifenoles totales, lo que le proporciona suavidad y dulzor a sus aceites. La estabilidad al enranciamiento de los aceites de la variedad 'Arbequina' puede considerarse media-baja.

El aceite de la variedad 'Hojiblanca' es un aceite suave en boca y con aroma y sabor a almendra hecha. Su composición en ácidos grasos muestra un buen contenido en ácido oleico y medio en ácido linoleico y palmítico. Tiene un alto contenido en vitamina E (α -tocoferol) y bajo en polifenoles totales, lo que le proporciona suavidad y dulzor a sus aceites. La estabilidad al enranciamiento de los aceites de la variedad 'Hojiblanca' puede considerarse media.

El aceite de la variedad 'Picual' presenta atributos específicos como la higuera y la madera fresca que le proporcionan una gran personalidad. Su composición se caracteriza por un alto contenido en ácido oleico, monoinsaturado de alto interés nutricional, bajo contenido en ácido linoleico y contenido medio en palmítico. Este aceite de oliva normalmente presenta solo otro ácido graso monoinsaturado, el ácido gondoico, que participa en proporción minoritaria.

Su contenido en Vitamina E es medio. Presenta un contenido medio-alto en polifenoles totales, proporcionándole unos caracteres sensoriales de gran personalidad, con atributos amargo y picante muy marcados. Su excelente composición acídica, unida a su contenido en antioxidantes naturales, polifenoles y tocoferoles esencialmente, hacen que el aceite de la variedad 'Picual' tenga la más alta estabilidad al enranciamiento.

1.4. Decisión fecha de recolección del fruto según el índice de madurez

En la recolección de aceituna es preciso establecer de forma racional el período óptimo para llevar a cabo la recolección. Para ello se hace necesario, en primer lugar, conocer la evolución del fruto hasta llegar a su maduración. La aceituna, desde el cuajado, aumenta paulatinamente de tamaño y, simultáneamente, pasa por la fase de endurecimiento del hueso y de un acusado aumento de peso. A principios de otoño, el color verde intenso se transforma en verde claro, después en verde amarillento, brillante. A continuación se inicia el envero o cambio de color, comenzando a aparecer pequeñas manchas violáceas, principalmente en el ápice, que luego se extienden y terminan por ocupar todo el epicarpio. Posteriormente el color del mesocarpio va virando al morado, progresivamente desde la epidermis hasta el endocarpio o hueso. Mientras tanto, el epicarpio ha ido cambiando del color violáceo hasta el violeta oscuro brillante, recubriéndose de una capa blanquecina, mayoritariamente de compuestos excretados por el fruto, denominadas pruina. Los colores finales, tanto en la pulpa o mesocarpio, como en la piel del fruto o epicarpio, adquieren las tonalidades características de cada variedad.

Se considera como período de maduración el tiempo transcurrido desde la aparición de las manchas violáceas hasta la coloración definitiva de la piel y de la pulpa. En la mayoría de las variedades, estas últimas transformaciones no tienen lugar en todos los frutos de una planta al mismo tiempo, alcanzándose la maduración de forma escalonada (Porrás-Soriano et al., 2008). De forma práctica se puede predecir ese momento ideal de recolección calculando el índice de madurez descrito por Uceda y Frías (1975), el cual se utiliza para determinar el momento óptimo de recogida de la aceituna.

Para su cálculo se toman 2 kg de aceitunas situadas a la altura del operador y en las cuatro orientaciones del árbol. Se homogeniza la muestra, se separan 100 frutos al azar y se clasifican en las categorías que se describen en la Tabla 2. Se incluye un ejemplo del aspecto de los frutos en la Figura 1.

Se llama Índice de Madurez (IM) al sumatorio del número de frutos de cada categoría por el valor numérico de su categoría dividido por 100, es decir, siendo A, B, C, D, E,

F, G, H, el número de frutos de cada categoría 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 respectivamente, el índice de madurez se define según la fórmula [1].

$$IM = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + \dots + H \times 7) / 100 \quad [1]$$

| IM Color aceituna | |
|--------------------------|---|
| 0 | Piel verde intenso |
| 1 | Piel verde amarillento |
| 2 | Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero |
| 3 | Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto. Final de envero |
| 4 | Piel negra y pulpa blanca |
| 5 | Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa |
| 6 | Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso |
| 7 | Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso |

Tabla 2. Índice de madurez de la aceituna según Uceda y Frías (1975)

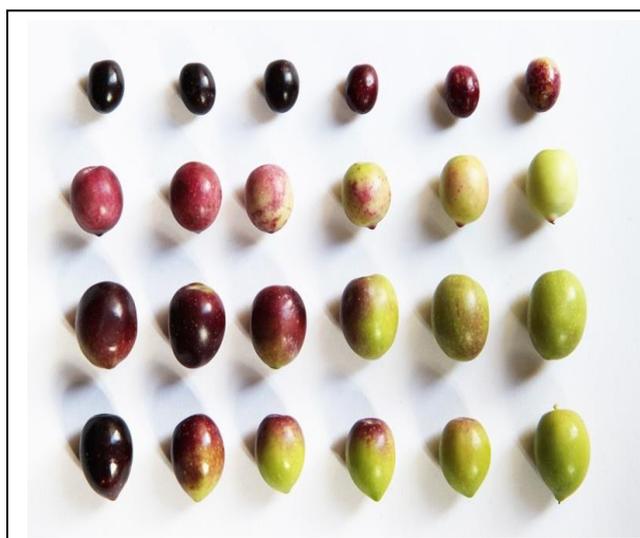


Figura 1. Índice madurez de aceituna.

Para variedades que desarrollan normalmente el color (Picual, Hojiblanca, Lechín, Cornicabra y otras que desarrollan mucho el color morado) el momento óptimo de recolección es cuando el IM alcanza valores próximos a 3,5.

En variedades de menos color como es el caso de “Arbequina”, el momento óptimo de recolección se alcanzaría con valores de IM próximos a 3. En el caso de esta variedad

este método basado en el color del fruto se adapta peor a determinar el momento óptimo de madurez porque es capaz de llenar toda la pulpa de aceite sin cambiar drásticamente de color (Uceda y Frías, 1975).

Las aceitunas con $IM > 3$ son más susceptibles al daño físico y al deterioro microbiano. Además, cuando la aceituna llega al envero, la acumulación de aceite en la misma se detiene. Una aceituna más madura no contiene más aceite, pero se extrae mejor. La recolección temprana con IM próximos a 3, ayuda a evitar el deterioro del fruto y reduce el riesgo de daños por la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmel.). Adicionalmente, mejorará el cuajado en la cosecha siguiente (Medina *et al.*, 2013).

La aceituna es considerada como fruto no climatérico (Nanos *et al.*, 2002). La existencia o no del proceso del climaterio (Goldschmidt, 1998) es fundamental en cualquier discusión acerca de los sistemas de cosecha, de la comercialización y de la conservación en post-cosecha de los frutos. En los frutos climatéricos existe un estado fisiológico, en un momento determinado por el conjunto de condiciones agronómicas, en el que se produce un aumento muy notable de su biosíntesis de etileno. Este “pico” de etileno conduce al inicio inmediato de procesos de cambio muy drásticos del fruto. Entre dichos cambios se incluyen el ablandamiento por la actividad poli-galacturonasa, que degrada las pectinas, el cambio de color desde el verde hacia los colores específicos del fruto maduro, y la conversión de ácidos orgánicos en azúcares. Debido a la existencia de este proceso, los frutos climatéricos son capaces de seguir madurando una vez separados de la planta (es decir, cosechados), siempre y cuando hayan alcanzado un nivel de desarrollo caracterizado por la madurez fisiológica. Esta es el estadio del fruto en el que la semilla está constituida y es viable, pues es la propia semilla la que dispone del mecanismo genético capaz de iniciar el proceso del climaterio, aunque el fruto haya sido cosechado. En cambio, los frutos no climatéricos solo maduran en la planta, e interrumpen su maduración de forma irreversible una vez separados de ella, por lo cual se debe asegurar que hayan alcanzado un estado apropiado para su consumo al momento de la cosecha (Abeles *et al.*, 1992). Por lo tanto, es importante no olvidar la naturaleza no climatérica de la aceituna.

1.5. Importancia y evolución de la composición de ácidos grasos del aceite durante el desarrollo del fruto.

Generalmente el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, representa una concentración mayor, del 68-81,5%, que los restantes ácidos grasos (palmítico, palmitoleico, esteárico, linoleico y linolénico) (Lozano-Sánchez *et al.*, 2009). La variedad Arbequina puede variar del 52% al 74% en ácido oleico en función de las condiciones de latitud y clima (Tous y Romeo, 1994).

Los límites de la composición acídica fijados por el Consejo Oleícola Internacional (COI), que establece la composición de ácidos grasos como un criterio de pureza de los aceites de oliva vírgenes (COI/T.15/NC nº 3/Rev. 7), se incluyen en la Tabla 3.

| Ésteres metílicos | Porcentaje |
|--------------------------|-------------------|
| Ácido mirístico | ≤ 0,03 |
| Ácido palmítico | 7,5- 20,00 |
| Ácido palmitoleico | 0,30- 3 ,50 |
| Ácido heptadecanóico | ≤ 0,30 |
| Ácido heptadecenóico | ≤ 0,30 |
| Ácido esteárico | 0,50- 5,00 |
| Ácido oleico | 55,00- 83,00 |
| Ácido linoleico | 2,50- 21,00 |
| Ácido linolénico | ≤ 1,00 |
| Ácido araquídico | ≤ 0,60 |
| Ácido eiosenóico | ≤ 0,40 |
| Ácido behénico | ≤ 0,20 |
| Ácido lignocérico | ≤ 0,20 |

Tabla 3. Nomenclatura ésteres metílicos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico(C20:0), eicosenóico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0). (COI).

Los ácidos grasos en la aceituna se encuentran en forma de triglicéridos, siendo los ácidos grasos que están libres los que generan la acidez del aceite de oliva virgen. Existe una acidez muy baja, pero natural, ya que se trata de la que procede de la propia naturaleza en su estado metabólico equilibrada en el entorno químico. Cuando la acidez de un aceite virgen tiene valores muy altos se debe a procesos fisiológicos degenerativos.

El ácido oleico es de un ácido graso monoinsaturado, con una única insaturación en el carbono 9. En los aceites de oliva el ácido oleico se encuentra, en función de la variedad y otros aspectos agronómicos, en proporciones entre el 55 y 83% como ya hemos mencionado antes. Se le reconoce propiedades saludables como una de las grasas mejores para formar parte de la dieta.

Los factores que en mayor medida afectan a la composición y características organolépticas de los aceites son la variedad, la época de recolección, el medio (suelo y clima) y las técnicas de cultivo empleadas (entre ellas el riego). La mayoría de los estudios muestran que el riego puede modificar la composición química y las características organolépticas de los aceites producidos (Salas *et al.*, 1997; Girona, 2001; Berenguer *et al.*, 2001, d'Andria y Morelli, 2002; Gucci *et al.*, 2004) y también su comportamiento en la almazara, afectando a la extractabilidad (Pastor *et al.*, 2005;

Berenguer et al, 2006). Respecto a los ácidos grasos, en la literatura consultada sobre los efectos del riego de olivar en la calidad del aceite, las diferencias que presentan distintas dosis de riego en el contenido relativo en ácidos grasos son pequeñas y dependen fundamentalmente de la pluviometría del año agrícola (Hidalgo et al., 2009).

En cuanto al estado de madurez de la aceituna conviene tener en cuenta que, por ejemplo, aceites de oliva de la variedad Picual, que contiene un alto porcentaje de ácido oleico, pueden presentar un índice de ácido linoleico por debajo de los que estaban establecidos en la norma del COI cuando la recogida es muy temprana. Una vez comprobado que esta anomalía era debida a procesos fisiológicos naturales, se llevó a cabo a una modificación de la normativa, reduciendo el límite inferior de este ácido graso (Moreda y Ortega, 2016).

Es importante saber que desde el punto de vista de la salud es deseable un alto contenido de oleico y un bajo contenido en palmítico y linoleico, siendo estos los ácidos mayoritarios presentes. Tanto en el contenido de polifenoles totales como en tocoferoles, la cantidad variará según la variedad y la época, habiéndose señalado la importancia del proceso de maduración para estos parámetros (Abia et al., 1999).

A lo largo del proceso de maduración del fruto se registran importantes cambios en la composición de ácidos grasos del aceite. El contenido de ácido palmítico así como el conjunto de ácidos grasos saturados, desciende. Esto se demostró en un estudio realizado en Francia con la variedad “Sayali” en el que se vio como el porcentaje de ácido palmítico disminuía de 35,34% a 12,10% entre la 1ª y 8ª semana después de la floración, respectivamente, y a continuación se mantenía prácticamente invariable hasta la madurez completa del fruto con una cantidad de 11,41%.

El ácido oleico, el mayoritario con un 55-83% en la aceituna, puede permanecer constante o mostrar un ligero incremento, según algunos estudios. El ácido linoleico, sin embargo, aumenta su porcentaje a lo largo de la maduración del fruto según varios autores, (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán, 2000; Menz y Vriesekoop, 2010; Modi *et al.*, 1992), (Arnon Dag *et al.*, 2011) apreciándose en general una tendencia de la biosíntesis de ácidos grasos hacia formas más insaturadas. Esto se piensa que es debido a las bajas temperaturas ya que se ha observado que en esas condiciones aumenta la desaturación de oleato a linoleato en las semillas oleaginosas (Martínez-Rivas *et al.*, 2000; Salas *et al.*, 1997).

Por consiguiente, el aumento en el contenido de ácido linoleico puede estar relacionado con la reducción gradual de la temperatura desde el cuajado del fruto hasta el momento

de la recolección. Sin embargo, en otros estudios como en el realizado en “Tierras de Barros” en Extremadura con las variedades “Morisca” y “Carrasqueña” se han observado la tendencia del ácido linoleico a disminuir con el avance de la maduración y una clara tendencia en el incremento de la grasa total de ácidos monoinsaturados (de 70,8% a 73,2%) y en la disminución del total de poliinsaturados (del 12,2% al 10,2%) (Mendoza, *et al.*, 2013; Gómez-Rico *et al.*, 2007).

Un parámetro importante desde el punto de vista nutricional y comercial, es la relación entre ácidos monoinsaturados y poliinsaturados (MUFAs/PUFAs), principal responsable de la estabilidad oxidativa de los aceites. Esta relación desciende durante la maduración del fruto debido al aumento del ácido linoleico y al valor constante del ácido oleico.

Los compuestos minoritarios juegan también un papel importante en la composición de ácidos grasos, ya que a pesar de su baja concentración, tienen importancia sus propiedades nutricionales y su efecto en las características organolépticas del aceite. Los compuestos fenólicos destacan por su elevado nivel antioxidante (Visioli y Galli, 1998). Durante la maduración del fruto se aprecia en general un descenso en su contenido total (Amiot *et al.*, 1989; Gutiérrez *et al.*, 1999; Brenes *et al.*, 1999; Beltrán, 2000). Otros antioxidantes naturales son los tocoferoles. En el aceite de oliva virgen se encuentra α , β y γ -tocoferol. Estos antioxidantes constituyen la vitamina E, que protege al organismo frente a los procesos oxidativos. Durante el proceso de maduración se produce un descenso de todos los tocoferoles presentes en el aceite (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán, 2000; Beltrán *et al.*, 2004).

Otro parámetro que desciende durante el proceso de maduración es la estabilidad oxidativa. Ésta es la medida de la resistencia del aceite al enranciamiento y depende de la composición ácida (oleico/linoleico) y del contenido en polifenoles, así durante la maduración disminuyen los polifenoles totales y aumenta el ácido linoleico por lo que la estabilidad también disminuye.

Los esteroides también descienden a partir del momento de envero del fruto (Gutiérrez *et al.*, 1999), y por supuesto el color y las características organolépticas también se ven influenciadas. El color de los aceites varía de verde intenso al amarillento conforme va perdiendo la intensidad del mismo. Esto es debido al cambio de los pigmentos en el proceso de maduración. En cuanto a las características organolépticas, éstas se ven afectadas en la disminución del amargor y en los caracteres sensoriales que serán menos marcados.

A causa de la modificación de todos estos parámetros a lo largo del periodo de maduración, se han realizado varios estudios sobre cuál sería la fecha ideal para la recolección de la aceituna con el fin de lograr un equilibrio entre la cantidad de aceite obtenido y la calidad de éste. El mejor momento es cuando el fruto comienza a

modificar su color de verde a rojizo-morado, lo que llamamos envero. En ese momento el fruto contiene casi su máximo porcentaje de aceite y a la vez una gran calidad por el elevado contenido de los compuestos beneficiosos para la salud (Franco, 2014).

1.6. Biosíntesis de los ácidos grasos

Los ácidos grasos en animales se sintetizan en el citosol, partiendo de moléculas de acetil-CoA que se producen dentro de la mitocondria. Sin embargo en las plantas esta síntesis se produce en el estroma de los plastidios. Allí se sintetizan el palmítico y el oleico, luego este último se puede desaturar a linoleico o linolénico en el Retículo Endoplasmático.

El proceso de formación de ácidos grasos se inicia con el Acetil-Coenzima A, una molécula compleja y sillar del metabolismo, cuyo esquema se incluye en la Figura 2.

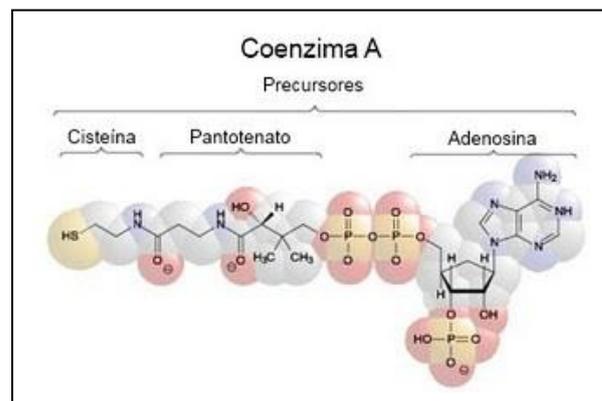


Figura 2. Esquema de la Acetil-Coenzima A (Lehninger)

A partir de esta molécula se forma el Malonil-Coenzima A. En un proceso de Elongación, que utiliza como base moléculas de Malonil-CoA, en varios ciclos, cada uno de los cuales tiene cuatro pasos característicos (condensación, reducción del acetoacetyl-ACP, deshidratación y reducción del crotonil-ACP) se forma el primer ácido graso saturado, el ácido palmítico (C16) siguiendo el esquema incluido en la Figura 3.

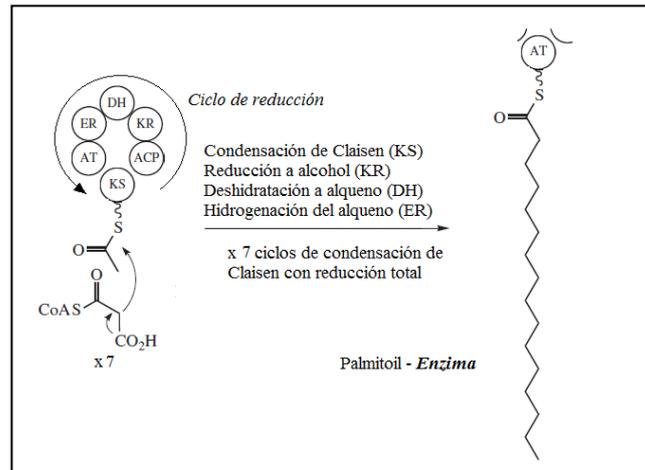


Figura 3. Formación ácido palmítico (Nelson, 2006).

El ácido palmítico es el precursor del ácido esteárico y de ácidos graso saturados de cadena más larga, así como de los ácidos monoinsaturados palmitoleico y oleico. El proceso no termina aquí. A partir de estos ácidos grasos o sus distintas combinaciones, y del ácido fosfatídico, se componen los triglicéridos, moléculas complejas cuya acumulación constituye una reserva energética en la vacuola celular.

Después de la antesis y la fecundación tiene lugar un período de intensa multiplicación celular donde se define el número total de células que van a componer el fruto. Acto seguido tiene lugar el proceso de maduración del embrión y del endurecimiento de hueso. Inmediatamente después empieza el proceso de elongación celular y es cuando comienzan los procesos de lipogénesis. Esto se puede situar en el tiempo en nuestras latitudes a partir de mediados de junio, más o menos. La lipogénesis, como hemos visto, termina muy cerca del envero del fruto, cuyo inicio depende de las condiciones climáticas (Ybarra, 2013; Nelson, 2006).

1.7. Espectroscopia NIR

Se considera a Karl Norris "padre" de los modernos análisis de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). Su laboratorio estaba comprometido en los años 60 en el desarrollo de un método rápido para medir el contenido de humedad en la harina. Después de varios avatares, se logró la predicción conjunta de los contenidos de humedad, proteína y aceite en la harina (Norris *et al*, 1965). El logro fue mayor de lo esperado, ya que se alcanzó una técnica multi-paramétrica. El ámbito de aplicación inicial de la espectroscopía NIRS fue el de los productos agrícolas, pero pronto su interés llegó a muchas otras áreas (Norris, 2005).

La espectroscopía NIRS (750-2500 nm) utiliza la interacción entre la radiación del infrarrojo cercano y la materia para caracterizar algunas propiedades de un material

dado. La técnica se basa en calibraciones o modelos multivariable, en los que los datos espectrales se correlaciona con la función analizada. Los espectros NIR están dominadas por bandas de absorción asociados con los grupos funcionales CH, OH o NH. La suma de estas vibraciones induce bandas de combinación o armónicos que son aproximadamente múltiplos de las frecuencias fundamentales (Davies, 2005). Esto significa que los espectros NIR son mucho más complejos de lo que parecen.

Las aplicaciones principales actuales de la espectroscopía NIRS corresponden al sector de la alimentación. Estas incluyen desde la determinación de la proteína, humedad, grasa y fibra en los granos o harinas, hasta la caracterización de la calidad de los productos tan diversos como café, miel, carne o pescado. NIRS facilita también la determinación de las propiedades cualitativas de sustancias diversas, desde gasolina a comprimidos farmacéuticos (Flinn, 2005). Un número cada vez mayor de aplicaciones NIRS están siendo utilizados en sectores como el farmacéutico (Codgill, *et al.*, 2005) o el medio ambiente (Malley, *et al.*, 2005). Además, se están desarrollando sus aplicaciones médicas. La cuantificación de hemoglobina en sangre o aplicaciones en la cirugía plástica y reconstructiva (Flinn, 2005) o estudios del cerebro (Elwell, *et al.*, 2005) son algunos ejemplos. NIRS proporciona varias ventajas importantes, como la de no requerir disolventes o reactivos, evitando así un gasto importante, facilitando la protección del medio ambiente. Este último aspecto es cada vez más importante. Además, NIR es una técnica rápida, no destructiva y potencialmente multiparamétrica.

La posibilidad de determinar por NIRS los principales parámetros de calidad del aceite de oliva, tales como la acidez, peróxidos, K270 y K232, se ha informado en diversos estudios (Conte *et al.*, 2003, Mailer, 2004; Armenta *et al.*, 2007, Bendini *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008; Cayuela *et al.*, 2013). De hecho, las técnicas NIRS se utilizan como un método para el análisis de rutina de estos parámetros en un número creciente de laboratorios. Se ha propuesto también la posibilidad de medir la estabilidad oxidativa del aceite de oliva mediante Vis/NIR como técnica alternativa a Rancimat, método que requiere mucho tiempo de análisis (Cayuela *et al.*, 2013), así como la determinación de clorofilas totales y carotenos totales mediante espectroscopía visible (Cayuela *et al.*, 2014). Se ha informado de la posibilidad de analizar la composición de ácidos grasos del aceite de oliva mediante NIRS (Mailer, 2004; Cayuela *et al.*, 2015), así como de estimar la composición de triglicéridos (Cayuela *et al.*, 2015).

En cuanto a la aplicación de NIRS a aceituna intacta, se ha evaluado en varios estudios para la determinación de diversos parámetros de calidad. León *et al.* (2004) informaron por primera vez de la utilización de NIRS en aceituna intacta como una herramienta útil en la mejora del olivo, utilizando RMN como método de referencia. En dicho estudio se obtuvieron modelos NIRS de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) con errores de predicción suficientemente bajos para el análisis del contenido de aceite (SEC

= 1,33), la humedad (SEC = 1,88) y la composición de ácidos grasos, con SEC de 2,91 y 4,73 para los ácidos oleico y linoleico en aceituna intacta.

Cayuela et al. (2010) informaron del buen potencial de modelos predictivos de parámetros de calidad de la aceituna intacta, incluyendo la humedad, materia seca, contenido de aceite, aceite de acidez libre y el índice de madurez, con coeficientes RPD que oscilaron entre 2,51 y 3,18. Se ha informado también de una metodología original de calibración basada en aceitunas individuales utilizando NIRS y extracción con disolventes como análisis de referencia de contenido de aceite de oliva (Cayuela *et al.*, 2009). Varios estudios han informado más recientemente aspectos diferentes sobre aplicaciones similares para las aceitunas intactas (Gracia y León, 2011; Morales-Sillero *et al.*, 2011; León-Moreno, 2012; Salguero-Chaparro *et al.*, 2012; Bellincontro *et al.*, 2012; Bellincontro *et al.*, 2013; Salguero-Chaparro *et al.*, 2013^a; Salguero-Chaparro *et al.*, 2013b; Salguero-Chaparro, *et al.*, 2013c).

La técnica facilita la medida de los parámetros de calidad en el momento en que la aceituna llega a la almazara, analizando el fruto sin necesidad de la molturación requerida por las técnicas tradicionales MC2, Soxhlet, Foss-Let, Autelec, o RMN (Frías *et al.*, 1999). De este modo es posible realizar el pago al agricultor en función de la calidad de su cosecha. Se han realizado estudios comparativos de las técnicas analíticas NIR y RMN para la determinación del contenido graso y la humedad en pasta de aceituna y orujo (García *et al.*, 2005). También es posible el uso de este método para detectar posibles adulteraciones del aceite de oliva (Downey *et al.*, 2002; Wesley *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2001).

Entre las ventajas de este método se encuentra que no requiere preparación de muestra, la rapidez del análisis, así como ser una técnica no destructiva ni contaminante, de bajo coste, alta precisión y puede ofrecer información de varios parámetros de calidad de forma simultánea (Osborne, 1993).

2. OBJETIVOS

La detección de estadíos de aceituna prematura presenta gran interés. La verificación de la hipótesis de que dicha detección pueda realizarse mediante un marcador de recolección basado en su composición de ácidos grasos constituye el principal objetivo de este trabajo. La finalidad de este proyecto es por lo tanto investigar la posibilidad de establecer un marcador bioquímico de recolección, basado en la estimación mediante espectroscopía NIR de la composición de ácidos grasos de la aceituna “Arbequina”. Para ello, se han desarrollado calibraciones predictivas mediante análisis multivariable del espectro visible/NIR, utilizando como valores de referencia los valores de la composición de ácidos grasos medidos mediante cromatografía de gases. Así mismo, otro objetivo de este trabajo ha sido confirmar los resultados de calibración predictiva del índice de madurez obtenidos previamente por el mismo grupo de investigación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Material vegetal:*

Las aceitunas procedieron de parcelas experimentales de la finca Sanabria, situada en el municipio de Utrera, provincia de Sevilla. Así mismo, se tomaron muestras complementarias en dos fechas de muestreo en las parcelas experimentales de la ETSIA (Universidad de Sevilla).

Las parcelas experimentales de la finca Sanabria están ubicadas dentro de una plantación formada por 10 ha de olivos Arbequina, plantados en 2007 en un marco de 4x1,5 m². Esta parcela de olivar en seto de alta densidad (1.667 árboles/ha) se encuentra en su momento de máxima producción (16.583 kg/ha en 2014). Los árboles presentan una altura y anchura media de 2,5 m y 2,2 m respectivamente. La parcela se mantiene en régimen de no laboreo y durante la estación húmeda la entrecalle se deja cubierta con hierba, tratándose con herbicidas bajo los árboles y cortándose durante la estación seca (Figura 5). La poda tiene lugar en el mes de enero de manera que se controla la altura de los árboles, las ramas que presentan un desarrollo excesivo se dirigen hacia el centro de la calle.

El riego se aplica con una tubería portagoteros por fila de árboles, con un gotero de 1.6 L/hora cada 0,5 m. El periodo de riego que habitualmente se realiza en la finca Sanabria ocurre entre mayo y octubre aunque podría interrumpirse en septiembre dependiendo de las lluvias otoñales. El abonado se hace mediante la inyección de soluciones fertilizantes en el agua de riego, el cual, es suficiente para cubrir las necesidades del cultivo.



Figura 4. Vista de la finca experimental.

3.1.1. Diseño experimental y estrategia de riego

El diseño experimental de la finca presentó 4 tratamientos de riego en bloques al azar (Figura 3). Estos tratamientos correspondieron a 1 riego habitual que realiza el agricultor en toda la finca, un tratamiento de riego reponiendo el 100% de las necesidades hídricas del cultivo un tratamiento de riego deficitario reponiendo el 45% de las necesidades hídricas, y un basado en una estrategia de riego deficitario en función de las medidas obtenidas en la planta con sensores de turgencia.

Las parcelas correspondientes a cada tratamiento se indican en la Figura 5.

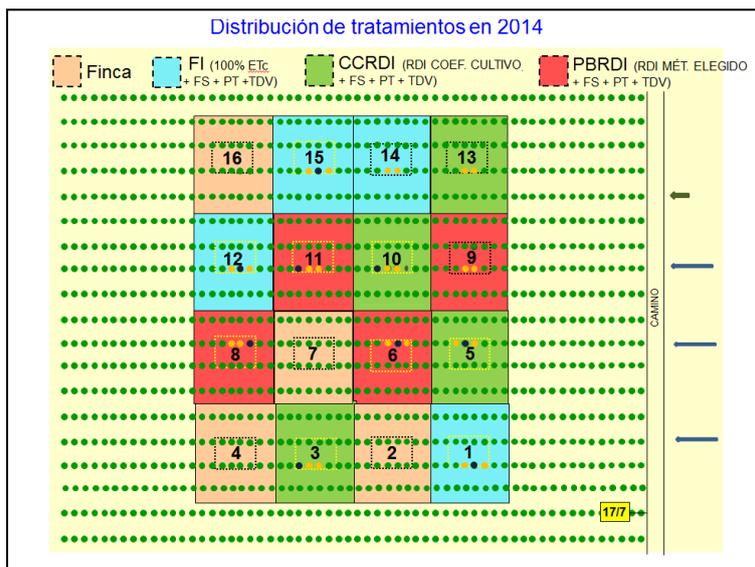


Figura 5. Distribución de los tratamientos en 2014. FI = full irrigation; CCRDI = riego deficitario controlado por coeficiente del cultivo; PBRDI = riego deficitario controlado por sondas ZIM.

3.2. Registro espectros NIR

El registro de espectros Vis/NIR de la aceituna intacta se realizó mediante un espectrómetro Labspec (Analytical Spectral Devices, Boulder). Es un espectrómetro de visible e infrarrojo cercano (Vis/NIR) equipado con tres detectores. El detector para el rango visible (350-1000 nm) es una matriz de diodos holográfico reflectante fija con una sensibilidad de 512 píxeles. El rango de longitud de onda de 1000 a 1800 nm está cubierto por un detector de InGaAs de barrido rápido, enfriado a -25 °C. Se utiliza el mismo detector, junto con un sistema de bloqueo de filtro, para el intervalo de 1800 a 2500 nm. La velocidad de escaneado es de 100 ms. La repetibilidad del instrumento, expresada como desviación estándar de la absorbancia promedio entre 350 y 2500 nm de cinco mediciones de un disco blanco, es $6,0 \cdot 10^{-4}$. Los espectros de las muestras de aceituna intacta se registran directamente en el modo de reflectancia, sin ningún tratamiento excepto la separación de los pedúnculos del fruto, utilizando el accesorio de tabla giratoria del instrumento (Figura 6). Se registró todo el espectro Vis/NIR (350-2500 nm, con intervalos de 1 nm. La adquisición de espectro se llevó a cabo configurando el software para la adquisición continua de 50 espectros. Para ello se empleó la aplicación informática Indico Pro (Analytical Spectral Devices Inc., Boulder). El tiempo de registro es menos de un minuto para cada muestra, con todos los pasos incluidos.

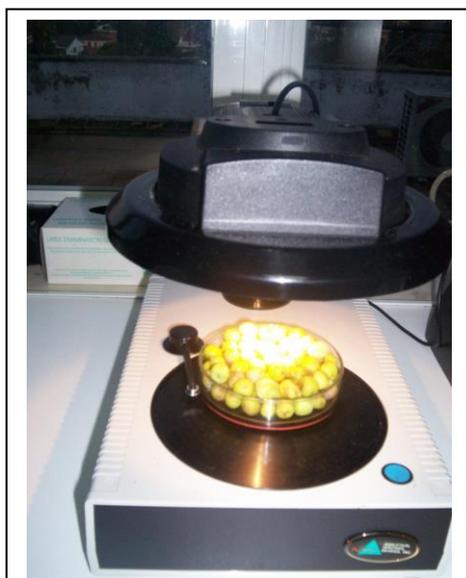


Figura 6. Accesorio de placa giratoria del espectrómetro Labspec.

3.3. *Índice de madurez de la aceituna*

En las fechas de toma de muestras en las que se realizó extracción física del aceite mediante el método MC2 se llevó a cabo la determinación del índice de madurez de la aceituna descrito por Uceda y Frías (1975). Para ello se tomaron 2 kg de aceitunas situadas a la altura del operador en las cuatro orientaciones del árbol. Se homogenizó la muestra, se separaron 100 frutos al azar y se clasificaron en las categorías que se indicaron en la Tabla 2.

El índice de madurez (IM) se obtuvo del sumatorio del número de frutos de cada categoría por el valor numérico de su categoría dividido por 100, es decir, siendo A, B, C, D, E, F, G, H, el número de frutos de cada categoría 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 respectivamente, obteniéndose el índice de madurez según la fórmula [1].

3.4. *Quimiometría y procedimiento de calibración*

Se realizó análisis de componentes principales (PCA) a partir de los espectros de aceituna Arbequina intacta, utilizando The Unscrambler 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Noruega), para analizar posibles agrupamientos y detectar posibles valores espectrales atípicos.

Las calibraciones cuantitativas PLS de índice de madurez y de composición de ácidos grasos se construyen a partir de las variables espectrales visibles Vis/NIR, utilizando como valores de referencia el resultado de su determinación mediante los métodos habituales. Estos fueron el índice de madurez (IM) de Uceda y Frías (1975) y la cromatografía de gases (CG). Los datos espectrales de reflectancia se transformaron a absorbancia y se normalizaron por la media (NM). A continuación, se ensayó el tratamiento de primera derivada de Savitzky-Golay (DISG). Se utilizó el procedimiento de validación interna cruzada completa. El número de componentes principales de los modelos (CP) se estableció después de una primera prueba utilizando 10 CP. Todos los tratamientos anteriores se realizan con The Unscrambler 9.7.

La selección de las variables espectrales que participan en los modelos se realizó mediante varios ciclos sucesivos de eliminación de aquellas cuya contribución era próxima a cero. La selección de variables terminó en el último ciclo que mejoró el valor R^2_{CV} de la calibración. El ajuste de la calibración se evaluó por su R^2 y por la proximidad entre sus valores R^2 y R^2_{CV} , considerando así mismo el error típico de calibración (SEC). Las muestras que presentaron un ajuste visualmente anormal en comparación con la parte restante mayoritaria se identificaron como *outliers*, siendo excluida su utilización tanto en las calibraciones como en las validaciones.

3.5. Validación externa de las calibraciones

La realización de ejercicios de validación externa de las calibraciones de composición de ácidos grasos consiste en su utilización para estimar los valores correspondientes en un conjunto de muestras externo a las calibraciones. Por el limitado número de muestras utilizadas en el método de extracción MC2, solo se han llevado a cabo validaciones externas para las calibraciones obtenidas a partir de los valores de referencia de la extracción por Soxhlet.

Para este propósito, se reconstruyeron las calibraciones reservando para su validación la cuarta parte de las muestras disponibles. Esto se hizo excluyendo una de cada cuatro muestras, por orden cronológico y de numeración de las parcelas experimentales, comenzando desde la primera. De este modo se establecieron los conjuntos de calibración y validación con 48 y 16 muestras respectivamente. Las muestras de estos conjuntos fueron las mismas para las diferentes calibraciones, por lo que las variables espectrales fueron idénticas, difiriendo como es lógico en los valores de referencia correspondientes a los diferentes parámetros analizados.

3.6. Extracción de aceites mediante MC2

La extracción de los aceites mediante el método físico se realizó en los laboratorios del Instituto de la Grasa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IG-CSIC), al igual que todas las tareas de laboratorio que más adelante se describen. Se utilizó para ello un analizador de rendimiento MC2 (MC2, Ingeniería y Sistemas S.L., Sevilla).

En primer lugar se molturaron las aceitunas en el molino de martillos, obteniéndose la pasta de aceituna que se dispuso en cazos de MC2 después de tararlos, anotando el peso de pasta. Después se colocaron los cazos en la batidora a temperatura de batido establecida como la del baño de agua, de 40° C, añadiéndose un 1-2% de talco. Tras 10 minutos de añaden 50 ml de agua por cada 700 gr de pasta, batiéndose durante 20 minutos más. Una vez terminado el batido, se centrifuga durante 1 minuto (3000 rpm), recogiendo la fase líquida al abrir el tapón de la centrifugadora en una probeta. En esta probeta se separó el aceite de oliva virgen de la fase acuosa (agua y alpechín). La fase sólida (orujo) queda adherida a las paredes de la centrifugadora. Una vez recogido el aceite en la probeta, y transcurridos 20 minutos para favorecer la decantación, se mide el volumen de aceite virgen extraído físicamente. Finalmente, se filtra el aceite en papel jarabe, conservándose en un frasco de cristal ámbar, previamente identificado. Con este método se han obtenido aceites de aceitunas de las fechas 30 de septiembre, 29 de octubre y 6 de noviembre.

En la Figura 7 se muestra el equipamiento del sistema de análisis de rendimiento MC2.

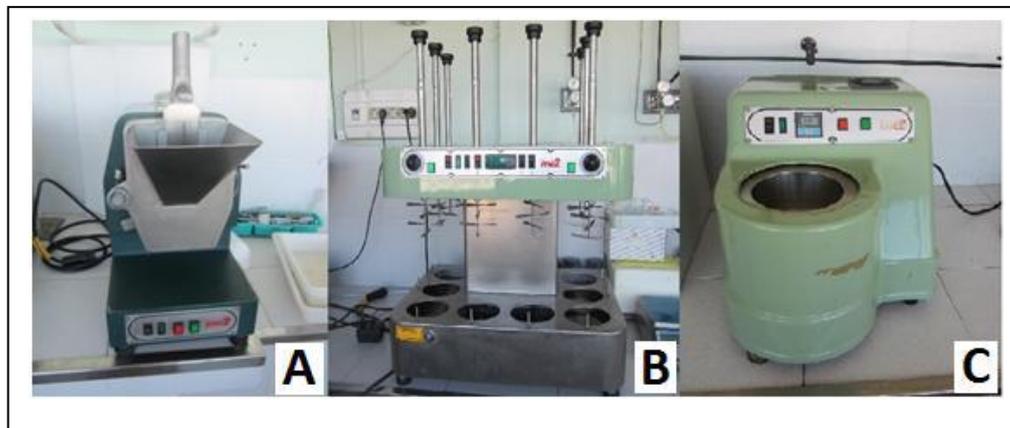


Figura 7. Molino de martillos (A) Termobatidora (B) y centrífuga (C)

3.7. Extracción de aceites mediante Soxhlet

Se llevó a cabo a partir de muestras de pasta seca conservadas. En primer lugar se hicieron e identificaron cartuchos cilíndricos con papel de filtro. A estos cartuchos se añade en la base una porción de algodón y una cucharada de sulfato de sodio, que facilita la eliminación de la humedad y se tara. La pasta seca se molió en molinillo eléctrico, añadiendo unos 20-25 gr de pasta al cartucho, pesando en la balanza y anotando el peso. Se vuelve a añadir una cucharada de sulfato de sodio y una bola de algodón, presionando. El cartucho se cierra haciendo varios pliegues.

Se cogen matraces redondos de base plana, identificándolos y añadiendo 3-4 porciones de plato poroso, los pesamos y anotamos. Montamos el equipo de Soxhlets, en este caso 6 muestras, y dejamos circulando el disolvente un mínimo de 4 horas.

La extracción en Soxhlet funciona cíclicamente, en este caso extrayendo el aceite de la pasta de aceitunas. Cuando se evapora el disolvente sube hasta el área donde es condensado. Aquí, al caer y regresar a la cámara de disolvente, va separando el aceite de la pasta, por lo que el disolvente toma tonalidades verdosas o amarillentas. El hexano deberá circular hasta que en la cámara de disolvente no se aprecie ningún color, lo que indicará que en el matraz se habrá separado todo el aceite (después de un tiempo mínimo de 4 horas).

Se hace una primera separación del disolvente hexano que haya en la cámara y una segunda separación cuando observemos que en el matraz ya no quedan burbujas y no cae más disolvente en la cámara.

El aceite extraído todavía puede contener alguna pequeña cantidad de disolvente, por lo que lo ponemos en el rotavapor a 45-50 °C durante 10 o 15 minutos, asegurando así la ausencia de restos de hexano.

A partir de éste método hemos extraídos el aceite de las aceitunas de las fechas que se incluyen en la Tabla 4.

Fechas (2015)

20 de julio
10 de agosto
3 de septiembre
30 de septiembre
13 de octubre
29 de octubre
6 de noviembre

Tabla 4. Fechas de recolección para extracción Soxhlet.

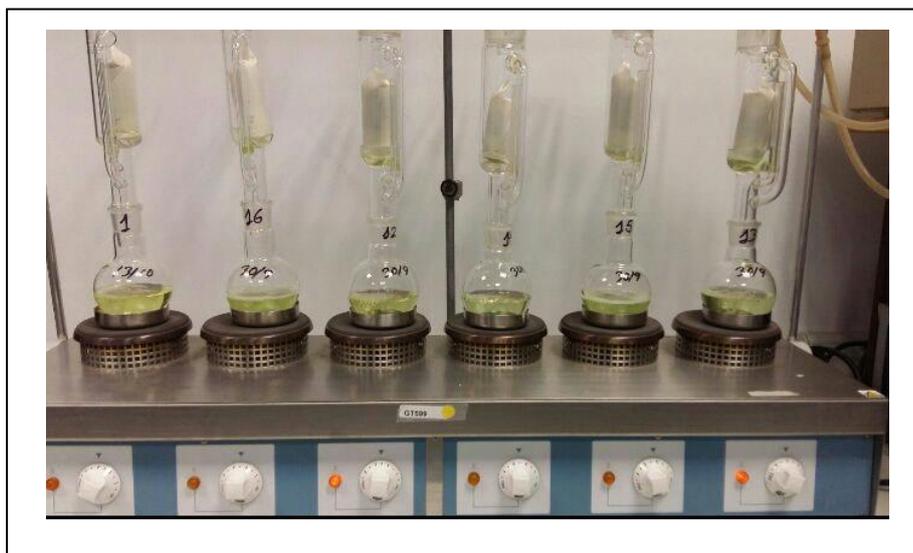


Figura 8. Soxhlet con muestras.

Los resultados en el contenido de aceite obtenidos tras el análisis Soxhlet se incluyen en la Tabla 5.

| Tratamientos: | | Finca 2,4,7,16 | | | CCR : 3,5,10,13 | | |
|---|--------|-----------------------------|---------|---------|------------------------|---------|---------|
| | | Control : 1,12,14,15 | | | PBR : 6,8,9,11 | | |
| <i>Contenido total de aceite en peso húmedo (%)</i> | | | | | | | |
| Parcela | 20/07 | 10/08 | 03/09 | 30/09 | 13/10 | 29/10 | |
| 1 | 4,7258 | 8,5675 | 11,4311 | 15,2905 | 17,8100 | 22,2218 | 26,2317 |
| 2 | 5,1512 | 8,5213 | 15,1862 | 12,7937 | 14,1803 | 27,5230 | 26,5824 |
| 3 | 2,3901 | 3,5421 | 11,0724 | 15,1688 | 12,9961 | 18,8621 | 13,3045 |
| 4 | 4,8080 | 9,9221 | 15,0350 | 12,2145 | 13,4656 | 18,9966 | 11,6393 |
| 5 | 3,9269 | 4,7155 | 12,5325 | 14,3307 | 12,9420 | 15,8311 | 16,7307 |
| 6 | 3,6335 | 6,5499 | 11,3133 | 11,1868 | 12,2291 | 16,3945 | 23,0980 |
| 7 | 5,2527 | 8,5944 | 14,9223 | 14,1824 | 13,7433 | 17,4345 | 26,3255 |
| 8 | 4,5349 | 6,5234 | 13,6220 | 11,1158 | 11,5959 | 19,2282 | 13,3430 |
| 9 | 2,2885 | 3,7926 | 11,3679 | 13,1432 | 14,9051 | 22,1900 | 12,8124 |
| 10 | 2,6754 | 3,9531 | 13,2641 | 14,8206 | 12,9802 | 21,2353 | 25,8823 |
| 11 | 4,0546 | 6,0931 | 16,4078 | 12,2197 | 12,7012 | 19,8099 | 17,2339 |
| 12 | 5,4922 | 10,9302 | 15,7546 | 17,0438 | 10,3287 | 20,0586 | 27,4605 |
| 13 | 2,7700 | 5,2675 | 13,6371 | 16,2570 | 17,7494 | 21,7868 | 26,3796 |
| 14 | 3,9200 | 8,2141 | 13,5718 | 14,9130 | 13,0151 | 24,9859 | 28,4951 |
| 15 | 4,7473 | 10,7005 | 15,7986 | 20,9041 | 20,5385 | 25,7928 | 12,7947 |
| 16 | 6,0054 | 11,5778 | 14,6588 | 14,1760 | 15,5563 | 23,8083 | 14,4394 |

Tabla 5. Contenido de aceite de las muestras utilizadas

3.8. *Determinación de la composición de ácidos grasos:*

El análisis de la composición de ácidos grasos de los aceites de oliva se llevó a cabo mediante cromatografía de gases. La cromatografía es una técnica de separación de gran versatilidad y fácil manejo. Su uso está ampliamente difundido en la investigación científica y en la industria, siendo una herramienta fundamental para el control de calidad de materias primas y productos comerciales.

Debido a la complejidad de la estructura de los ácidos grasos y a la dificultad de determinar exactamente la composición de una grasa mediante los análisis tradicionales, la cromatografía de gases se ha convertido en una herramienta indispensable para establecer el perfil de ácidos grasos.

En esta técnica la muestra, previamente preparada, se volatiliza y es inyectada en el flujo dirigido hacia la columna cromatográfica, que consiste es un tubo relleno con un polímero líquido. El equipo utilizado en este proyecto fue un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 GC System. El proceso de preparación y análisis a seguir fue el siguiente.

- 1) En pequeños viales de vidrio insertamos una gota de las muestras, añadimos 2000 μ l de Heptano y 500 μ l de KOH 2N y agitamos durante 1 min. Dejamos reposar. Extraemos de la parte superior de los viales, con ayuda de una pipeta, la suficiente cantidad para llenar un vial pequeño de plástico, que cerraremos con tapón especial para el cromatógrafo.
- 2) Encendemos el cromatógrafo y seleccionamos el programa que vamos a usar. Abrimos el flujo de gases de Aire, H₂, N₂ en una proporción 2:3:5 respectivamente. Esperamos a que se alcance la temperatura y se produzca el encendido de la llama, ayudando con un mechero en el caso de no ser capaz de encenderse por sí solo tras varios intentos.
- 3) Añadimos las secuencias deseadas, 16 muestras (secuencias)/día y la cantidad que inyectará la jeringa en el cromatógrafo (1 μ l). Colocamos los viales de plástico en la ruleta, comprobamos que el cero y el valor que se muestra no difieren de forma significativa, pulsamos “Start” y comenzamos a medir.

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo fueron de 200 °C de temperatura del horno, 5 bar de presión de flujo de nitrógeno , 2 bar de presión de flujo de aire, 3 bar de presión de flujo de hidrógeno. La temperatura del detector se fijó en 240 °C y el tiempo de análisis de cada muestra en 13 minutos.



Figura 9. Cromatógrafo de gases

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de la población experimental

En la Tabla 6 se incluyen los datos estadísticos de los valores de referencia, resultantes de la determinación mediante CG de la composición de ácidos grasos, utilizados para la elaboración de las calibraciones. Como se observa por los valores de rango y desviación típica, la diversidad de dicha composición en el conjunto de muestras analizado fue bastante amplia. Esto es lógico teniendo en cuenta que las tomas de muestras se realizaron desde el 20 de julio hasta el 6 de noviembre en el caso de la extracción Soxhlet y desde el 30 de septiembre hasta el 6 de noviembre en el caso de la extracción física por el sistema MC2.

El índice de madurez (Uceda y Frías, 1975) de la aceituna evolucionó de forma acorde con las fechas de recogida, siendo en promedio 0,59 en la toma de muestras de 29 de septiembre, 1,59 en la de 29 de octubre y 1,87 en la de 6 de noviembre. Como puede verse en la Tabla 7, incluso en esta última fecha de recogida el índice de madurez no llegó al valor 2, por lo que la aceituna fue mayoritariamente de color verde amarillento, no habiendo llegado al inicio del envero. Es importante destacar las diferencias registradas en el índice de madurez entre los diferentes tratamientos de riego para las mismas fechas de recogida de la aceituna, que muestran una tendencia clara en las tres tomas de muestras.

| | <i>Soxhlet</i> | | | <i>MC2</i> | | |
|--------------|----------------|----------|-------------|------------|----------|-------------|
| | \bar{x} | σ | Rango | \bar{x} | σ | Rango |
| Palmítico | 16,7 | 1,5 | 12,2 – 20,1 | 17,7 | 1,4 | 13,5 – 20,1 |
| Palmitoléico | 1,6 | 0,7 | 0,9 – 3,5 | 1,9 | 0,6 | 0,8 – 4 |
| Esteárico | 2,4 | 0,4 | 1,5 – 4,7 | 2,0 | 0,4 | 1,2 – 3,3 |
| Oleico | 63,6 | 2,8 | 55 – 67,6 | 63,0 | 2,6 | 57,3 – 70,7 |
| Linoleico | 13,7 | 0,7 | 11 – 15 | 13,7 | 1,4 | 9,1 – 16,6 |
| Araquídico | 0,5 | 0,2 | 0,4 – 1,6 | 0,4 | 0,2 | 0,2 – 0,8 |
| Linolénico | 0,4 | 0,1 | 0,2 – 1,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 – 1 |
| Gondoico | 1,1 | 1,0 | 0,7 – 1,7 | 0,7 | 0,3 | 0,6 – 1,7 |
| Behénico | 0,3 | 0,1 | 0,1 – 0,5 | 0,2 | 0,06 | 0,1 – 0,3 |

Tabla 6. Datos estadísticos de los valores de referencia de composición de ácidos grasos

| Índice de madurez | | | |
|-------------------|--------|--------|-----------------|
| 29-sep | 29-oct | 06-nov | Tratamientos |
| 0,43 | 1,15 | 1,46 | Finca |
| 0,40 | 1,23 | 1,63 | 100% |
| 0,44 | 1,57 | 1,99 | CC |
| 1,11 | 2,41 | 2,42 | PB |
| 0,59 | 1,59 | 1,87 | PROMEDIO |

Tabla 7. Índice de madurez según tratamiento y fecha.

4.2. Evolución de la composición de ácidos grasos

Interesa destacar que en la evolución de la composición de ácidos grasos se observó el efecto de los diferentes tratamientos de riego aplicados a las parcelas. Destacaron especialmente por su variación con tendencias claras los ácidos palmítico, oleico, palmitoleico, linoleico y gondoico, mostrando los demás ausencia de tendencia o cierta estabilidad.

El ácido palmítico, cuya evolución se muestra en la Figura 10, presentó tendencia creciente a lo largo del desarrollo de la aceituna. Se observan picos que corresponden a algunas parcelas, siendo razonable pensar que son debidos a los diferentes tratamientos de riego aplicados.

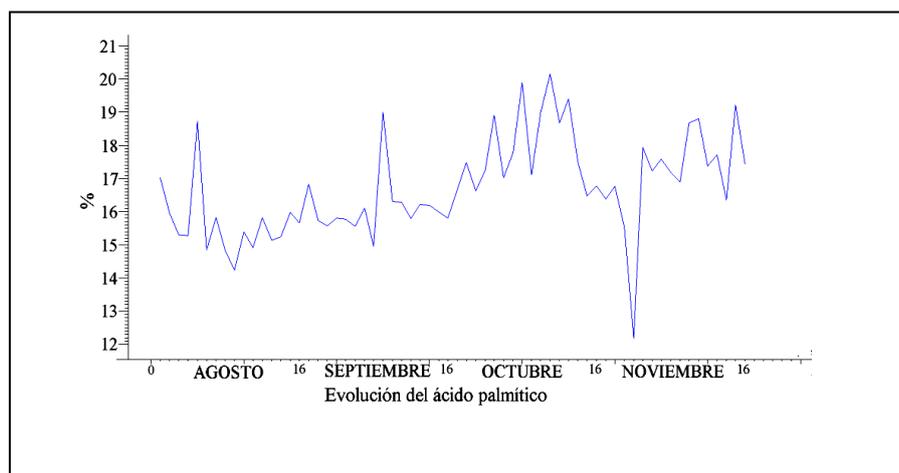


Figura 10 . Evolución de la proporción de ácido palmítico

La fluctuación de la proporción de palmítico en las diferentes parcelas corresponde en sentido inverso a la que se observa para el ácido oleico (Figura 11), cuya evolución mostró tendencia descendente.

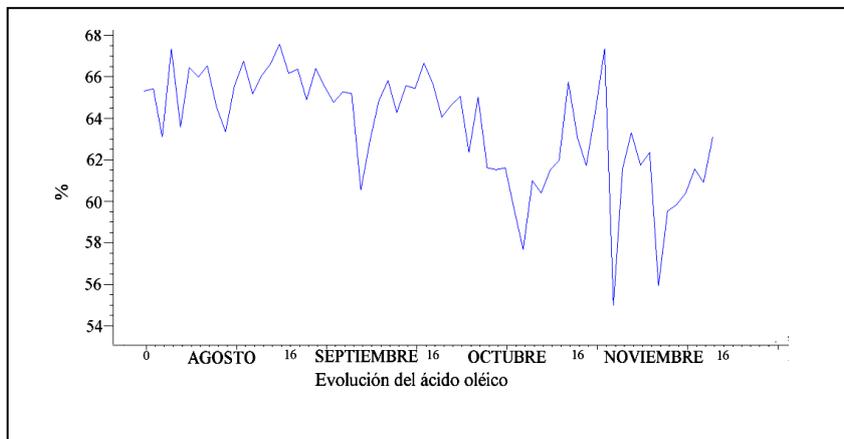


Figura 11. Evolución de la proporción de ácido oleico.

Comportamiento análogo al del ácido palmítico mostraron los ácidos palmitoleico (Figura 12) y linoleico (Figura 13) con tendencia también ascendente a lo largo del desarrollo y maduración del fruto.

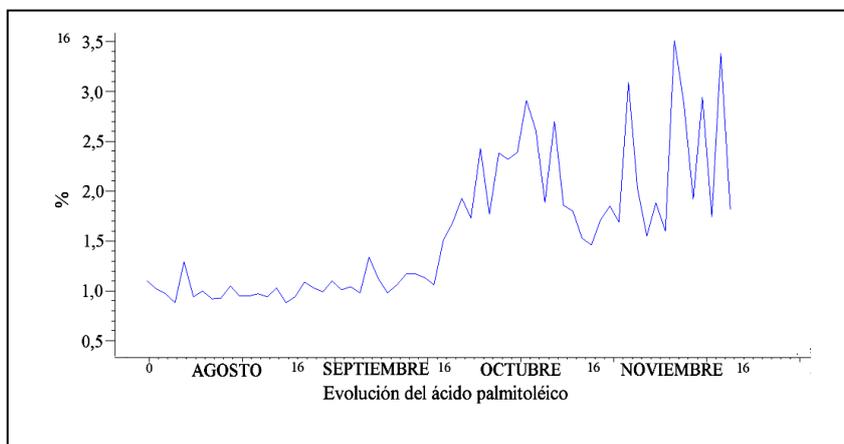


Figura 12 . Evolución de la proporción de ácido palmitoleico.

El ácido gordo por el contrario presentó una tendencia descendente con pendiente homogénea a lo largo de los estadios finales de desarrollo de la aceituna (Figura 14), exceptuando cuatro picos marcados que se observaron. Correspondieron dos de ellos descendentes en octubre, a las parcelas P6 y P8,

ambas con tratamiento de riego PBRDI. En noviembre se registró un ascendente de la parcela P5, con tratamiento CCRDI, y otro descendente de la P15, con tratamiento FI.

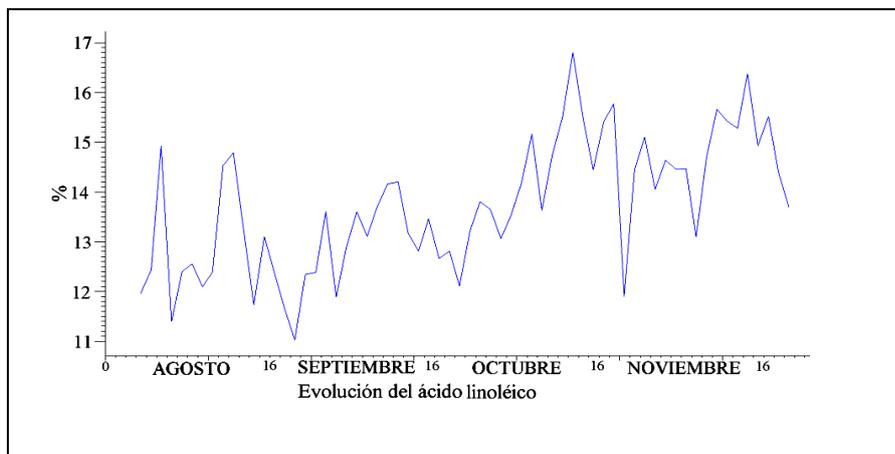


Figura 13 . Evolución de la proporción de ácido linoleico

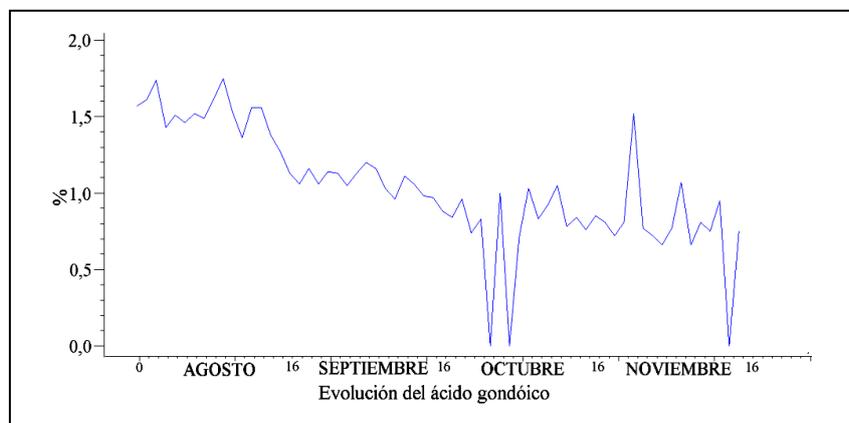


Figura 14. Evolución de la proporción de ácido gondoico

4.3. Espectro de la aceituna Arbequina intacta

En la Figura 15 se muestra el espectro de reflectancia de las muestras de aceituna Arbequina, adquiridos con el espectrómetro Labspec.

Los espectros de infrarrojo cercano muestran bandas solapadas, resultado de primer y segundo armónicos y combinación de vibraciones moleculares fundamentales,

principalmente de los enlaces carbono-hidrógeno. La asignación de las principales bandas de absorción en el infrarrojo cercano de los productos agrícolas se han descrito en diversas publicaciones, tales como Shenk et al. (Shenk *et al.*, 2001) o Harwood y Aparicio (Harwood, *et al.*, 2000) entre otros.

En la Figura se muestran los espectros de absorción de las muestras de aceituna Arbequina intactas. El espectro presenta características similares a las previamente descritas (León, *et al.*, 2004) más allá de las diferencias con respecto a las longitudes de onda adquiridas. Se observan bandas de alta intensidad, relacionadas con la fuerte absorción del agua, visibles a partir de su primer armónico desde 1400 a 1500 nm y en la combinación de bandas a 1880-2100 nm.

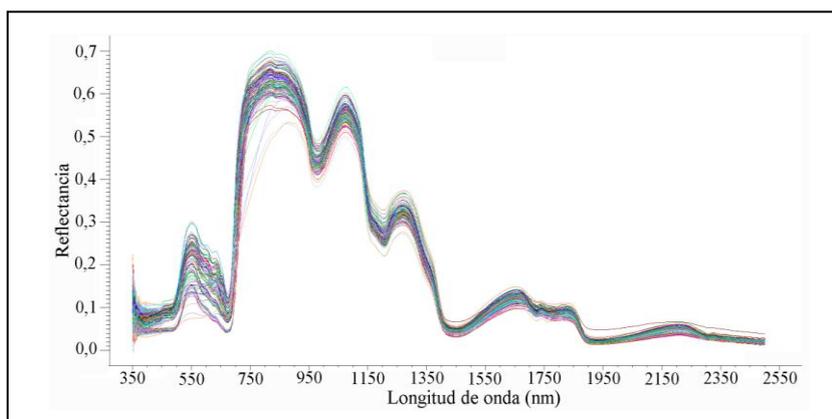


Figura 15. Espectro de reflectancia de la aceituna Arbequina intacta

Existe una amplia banda de absorción alrededor de 1220 nm, probablemente debida al contenido de aceite y a armónicos segundos de vibración de los enlaces C-H y CH=CH- (Hourant, *et al.*, 2000) .Las longitudes de onda visibles muestran bandas de 600-650 nm en las que se observa un aumento de absorción, tal vez debido a la presencia en las muestras de pigmentos antocianos, que contribuyen al color rojizo, así como verde y colores amarillos que aparecen a 550-625 nm. El color púrpura coincide con la zona de ruido al comienzo del espectro.

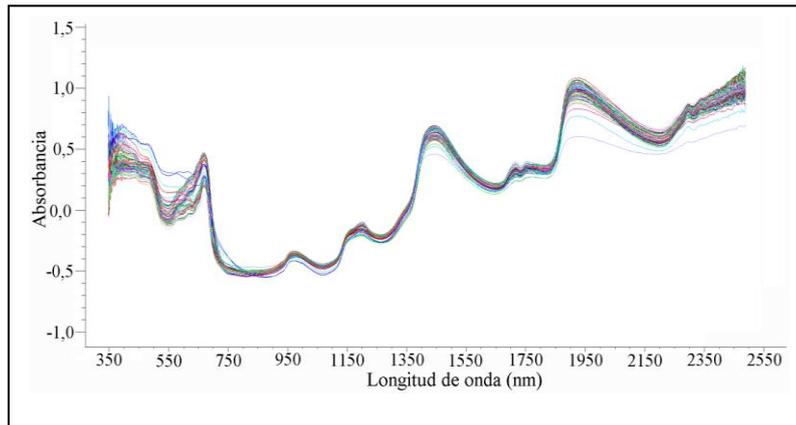


Figura 16. Espectro de absorbancia de la aceituna Arbequina intacta

En la Figura 17 se muestran los mismos espectros de la figura anterior después de recibir tratamiento de derivada 1ª de Savitsky-Golay.

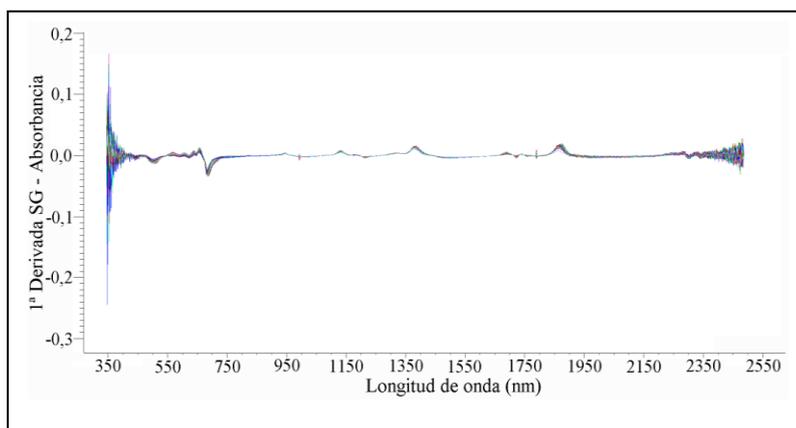


Figura 17. Espectro de 1ª derivada Savitzsky Golay de absorbancia de aceituna

4.4. Análisis PCA

En la Figura 18 se puede observar el resultado del Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado sobre los espectros de las muestras de aceituna Arbequina intacta de las fechas de recogida en las que se llevó a cabo extracción por el método Soxhlet. En dicho análisis destacan bien diferenciados dos grupos de muestras que coinciden con las fechas de recogida 10 de agosto y 3 de septiembre. En un tercer grupo formado por las recogidas en 13 de octubre y 6 de noviembre las muestras no aparecen mezcladas, y aunque pueden separarse con facilidad, como se indica en la Figura 18, distancia en dicha separación es prácticamente inexistente. Tres muestras de esta última recogida, 6 de noviembre, correspondientes a las parcelas 9, 10 y 13, aparecen muy segregadas tanto de su grupo como de las restantes. Las parcelas 10 y 13 corresponden ambas al

tratamiento de riego CCRDI, y la parcela 9 al tratamiento PBRDI, por lo tanto las tres tienen en común aportes de agua más reducidos que en los otros tratamientos de riego.

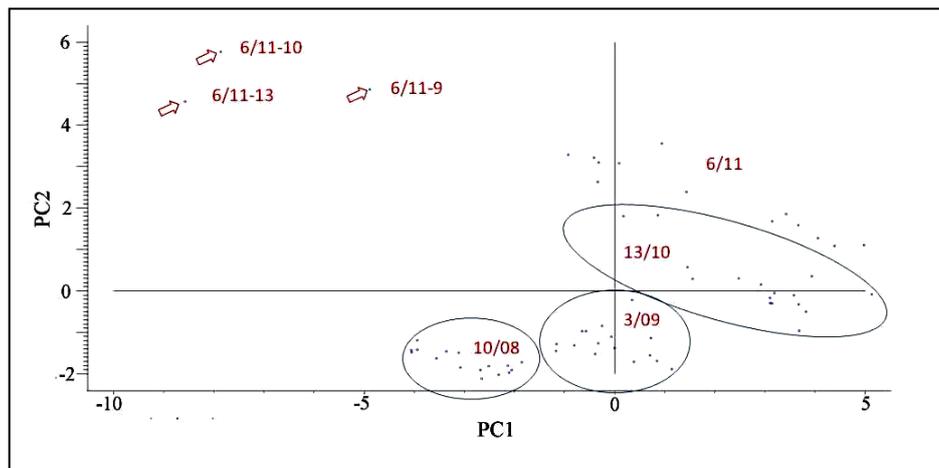


Figura 18 . Análisis PCA – Método Soxhlet

El análisis PCA de los espectros de las fechas de recogida en las que se realizó extracción por el método físico MC2 se muestra en la Figura 19. Como en las fechas de recogida en las que se llevó a cabo extracción por el método Soxhlet, las muestras de las parcela 9, 10 y 13 extraídas por el método MC2 de la recogida de 6 de noviembre presentan igual segregación, coincidiendo el área de su ubicación en el gráfico de PCA con el anterior, ya que de hecho se trata de los mismos espectros. En este caso aparecen separadas también las fechas de recogida de 30 de septiembre y 29 de noviembre, existiendo menor separación entre ésta última y la de 6 de noviembre.

La separación de las diferentes fechas de recogida en los resultados de análisis PCA tanto de las muestras extraídas por Soxhlet como por MC2 pueden ser debidas al mayor índice de madurez de las aceitunas que se recogieron más tarde. Así mismo, la segregación en la recogida más tardía, de 6 de noviembre, de muestras de las parcelas 10 y 13 (tratamiento de riego CCRDI) y de la parcela 9 (tratamiento PBRDI) coinciden con el índice de madurez mostrado por las aceitunas de estos tratamientos de riego, que fueron de los más altos registrados, respecto a las recogidas en las mismas fechas de los tratamientos FI y 100%, como puede verse en la Tabla 7.

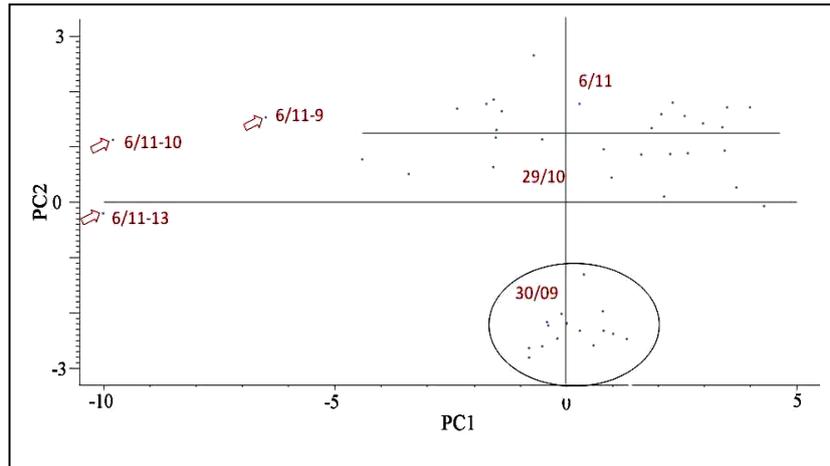
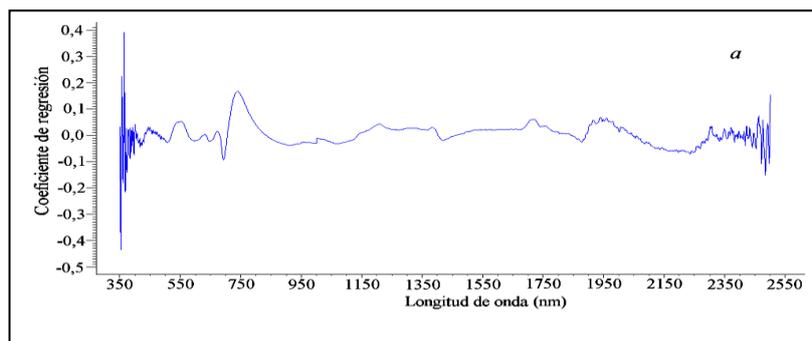


Figura 19. Análisis PCA – Método MC2

4.5. Quimiometría y selección de variables espectrales

Los datos de absorbancia normalizados por la media proporcionaron el mejor ajuste a los datos de calibración y validación predictiva. No obstante, en las calibraciones de los ácidos grasos esteárico y oleico el resultado obtenido fue mejor utilizando tratamiento de derivada 1ª de Savitzsky-Golay de los datos de absorbancia normalizados por la media.

En la Figura 20a se muestra el resultado de la correlación multivariable PLS correspondiente al ácido palmítico, antes del inicio del proceso de selección de variables espectrales. La Figura 20b refleja el resultado a la finalización de dicho proceso.



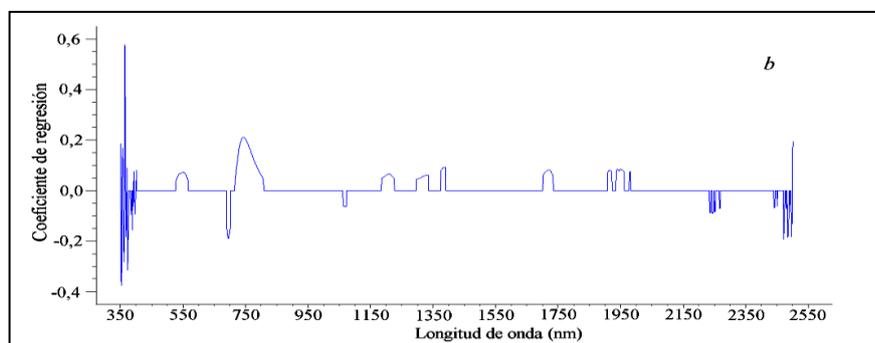


Figura 20. Variables espectrales de la calibración de ácido palmítico
(a antes y b después del proceso de selección de longitudes de onda)

Como puede observarse, solo una pequeña parte de las variables espectrales iniciales fue seleccionada. La contribución aparente de las restantes se demostró inexistente, ya que su eliminación permitió la mejora de la calibración. En ésta última figura, la línea horizontal representa las variables espectrales que no participan en el modelo. Para los restantes ácidos grasos el proceso de selección de variables espectrales fue análogo al caso del ácido palmítico que aquí se muestra como ejemplo.

4.6. Calibración predictiva de índice de madurez

La calibración obtenida a partir de los espectros de aceituna Arbequina intacta de las tomas de muestras en las que se realizó extracción por el método físico MC2, utilizando como valores de referencia los índices de madurez determinados para cada parcela experimental en dichas muestras, se incluye en la Figura 21. Como puede observarse, los indicadores estadísticos muestran la buena aptitud del modelo obtenido. Estos resultados son análogos a los previamente informados utilizando la misma técnica (Cayuela y Pérez-Camino, 2010), coincidiendo con ellos en que ambos ponen de manifiesto la viabilidad de la determinación de índice de madurez en aceituna intacta. Hay que destacar que esta técnica presenta la considerable ventaja de su rapidez respecto a la determinación por el método de referencia (Uceda y Frías, 1979), que es bastante laborioso.

Interesa también observar que el rango de índice de madurez de la aceituna analizada en este estudio no llegó en ninguna de las muestras al valor de 3, que corresponde al final del envero. Puede observarse en la Figura 21 que la aceituna que muestra índices de madurez inferiores a 2 es la mayor parte, habiendo sido recogida por lo tanto antes del

inicio del envero. Recordemos aquí que la escala del índice de madurez es de 0 a 7 y que la definición de los valores de la escala inferiores a 2 consiste en diferenciar las aceitunas de color verde intenso de las que presentan color de su piel verde amarillento. Por lo tanto, si la aceituna se recoge en estadíos de color verde intenso, la utilización exclusiva de un criterio basado en el color no permite conocer si la aceituna en ese momento ofrece la madurez deseable para proporcionar aceite de oliva virgen extra de calidad óptima y sin defectos debidos a un estado prematuro.

El criterio de decisión del momento de recolección seguido en esta investigación ha sido análogo a la tendencia mayoritaria actual de los olivicultores, puesto que la recogida temprana presenta considerables ventajas. Sin embargo, si se generaliza la recolección de aceituna con índices de madurez inferiores a 2, como puede ocurrir en las plantaciones súper-intensivas, el aceite de oliva puede mostrar defectos por no estar la aceituna lo suficientemente madura.

Como se ha indicado, actualmente la detección de estadíos de aceituna prematura presenta gran interés. Por ello se ha estudiado la evolución de la composición de ácidos grasos de la aceituna entre los índices de madurez 0 y 3, expuesta previamente, con el propósito de investigar si es posible establecer un marcador bioquímico de recolección basado en dicha evolución y adicionalmente que este pueda medirse mediante NIR. Interesa aclarar que los posibles defectos sensoriales del aceite de oliva obtenido de aceitunas prematuras pueden proceder de compuestos de naturaleza distinta a la de los ácidos grasos, siendo hasta el presente muy limitada la información científica sobre esta cuestión.

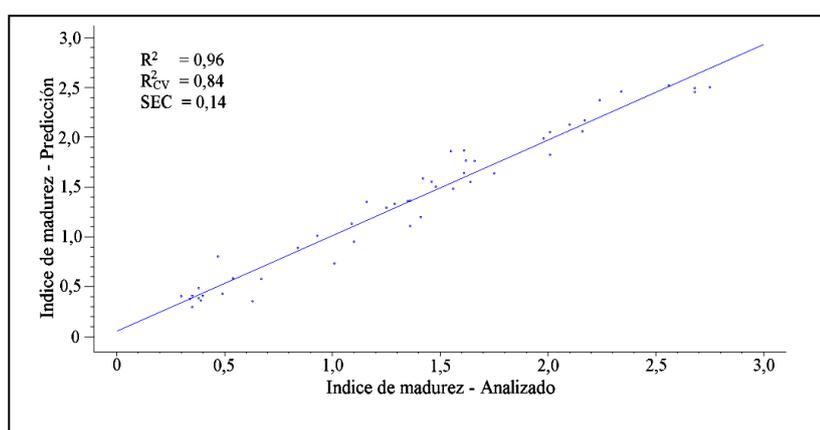


Figura 21. Calibración predictiva de índice de madurez

4.7. Calibraciones predictivas de la composición de ácidos grasos

Los indicadores estadísticos de las calibraciones predictivas de la composición de ácidos grasos del aceite de oliva extraído mediante los métodos Soxhlet y MC2 se incluyen en la Tabla 8.

Se puede destacar la bondad de los indicadores obtenidos para las calibraciones predictivas de los ácidos gondoico, palmitoleico y oleico, considerando conjuntamente los valores R^2_{CV} , R^2 y el número final de muestras que ha participado en cada calibración, una vez que fueron eliminadas muestras que se identificaron como *outliers*.

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, la disminución del ácido palmítico parece ser uno de los hechos contrastados, así como un pequeño aumento del ácido oleico. Sin embargo, ambos datos de la literatura contrastan con los obtenidos en este estudio, que son contrarios, ya que hemos observado ascenso de los ácidos palmítico, palmitoleico y linoleico, mientras que los ácidos oleico y gondoico mostraron tendencia descendente, como se expuso en el apartado 4.2. Estas circunstancias hacen pensar que el conocimiento existente sobre la evolución de la composición de ácidos grasos en los estadios de desarrollo de la aceituna previos al índice de madurez 3, y en especial para aceituna Arbequina, es todavía limitado. Sin embargo, por analogía con un estudio ya citado (Faouzi Sakouhi, et al., 2011), cabe pensar que la medida de la proporción del ácido palmítico o del palmitoleico podrían llegar a ser buenos marcadores del estado de madurez del fruto aconsejable para su recolección. En el caso de los datos de la evolución de los ácidos palmítico y palmitoleico en este estudio, cabría la posibilidad de sugerir la necesidad de que éstos alcancen proporciones mínimas del 17% y 2% respectivamente. Se necesita más investigación para establecer conclusiones.

| | <i>Soxhlet</i> | | | | | <i>MC2</i> | | | | |
|--------------|----------------|----|----------------|------------------------------|------|------------|----|----------------|------------------------------|------|
| | T | N | R ² | R ² _{cv} | SEC | T | N | R ² | R ² _{cv} | SEC |
| Palmítico | Abs | 51 | 0,79 | 0,76 | 0,61 | Abs | 49 | 0,89 | 0,81 | 0,47 |
| Palmitoleico | Abs | 59 | 0,86 | 0,80 | 0,23 | Abs | 46 | 0,93 | 0,78 | 0,14 |
| Esteárico | D1SG | 57 | 0,80 | 0,74 | 0,13 | Abs | 48 | 0,81 | 0,78 | 0,15 |
| Oleico | D1SG | 58 | 0,89 | 0,82 | 0,84 | Abs | 49 | 0,88 | 0,77 | 0,79 |
| Linoleico | Abs | 64 | 0,69 | 0,66 | 0,73 | Abs | 53 | 0,72 | 0,59 | 0,63 |
| Araquídico | Abs | 51 | 0,85 | 0,83 | 0,10 | Abs | 53 | 0,13 | 0,08 | 0,12 |
| Linolénico | Abs | 48 | 0,97 | 0,83 | 0,03 | Abs | 52 | 0,08 | 0,02 | 0,10 |
| Gondoico | Abs | 60 | 0,93 | 0,87 | 0,08 | Abs | 48 | 0,55 | 0,36 | 0,05 |
| Behénico | Abs | 57 | 0,80 | 0,77 | 0,06 | Abs | 13 | 0,97 | 0,92 | 0,02 |
| Linol./Ole. | Abs | 63 | 0,77 | 0,69 | 0,03 | Abs | 53 | 0,76 | 0,58 | 0,01 |

Tabla 8. Indicadores estadísticos de calibraciones predictivas de composición de ácidos grasos del aceite extraído (%).

La evolución quizá mejor contrastada corresponde al ácido linoleico, habiéndose informado del aumento de su porcentaje a lo largo de la maduración del fruto (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán, 2000; Menz y Vriesekoop, 2010; Modi, *et al.*, 1992; Arnon, *et al.*, 2011). Lo anterior está de acuerdo con la evolución del ácido linoleico observada en este estudio.

4.7.1. Aceite extraído por el método Soxhlet

La Figura 22 muestra la representación de la calibración predictiva de ácido palmitoleico, obtenida a partir de la composición de ácidos grasos del aceite extraído mediante el método Soxhlet. Cinco muestras del total disponibles se identificaron como *outliers* siguiendo el criterio indicado en la sección 3.3., por mostrarse separadas respecto al conjunto restante.

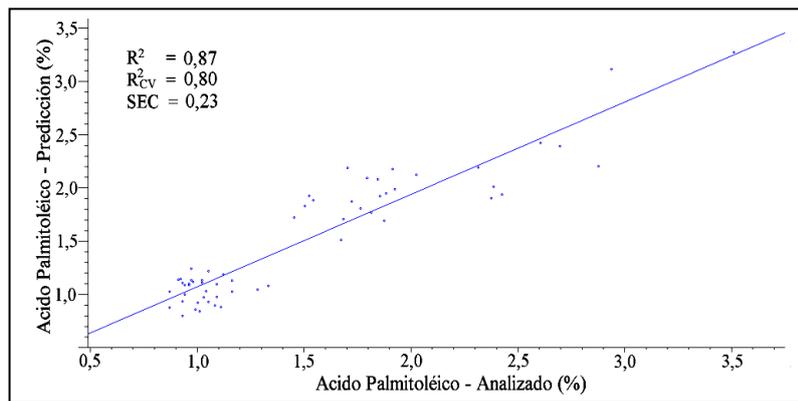


Figura 22. Calibración predictiva de la proporción de ácido palmitoleico.

La calibración del ácido oleico se representa en la Figura 23, mostrando buenos indicadores estadísticos. Se utilizan los coeficientes cuadráticos de los estadísticos R y R_{cv} por ser los habitualmente utilizados en análisis multivariable. Conviene indicar que por ejemplo el valor 0,86 de R² corresponde a R de 0,93.

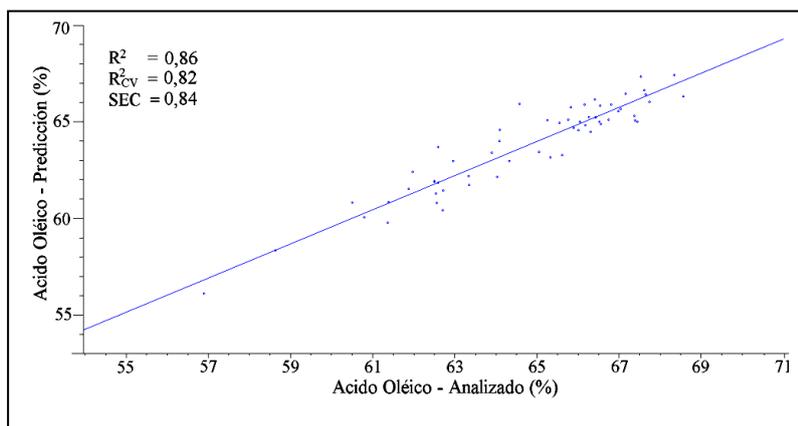


Figura 23. Calibración predictiva de la proporción de ácido oleico

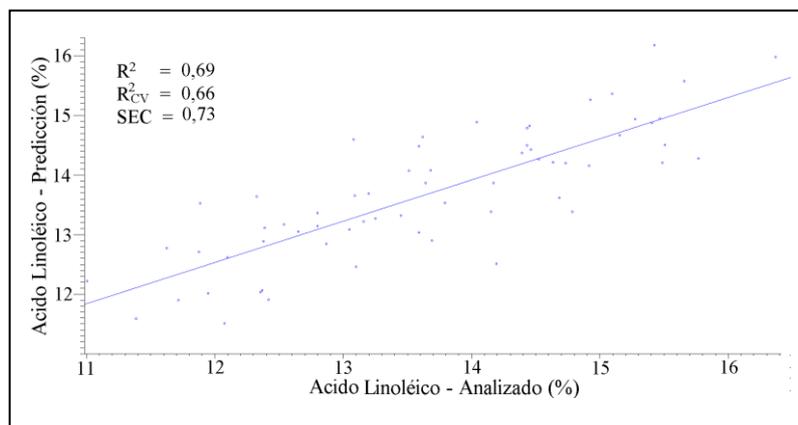


Figura 24. Calibración predictiva de la proporción de ácido linoleico

La calibración predictiva obtenida para el ácido linoleico presentó estadísticos algo inferiores a la anterior. Hay que destacar que aunque el conjunto de muestras en ésta presentó una dispersión más bien alta, no se identificó ninguna de las muestras como *outlier*, por lo que en esta calibración participó la totalidad de las muestras disponibles. Esta puede ser la razón del buen comportamiento que ofreció en el ejercicio de validación extrema, como se explica más adelante.

La determinación de la relación entre los ácidos linoleico y oleico podría ser muy interesante como marcador de recolección, ya que el aumento del ácido linoleico durante la evolución de la aceituna es el hecho mejor contrastado en la literatura. La calibración obtenida en este estudio para la estimación de la relación linoleico/oleico (Figura 25) presenta un resultado aceptable para estimaciones que no exijan una alta exactitud o precisión.

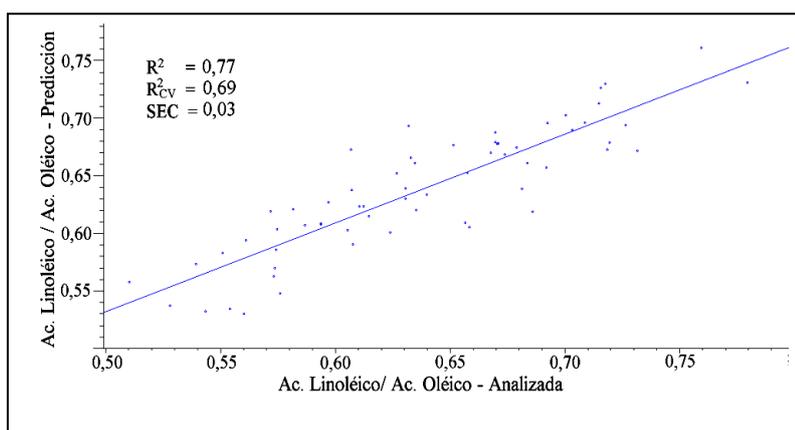


Figura 25. Calibración predictiva de la relación linoleico/oleico

Interesa destacar el resultado de la calibración del ácido gondoico (Figura 26), establecida a partir de la composición de ácidos grasos del aceite del método Soxhlet. Siendo este uno de los ácidos grasos minoritarios, la calibración muestra un grado de bondad que sorprende, en términos relativos, con valores R^2 y R^2_{cv} de 0,93 y 0,87. El número de *outliers* identificado fue de 4, bajo respecto a las calibraciones obtenidas para otros ácidos grasos como palmítico, oleico y palmitoleico. El conocimiento actual que puede encontrarse en la literatura sobre la evolución del ácido gondoico a lo largo del desarrollo de la aceituna es muy reducido. Sin embargo, en este estudio ésta mostró una tendencia descendente muy clara, de pendiente que podría ser homogénea en ausencia del efecto de los diferentes tratamientos de riego aplicados a las parcelas, como ya se ha señalado. Por lo anterior, el ácido gondoico, que presenta la particularidad de

ser el único ácido graso adicional al oleico en la suma de ácidos grasos monoinsaturados del aceite de oliva, podría llegar a constituir un buen marcador de recolección. Sería necesario un conocimiento más extenso de la evolución de éste ácido graso durante el desarrollo de la aceituna Arbequina de olivar superintensivo para en su caso poder establecer esa conclusión con la necesaria base científica.

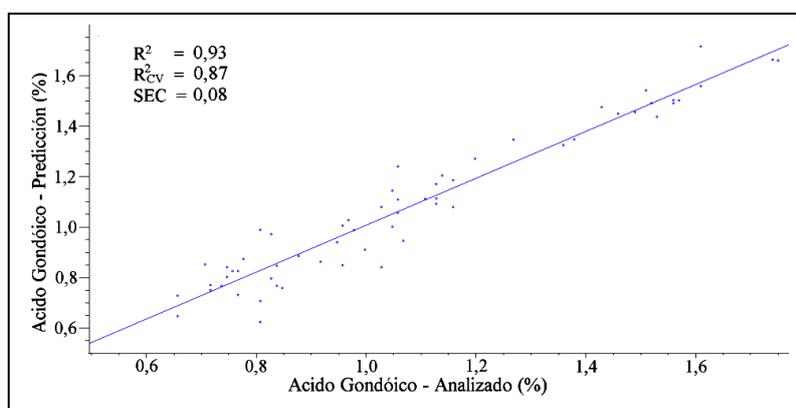


Figura 26. Calibración predictiva de la proporción de ácido gondoico

4.7.2. Aceite extraído por el método MC2

Hay que señalar que el número de muestras para las que pudo llevarse a cabo la determinación de su composición acídica en aceite extraído mediante el método MC2 (55) fue inferior a las del método Soxhlet (64), correspondiendo 7 de ellas a muestras de aceituna tomadas en la plantación experimental de la ETSIA (Universidad de Sevilla) en diciembre de 2015 y enero de 2016. Dos de esas siete muestras se identificaron como *outliers* en las calibraciones de los diferentes ácidos grasos.

Los resultados obtenidos a partir del método físico de extracción fueron acordes con los establecidos utilizando el método Soxhlet para las calibraciones de los ácidos palmítico (Figura 27) y palmitoleico (Figura 28). Esto confirma que es viable la metodología basada en la extracción del aceite de oliva con disolvente para la determinación de la composición acídica.

Sin embargo mediante este método no fue posible establecer una calibración viable para el ácido gondoico. En el caso del ácido behénico cabe señalar que los indicadores estadísticos finales superaron a los de la calibración Soxhlet, si bien se registró un alto número de *outliers*, lo que reduce considerablemente el valor de este resultado (Figura 29).

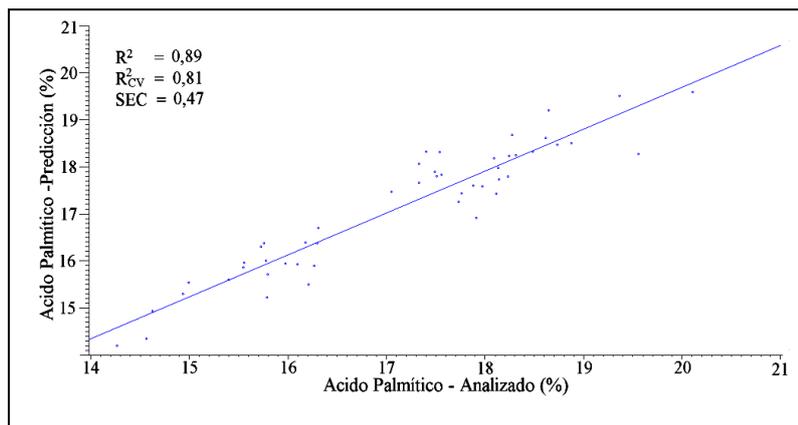


Figura 27. Calibración predictiva de la proporción de ácido palmítico

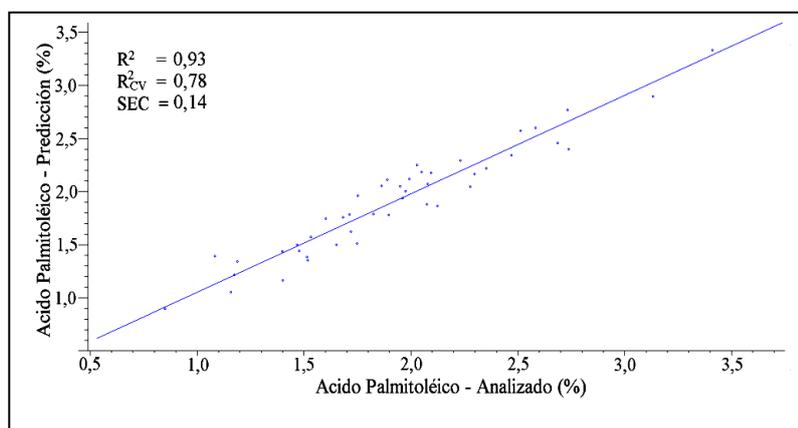


Figura 28. Calibración predictiva de la proporción de ácido palmitoleico

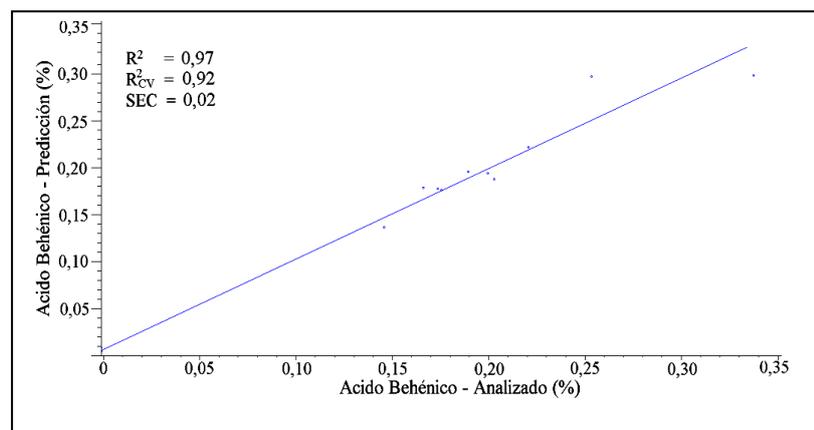


Figura 29. Calibración predictiva de la proporción de ácido behénico

4.8. Validación externa de las calibraciones

Los ejercicios de validación externa de las calibraciones de composición de ácidos grasos se llevaron a cabo únicamente a partir de los resultados establecidos a partir de la extracción Soxhlet. En la Tabla se muestran los indicadores estadísticos de los ejercicios de predicción realizados para la validación externa de las calibraciones.

| Método Soxhlet (N = 16) | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----------|--------------|-----------|--------|-----------|------------|------------|----------|----------|-------------|
| | Palmítico | Palmitoleico | Esteárico | Oleico | Linoleico | Araquídico | Linolénico | Gondóico | Behénico | Linol./Ole. |
| <i>r</i> | 0,33 | 0,75 | 0,28 | 0,50 | 0,88 | 0,57 | 0,63 | 0,91 | 0,66 | 0,84 |
| SEP | 1,47 | 0,54 | 0,70 | 2,85 | 0,51 | 0,33 | 0,05 | 0,13 | 0,07 | 0,03 |

Tabla 9. Indicadores estadísticos de los ejercicios de validación externa.

Como puede verse, en los ejercicios de predicción realizados utilizando las calibraciones de los ácidos gondoico (Figura 30) y linoleico (Figura 31) proporcionaron los mejores resultados. Como antes se indicó, en el caso del ácido linoleico el resultado de la validación mejora el que se esperaba a la vista de los estadísticos de calibración, lo que probablemente es debido a una mayor robustez en términos relativos de dicha calibración, ya que se integraron mejor en ella la totalidad de las muestras que en las restantes. Estos resultados indican que las calibraciones para los ácidos grasos antes destacados son la que ofrecen mayor grado de confianza.

Lo mismo se puede decir para la relación linoleico/oleico (Figura 32), que presentó r 0,84. Este resultado es destacable, ya que dicha relación podría constituir uno de los marcadores más adecuados del grado de madurez conveniente para la recolección de la aceituna.

En la Figura 33 se incluye la validación para ácido palmitoleico, que proporcionó el resultado más satisfactorio después de las validaciones antes comentadas.

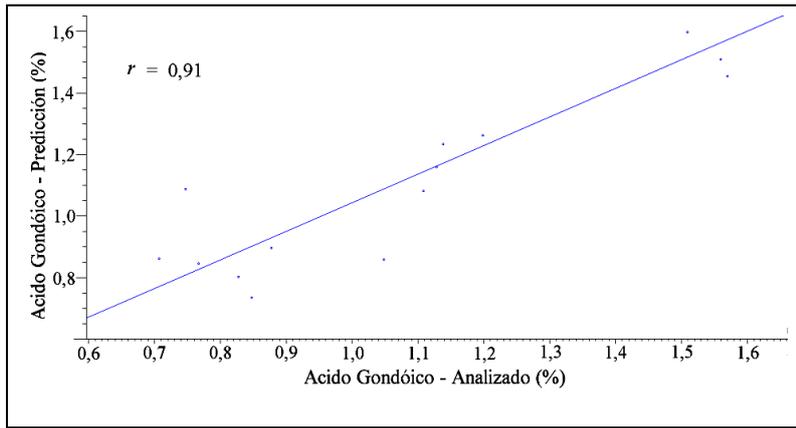


Figura 30. Ejercicio de predicción del ácido gondoico

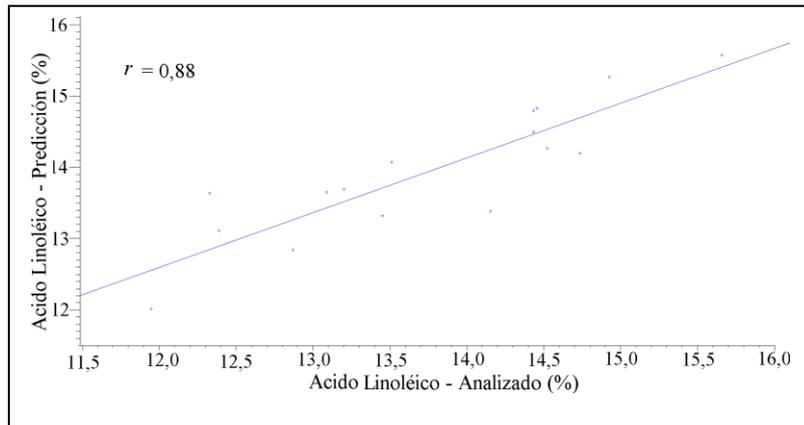


Figura 31. Ejercicio de predicción del ácido linoleico

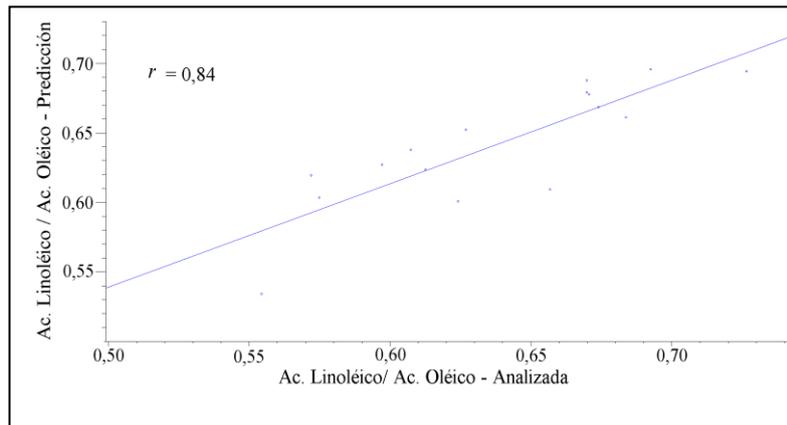


Figura 32. Ejercicio de predicción de la relación entre los ácidos linoleico y oleico

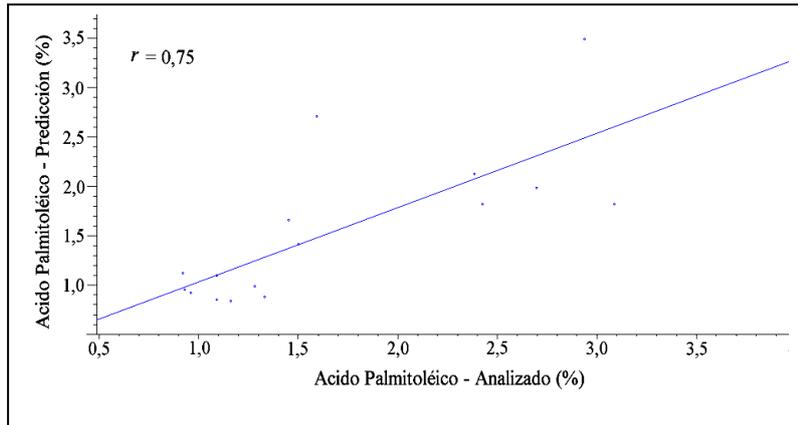


Figura 33. Ejercicio de predicción del ácido palmitoleico.

5. CONCLUSIONES

Tras estudiar la posibilidad de establecer un marcador bioquímico de recolección, basado en la estimación mediante espectroscopía NIR de la composición de ácidos grasos de la aceituna Arbequina hemos obtenido las siguientes conclusiones:

En la calibración obtenida para el índice de madurez, los indicadores estadísticos muestran la buena aptitud del modelo obtenido. Esta técnica presenta la considerable ventaja de su rapidez respecto a la determinación por el método de referencia, que es bastante laborioso.

Los indicadores estadísticos de calibraciones predictivas de porcentaje de ácidos grasos indican que la evolución mejor contrastada corresponde al ácido linoleico, coincidiendo el aumento de su porcentaje a lo largo de la maduración del fruto informado por varios autores con los datos de este estudio.

Los resultados indican que las calibraciones para los ácidos grasos gondoico y linoleico son la que ofrecen mayor grado de confianza.

La determinación de la relación entre los ácidos linoleico y oleico puede ser muy interesante como marcador de recolección, ya que el aumento del ácido linoleico durante la evolución de la aceituna es el hecho mejor contrastado en la literatura. El ejercicio de predicción realizado como validación externa de la calibración para la de la relación linoleico/oleico presentó un estadístico r 0,84. Este resultado es destacable, ya que esta relación podría constituir uno de los marcadores más adecuados del grado de madurez conveniente para la recolección de la aceituna.

Hay que destacar así mismo el resultado de la calibración del ácido gondoico, ya que presenta la particularidad de ser el único ácido graso adicional al oleico en la suma de ácidos grasos monoinsaturados del aceite de oliva. Podría llegar a constituir un buen marcador de recolección, aunque sería necesario un conocimiento más profundo de la evolución de éste ácido graso durante el desarrollo de la aceituna Arbequina de olivar súper-intensivo, para en su caso poder establecer esa conclusión con la necesaria base científica.

Por lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio confirman la hipótesis de que puede llegar a establecerse un marcador de recolección basado en las proporciones de ácidos grasos en la aceituna, aunque se necesita más investigación para poder establecer conclusiones con suficiente base científica. Esta técnica puede ser de ayuda para confirmar la suficiente madurez de la aceituna, en especial para estadíos correspondientes a valores del índice de madurez inferiores a tres.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, M.P., Alba, J., Alvarado, M., Barranco, D., Beltran, D., Fernández, R., Rallo L, et al. "El cultivo del olivo". 6ª edición. Sevilla, Madrid; SA. Mundi-Prensa Libros; 2008.
- Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. 2007. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 596(2), 330-337.
- Bellincontro, A., Taticchi, A., Servili, M., Esposto, S., Farinelli, D., Mencarelli, F. 2012. Feasible Application of a Portable NIR-AOTF Tool for On-Field Prediction of Phenolic Compounds during the Ripening of Olives for Oil Production. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2665-2673.
- Bellincontro, A., Caruso, G., Mencarelli, F., Gucci, R. 2013. Oil accumulation in intact olive fruits measured by near infrared spectroscopy-acousto-optically tunable filter. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1259-1265.
- Bendini, A., Cerretani, L, di Virgilio, F, Belloni, P, Lercker, G, Gallina Toschi, T. 2007. In-process monitoring in industrial olive mill by means of FT-NIR. *Europ. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 498-504.
- Cayuela, J. A., García, J. M., Caliani, N. 2009. NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. *Grasas y Aceites*, 60, 194–202.
- Cayuela J.A., Garcia J.M., Caliani, N. 2009. NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. *Int. J. Fat Oils* 60(2), 194-202.
- Cayuela, J.A., Pérez-Camino, M.C. 2010. Prediction of quality of intact olives by near infrared spectroscopy. *Europ. J. Lipid Sci. and Technol.* 112(11),1209 -1217.
- Cayuela, J.A., Moreda, W., García, J.M. 2013. Rapid determination of olive oil oxidative stability and its major quality parameters using Vis/NIR transmittance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8056-8062.
- Cayuela, J.A., Yousfi, K., Martínez, M.C., García, J.M. 2014. Rapid determination of olive oil chlorophylls and carotenoids by using visible spectroscopy. *JAOCS* 91, 1677-1684.
- Cayuela, J.A., García, J.F., Moreda, W., Pérez, M.C. 2015. Characterization of some olive oil quality aspects by NIRS analysis of its fatty acids and triglycerides. 7th Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Praga, Noviembre, 3-6.
- Cayuela et al. 2009. NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. *Grasas y Aceites*, 60, 194–202.

Cayuela, J.A., Pérez-Camino, M.C. 2010. Prediction of quality of intact olives by near infrared spectroscopy. *Europ. J. Lipid Sci. and Technol.* 112(11), 1209-1217.

Codgill R, Drennen J. Near infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *NIRS news* 2005;16:23-6.

Conte LS, Brussolo G, Pizzale L, Carazzolo A, Meurens M, Pavan O. 2003. Application of near infrared reflectance analysis to olive oil production quality control. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 80(4), 213-217.

Costa A. F., Coelho M. J., Gambarra F. F., Bezerra S. R., Harrop R. K., Ugulino M. C. 2008. NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using PLS and variable selection. *Food Res. Int.* 41, 341–348.

Davies AMC. An introduction to near infrared spectroscopy. *NIRS News* 2005;16:9-01.

Elwell C, Beard P. Shedding light on the brain. *NIRS news* 2005;16:28-0.

Flinn P. An average day (or how near infrared spectroscopy affect daily life). *NIRS News* 2005;16:4-8.

Franco, M.N., 2014. Influencia del estado de madurez del fruto sobre parámetros de calidad, compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes de aceites de oliva vírgenes extremeños. Aprovechamiento de subproductos de almazara. Tesis doctoral.

Frías L., García-Ortiz A., Hermoso M., Jiménez A., Llaverro M.P., Morales J., Ruano M.T. y Uceda M. 1999. Analistas de laboratorio de almazara. En: *Informaciones técnicas*, 64/99 (2ª edición).

Gracia, A., León, L. 2011. Non-destructive assessment of olive fruit ripening by portable near infrared spectroscopy. *Grasas Aceites* 62, 268-274.

García, A., Ramos, N., Ballesteros, E. 2005. Comparative study of various analytical techniques (NIR and NMR spectroscopies, and Soxhlet extraction) for the determination of the fat and moisture content of olives and pomace obtained from Jaén. *Grasas y aceites* Vol 56 No 3.

Goldschmidt, E.E. 1998. Ripening of citrus and other non-climacteric fruits: A role for ethylene. *Acta Horticulturae*, 463, 335-340.

González J. M., Pérez D., Garrido A. y Guerrero J. E. 2004. Non-destructive análisis of intact olive fruits by near infrared spectroscopy: prediction of fat yield and acidity. *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference.* 373-375.

Gracia et al. 2011. Non-destructive assessment of olive fruit ripening by portable near infrared spectroscopy. *Grasas Aceites* 62, 268-274.

- Hidalgo, J., Hidalgo, J.C., Vega, V. (2009). El riego y su relación con la calidad del aceite de oliva virgen extra. *Vida rural*, 296, 30-34
- Hourant, P., Baeten, V., Morales, M. T., Meurens, M., Aparicio, R., Oil and fat classification by selected band.
- Jiménez, A., Izquierdo, E., Rodríguez, F., Dueñas, J. I. Tortosa, C. (2000). Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*, 51, 311-315.
- J. Harwood, R. Aparicio, *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*, Aspen Publishers Inc., 2000. p. 606.
- Leon, L., Garrido, A., Downey, G., Parent and harvest year effects on near-infrared reflectance spectroscopic analysis of olive (*Olea europaea* L.) fruit traits. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4957–4962.
- León-Moreno, L. 2012. Usefulness of portable near infrared spectroscopy in olive breeding programs. *Spanish J. Agric. Res.* 10, 141-148.
- Lozano Sánchez J, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A. “Capítulo 7: Composición del aceite de oliva”. “Aceite de oliva: Tesoro de Andalucía”. Granada: Unicaja Editorial; 2009. p.197-224.
- Mailer, R. J. (2004). Rapid evaluation of olive oil quality by NIR reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 823–827.
- Malley D, Williams P. The future of near infrared spectroscopy: application for the environment. *NIRS news* 2005;16:20-2.
- Medina, M.G., Santos, B. (2013). *Recolección de la aceituna para aceite*, Agrocabildo.
- Morales-Sillero, A., Fernández-Cabañas, V.M., Casanova, L., Jiménez, M.R., Suarez, M.P., Rallo, P. 2011. Feasibility of NIR spectroscopy for non-destructive characterization of table olive traits. *J. Food Eng.* 107, 99-106.
- Moreda, W., Ortega, J. 2015. Los perfiles acídicos en los aceites de oliva virgen extra. *Olimerca*, 15, 42-44.
- Nanos, G.D., Agtsidou, E., Sfakiotakis, E.M.C. 2002. Temperature and propylene effects on ripening of green and black 'Conservolea' olives. *HortScience* 37 (7) 1079-1081.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2006. *Lehninger Principios de Bioquímica*, 4ª edición. Ed. Omega, Barcelona.
- Norris KH, Hart JR, Editors. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. In: *Principles and methods of measuring moisture in liquids and solids*. New York, USA: Reinhold Publishing Corp.;1965. p. 19-25.
- Norris KH. NIR is alive and growing. *NIR news* 2005;16:12.

- Salguero-Chaparro, Lourdes; Baeten, Vincent; Abbas, Ouissam, Peña-Rodríguez, F. 2012. On-line analysis of intact olive fruits by vis-NIR spectroscopy: Optimisation of the acquisition parameters. *J. Food Engin.* 112, 152-157.
- Salguero-Chaparro, L.; Pálagos, B.; Peña-Rodríguez, F., Roger, J.M. 2013a. Calibration transfer of intact olive NIR spectra between a pre-dispersive instrument and a portable spectrometer. *Comput. Electr. Agric.* 96, 202-208.
- Salguero-Chaparro, L., Baeten, V., Fernández-Pierna, J.A., Peña-Rodríguez, F. 2013b. Near Infrared spectroscopy (NIRS) for on-line determination of quality parameters in intact olives. *Food Chem.* 139, 1121-1126.
- Salguero-Chaparro, L., Gaitán-Jurado, A.J., Ortíz-Somovilla, V., Peña-Rodríguez, F. 2013c. Feasibility of using NIR spectroscopy to detect herbicide residues in intact olives. *Food Control* 30, 504-509.
- Shenk, J. S., Workman, J. J., Westerhaus, M. O. Application of NIR spectroscopy to agricultural products, in: D. A. Burns, E. W. Ciurcak, (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edn. Marcel Dekker, Inc., 2001. pp. 419–474.
- Sozzi, G. O. (2007). «Fisiología de la maduración de los frutos de especies leñosas». En Sozzi, G. O. *Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*. Buenos Aires: Facultad de Agronomía. pp. 667-687.
- Uceda, M., Frías, L. Fechas de recolección, evolución del contenido de aceite del fruto, Composición y calidad del aceite. *Proceedings del II Seminario Oleícola Internacional, Consejo Oleícola Internacional, Córdoba 1975*. pp 125–130.