



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

DESARROLLO DE UN MÉTODO VERDE PARA EVALUAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES



Trabajo Fin de Grado

ENRIQUE JACOBO DÍAZ MONTAÑA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica



Grado en Farmacia

DESARROLLO DE UN MÉTODO VERDE PARA EVALUAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

Trabajo Fin de Grado

Trabajo experimental

Enrique Jacobo Díaz Montaña

Tutoras: María Teresa Morales Millán y Dolores Hernanz Vila

Sevilla, 7 de Julio de 2017

Índice	Pág.
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Aceite de oliva y aceite de oliva virgen	3
1.1.1. Composición del aceite de oliva virgen	5
1.1.2. Compuestos fluorescentes y luminiscentes presentes en el aceite de oliva virgen	6
1.2. Oxidación y vida útil del aceite de oliva "Shelf-life"	7
1.3. Aceite de oliva virgen aderezado	11
1.4. Espectrofluorimetría	12
1.4.1. Variables que afectan al proceso	13
2. Objetivos	16
3. Metodología	17
3.1. Muestras	17
3.2. Materiales e instrumentos	18
3.3. Procedimiento analítico	19
3.4. Tratamiento de datos	19
4. Resultados y discusión	21
4.1. Clasificación de la muestra de aceite de oliva virgen	21
4.1.1. Parámetros fisicoquímicos	21
4.1.2. Análisis espectrofluorimétrico	21
4.1.3. Precisión del método espectrofluorimétrico	23
4.2. Evolución del aceite durante el almacenamiento	24
4.3. Aceite de oliva aderezado (romero y albahaca)	26
4.4. Aceite de oliva vs aceite aderezado: aplicación estadística multivariante	30
5. Conclusiones	33
6. Bibliografía	34

RESUMEN

Actualmente, existe preocupación dentro del sector del aceite de oliva por obtener métodos objetivos que permitan predecir, tanto la vida útil de los aceites, como su fecha de consumo preferente. Existen compuestos presentes en el aceite de oliva virgen que poseen propiedades luminiscentes, entre ellos tocoferoles, compuestos fenólicos y pigmentos, cuya determinación puede servir para evaluar e incluso predecir la vida útil del aceite. Durante la autooxidación del aceite varía su composición y se originan compuestos químicos que modifican sus propiedades organolépticas y tienen efecto sobre su valor biológico.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método espectrofluorimétrico preliminar que permita establecer el estado de oxidación de los aceites de oliva vírgenes, basándose en sus espectros de emisión luminiscente y, posteriormente, predecir el tiempo de vida útil de los aceites.

El estudio se ha realizado con aceite de oliva virgen extra. Se utilizaron tres lotes de muestras, sin aderezo, aderezado con romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) y con albahaca (*Ocimum basilicum*, L.), que se almacenaron en recipientes de vidrio transparente, en condiciones naturales de temperatura y periodos luz/oscuridad. Una vez al mes, durante un periodo de 9 meses, se adquirieron los espectros de emisión de las muestras a una $\lambda_{ex} = 330$ nm.

Durante el periodo estudiado se observaron variaciones de intensidad en las bandas del espectro de emisión, debido a la degradación de tocoferoles, compuestos fenólicos y pigmentos, y a la producción de compuestos de oxidación. Estas variaciones fueron intensas durante los primeros meses de almacenamiento, produciéndose de forma gradual a partir del quinto mes, y observándose un cambio de pendiente en la evolución de las bandas relacionadas con la presencia de pigmentos. Se observaron diferencias en esta evolución entre las muestras con y sin aderezo, y entre las muestras con distinto tipo de aderezo.

Palabras claves: aceite de oliva virgen, espectrofluorimetría, vida útil, oxidación, plantas aromáticas.

ABSTRACT

Nowadays, there is concern in the olive oil sector for obtaining objective methods to predict both, the olive oil shelf- life and their preferred date of consumption. There are compounds in virgin olive oils that have luminescent properties, including tocopherols, phenolic compounds and pigments, whose determination can be useful for evaluating and even predicting the shelf- life of the oil. During the autooxidation of the oil its composition varies and chemical compounds that modify its organoleptic properties and have an effect on its biological value are produced.

The objective of this work is to develop a preliminary spectrofluorometric method to establish the oxidation state of virgin olive oils based on their emission spectra and to predict the shelf-life of the oils.

The study was carried out with extra virgin olive oil. Three batches of samples, without dressing, and seasoned with rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) and basil (*Ocimum basilicum*, L.) were used. The oils were stored in transparent glass containers under natural conditions of temperature and light / dark periods. Once a month, over a period of 9 months, the emission spectra of the samples were acquired at $\lambda_{ex} = 330$ nm.

During the studied period, intensity variations were observed in the emission spectrum bands, due to the degradation of tocopherols, phenolic compounds and pigments, and to the production of oxidation compounds. These variations were intense during the first months of storage, occurring gradually from the fifth month, and a change of slope observed in the evolution of the bands related to the presence of pigments. Differences were observed in this evolution between the samples with and without dressing, and between samples with different types of dressing.

Keywords: virgin olive oil, spectrofluorimetry, shelf-life, oxidation, aromatic plants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aceite de oliva y aceite de oliva virgen

El aceite de oliva se define como el aceite obtenido del fruto del olivo (*Olea europea L.*), sin considerar aquellos que han sido obtenidos por disolventes, re-esterificación, o mezcla de diferentes aceites. Según el Consejo Oleícola Internacional se clasifica según varios parámetros físico-químicos, como la acidez o el índice de peróxidos, y parámetros sensoriales, que se evalúan según un método oficial (COI, 2015) valorando atributos sensoriales de aroma y sabor, y estableciendo los valores de la mediana de los defectos sensoriales y del atributo afrutado (COI, 2016). La acidez presente, se expresa en gramos de ácido oleico, que es el ácido mayoritario, por cada cien gramos de aceite; según la Norma (COI, 2016) clasifica en distintos tipos:

- Aceite de oliva virgen: es aquél que se produce únicamente por extracción mecánica u otros métodos físicos en condiciones, particularmente térmicas, que no alteren el aceite, y que no hayan sido sometidos a otro tratamiento que no sea el de lavado, decantación, centrifugación y filtrado. Los aceites de esta categoría se clasifican en cuatro tipos:
 - Aceite de oliva virgen extra: aceite cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos y sus demás características cumplan con las fijadas en la Norma.
 - Aceite de oliva virgen: es aquel cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2 gramos por 100 gramos y sus características cumplan con las fijadas en la Norma para esta categoría.
 - Aceite de oliva virgen corriente: aceite cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 gramos por 100 gramos y cuyas características correspondan a las fijadas para esta categoría en la Norma.
 - Aceite de oliva lampante: Aceite de oliva virgen lampante: no es apto para el consumo en la forma en que se obtiene, su acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 3,3 gramos por 100 gramos y/o cuyas características organolépticas y demás características

corresponden a las fijadas en la Norma. Para que sea apto para el consumo debe sufrir un proceso de refinación.

- Aceite de oliva refinado: se obtiene de aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado que no provoquen cambios en la estructura glicéridica inicial. Además, su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva: es aquel constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramos por 100 gramos.

La producción de aceite de oliva se centra mayoritariamente en Europa, siendo España el mayor productor a nivel mundial (68 %), seguido de Grecia (13 %) e Italia (13 %). Estos países son los responsables del 94 % de la producción europea (Figura 1a) y el 70,9% de la mundial.

El gran valor del aceite de oliva se debe a que, aunque su producción es menor que la de otros aceites, tiene un efecto beneficioso sobre la salud que le proporciona un alto valor añadido en el caso de los vírgenes, principalmente por su composición en ácidos grasos monoinsaturados y por la presencia de componentes menores con carácter bioactivo, responsables de diferentes beneficios para la salud como, por ejemplo, el aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Angerosa et al., 2004; Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Samaniego-Sánchez et al., 2012).

Los beneficios para la salud que aporta el aceite de oliva y su posición dentro de la Dieta Mediterránea han hecho que se produzca un aumento en su consumo durante los últimos años, no solo en países tradicionalmente productores y consumidores, sino también en países tradicionalmente no productores ni consumidores de este tipo de aceite, como se puede ver en la Figura 1b, donde se muestra la evolución de su consumo en este tipo de países durante los últimos diez años. Se observa un aumento gradual desde la campaña de 2008/09 hasta la campaña 2013/14 y una posterior estabilización en valores superiores a los de la campaña inicial a pesar del alto precio del producto en comparación con otros aceites de semillas.

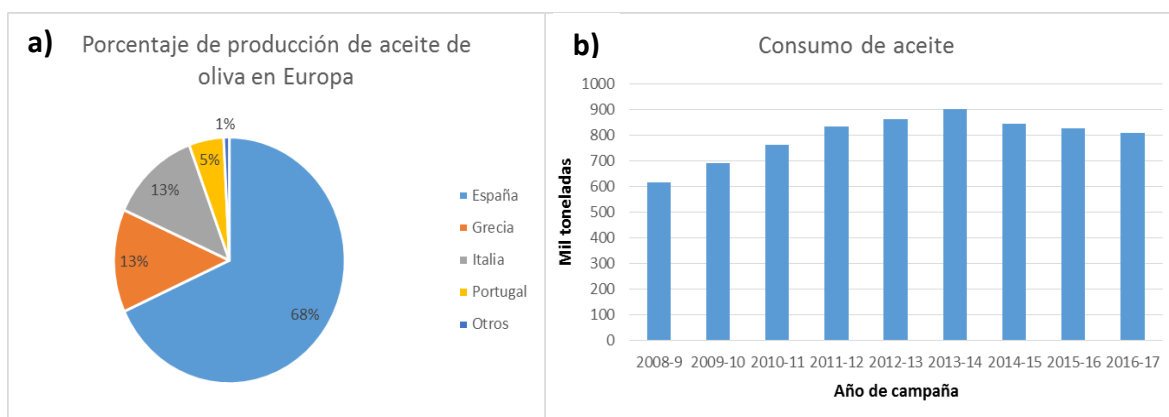


Figura 1. a) Producción en países europeos en la campaña 2016/17; b) Consumo de aceite de oliva en países tradicionalmente no productores.

1.1.1. Composición del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen se compone principalmente de dos fracciones, basándose en la capacidad de los compuestos para reaccionar con los álcalis mediante una reacción de saponificación, la fracción saponificable y la insaponificable, que conforman aproximadamente el 99% y el 1%, respectivamente, del aceite (León-Camacho et al., 2013). A pesar de que la fracción insaponificable está compuesta por componentes minoritarios, esto no significa que todos los constituyentes minoritarios del aceite formen parte de la fracción insaponificable; por ejemplo, los monoglicéridos se encuentran en una proporción inferior al 1% y, sin embargo, pertenecen a la fracción saponificable, que es la mayoritaria. Por tanto, no se debe confundir la clasificación hecha en base a la saponificación, con la realizada en base a la cantidad de los compuestos presentes en el aceite, que los clasifica en componentes mayoritarios y minoritarios.

La fracción saponificable está constituida principalmente por triglicéridos, ácidos grasos libres y ceras. Los ácidos grasos deben sus propiedades físico-químicas al número de átomos de carbono (que oscila entre 16 y 20) y de dobles enlaces que presenten. La configuración geométrica *cis* es la que aparece de forma natural en los aceites, aunque la *trans* puede aparecer ocasionalmente, como resultado de ciertas manipulaciones (León-Camacho et al., 2013). La presencia de ácidos grasos insaturados

incide sobre el punto de fusión y la facilidad para enranciarse, siendo los poliinsaturados más susceptibles de sufrir procesos de enranciamiento (oxidación) y de alterarse que los saturados. Los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son oleico (que está entre un 56% y un 83%), mirístico, palmítico, palmitoleico, margárico, margaroleico, esteárico, linoleico, linolénico, araquídico, eicosenoico, behénico, y lignocérico (Beltrán et al., 2004; León-Camacho et al., 2013). Las grasas son, generalmente, glicéridos, es decir, compuestos producidos por la esterificación de la glicerina con ácidos grasos. Constituyen la parte más importante de la fracción, ya que son las que le confieren las características físicas. Según el número de grupos alcohol que se esterifiquen con los ácidos grasos, dará lugar a triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos. Los monoglicéridos y diglicéridos se encuentran entre un 1% y un 2,8%, siendo mucho menor los monoglicéridos. Estos suelen producirse por biosíntesis incompletas o reacciones hidrolíticas de los triglicéridos (León-Camacho et al., 2013).

En la fracción insaponificable, así llamada porque no reacciona con sosa o potasa para dar jabones, se engloban hidrocarburos, vitaminas liposubles (A, D, E y K), los carotenos y otros pigmentos vegetales, los esteroides (colesterol, y fitosterol, principalmente) y alcoholes alifáticos y triterpénicos (León-Camacho et al., 2013). Además de ellos existen otros componentes menores como compuestos volátiles, otros pigmentos, etc.

1.1.2. Compuestos fluorescentes y luminiscentes presentes en el aceite de oliva virgen

Como se ha descrito anteriormente, el aceite está formado por una gran variedad de compuestos, algunos de los cuales poseen propiedades luminiscentes y fluorescentes. Los principales compuestos fluorescentes presentes en los aceites de oliva virgen son tocoferoles, pigmentos (clorofilas, carotenos y feofitinas), fenoles y vitamina E (Kyriakidis y Skarkalis, 2000). Por otro lado, la alteración de los aceites por vía oxidativa da lugar a otra serie de compuestos, no inicialmente presentes en cantidades significativas en los aceites vírgenes, que presentan también este tipo de propiedades, tal es el caso de dienos y trienos conjugados, y derivados de oxidación de fenoles y vitamina E (Kyriakidis y Skarkalis, 2000). Algunos de estos compuestos pueden afectar tanto al color como al sabor del aceite y a sus propiedades beneficiosas para la salud, aportando tanto atributos positivos como negativos (Angerosa et al.,

2004; Procida et al., 2015). La técnica espectrofluorimétrica permite estudiar dichos compuestos que emiten a diferentes longitudes de onda. La mayor parte de estas moléculas presentan grupos funcionales con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ (como serían los fenoles), o estructuras con dobles enlaces conjugados (como los dienos y trienos presentes en el aceite) (Skoog et al., 2001).

1.2. Oxidación y vida útil del aceite de oliva “Shelf-life”

El principal motivo que provoca la alteración de los alimentos grasos es la rancidez, que se origina debido a procesos oxidativos como son la termo-oxidación, foto-oxidación o auto-oxidación, siendo este último proceso el de mayor impacto en el deterioro de estos alimentos. La oxidación lipídica es uno de los problemas que más afecta a la calidad del aceite, la sufren tanto sus componentes químicos mayoritarios como minoritarios, y da lugar a modificaciones de sus propiedades sensoriales y nutricionales.

A diferencia de la lipólisis que comienza en el fruto, la oxidación tiene lugar principalmente durante la extracción y el almacenamiento del aceite. Por tanto, la composición final del aceite de oliva virgen es debida a varios factores: estado del fruto, variedad de aceituna, clima, edad del olivo, tipo de extracción y condiciones de almacenamiento, especialmente temperatura, luz y presencia de metales. El aceite de oliva se considera que es resistente a la oxidación debido a su bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados y a que tiene componentes menores con propiedades antioxidantes (Morales y Przybylski, 2013) pero puede sufrir este tipo de deterioro oxidativo.

Los lípidos al oxidarse generan ácidos grasos libres, e hidroperóxidos que son susceptibles de seguir oxidándose, dando lugar a aldehídos, cetonas, ácidos, y alcoholes, de entre ellos, la generación de aldehídos es el factor que más afecta a la calidad sensorial.

El proceso de auto-oxidación se origina a través de una serie de reacciones en cadena, que tienen lugar a través de radicales libres, dando lugar a una variada gama de nuevos compuestos que se diferencian tanto en sus pesos moleculares como en sus polaridades (Figura 2) (Morales y Przybylski, 2013). EL principal sustrato de la oxidación

son los ácidos grasos insaturados y el oxígeno. El mecanismo consta de cuatro fases: iniciación, propagación, ramificación y terminación. Existen muchos sistemas catalíticos que estimulan la oxidación de los lípidos; estos son luz, temperatura, enzimas, metales, metaloproteínas, pigmentos y microorganismos.

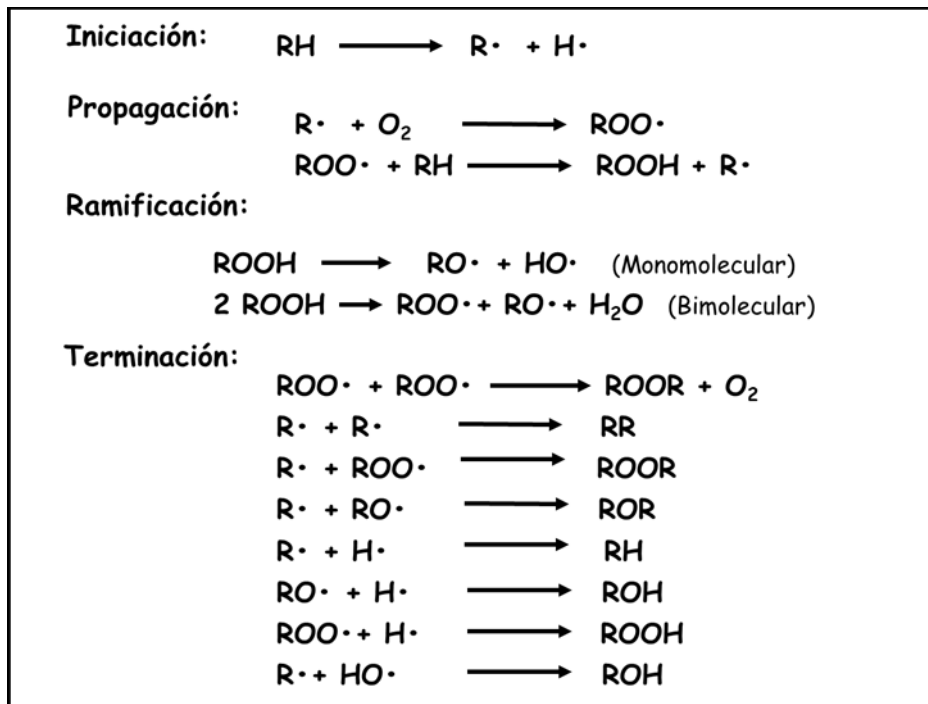


Figura 2. Mecanismo de oxidación de las grasas donde se muestran las cuatro fases que lo integran.

En la etapa de iniciación, los radicales se forman directamente a partir de los componentes lipídicos. Los iniciadores que están involucrados en esta etapa son la temperatura, la luz y otros radicales o metales. En esta fase se produce la abstracción de un hidrógeno $H\cdot$ de un grupo metileno adyacente al doble enlace de una molécula insaturada RH , por exposición a energía luminosa, calorífica o catálisis metálica. Es la reacción menos conocida de todo el proceso.

En la etapa de propagación el radical formado $R\cdot$ reacciona con el oxígeno atmosférico para formar un radical peroxilo $ROO\cdot$ y posteriormente se produce la reacción de éstos con nuevas moléculas insaturadas para originar hidroperóxidos $ROOH$ y nuevos radicales libres $R\cdot$ que repiten la secuencia de reacciones con otra molécula insaturada. Los radicales alílicos se forman en un orden de magnitud más

lentamente que los bialílicos por la mayor estabilización por resonancia de estos últimos. La reacción limitante de esta fase depende de la fuerza del enlace C-H, siendo más lábil en la posición alílica.

Simultáneamente se produce la ramificación, que consiste en la descomposición de hidroperóxidos y puede producirse de forma monomolecular o bimolecular, incrementando la concentración de radicales libres. La descomposición bimolecular es más probable pues requiere menor energía de activación. Esto causa que el proceso de oxidación llegue a ser autoinducido, y que tenga lugar autocatálisis. La susceptibilidad de los ácidos grasos insaturados a la oxidación depende de su facilidad en donar un átomo de hidrógeno. Los hidroperóxidos formados no son estables y se descomponen para producir un conjunto de productos no volátiles y volátiles. Entre estos productos están también radicales, que pueden estimular el proceso de oxidación. Está demostrado que los productos volátiles y no volátiles formados son inestables y pueden ser oxidados y/o descomponerse para producir un amplio grupo de nuevos productos.

La terminación es la eliminación de radicales del sistema (peroxilo, alcoxilo, acilo, hidroxilo e hidrógeno) para formar compuestos estables. La interacción de dos radicales peroxilo es la más importante de las reacciones de terminación porque predomina a presiones parciales de oxígeno normales. Durante esta etapa de finalización, los radicales reaccionan entre si y forman productos no radicales. Cualquier reacción que evite la propagación de la peroxidación o elimine los radicales libres del sistema juega un papel clave en el mecanismo de terminación. Antioxidantes de rotura de cadena como los compuestos fenólicos, tocoferoles, galato de propilo, etc. reaccionan con los radicales lipídicos para formar radicales no reactivos que detienen la cadena de propagación.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos minoritarios también pueden sufrir procesos oxidativos que originan compuestos no inicialmente presentes en los aceites. Entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos que se encuentran en el aceite procedentes del mesocarpo del fruto, la cantidad de estos compuestos en el aceite depende del cultivo y de la madurez de la aceituna, así como de las técnicas empleadas para la producción y extracción del aceite. Los compuestos fenólicos son

compuestos hidrofílicos, que se agrupan a su vez en alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides y lignanos. Para que tengan un mayor poder antioxidante, se considera que debe tener grupos hidroxilos, y un grupo carbonilo, formando éster, lactona, chalcona, flavanona o flavona aromático (Dziedzic y Hudson, 1984). Los tocoferoles son los antioxidantes lipofílicos, se considera que forman el mayor grupo de antioxidantes naturales presente en todos los aceites. En el caso del aceite de oliva se considera de menor importancia el poder antioxidante de los tocoferoles, frente al de los fenoles (Velasco y Dobarganes, 2002). El poder antioxidante de estos depende fundamentalmente de su concentración, siendo la óptima entre 400 y 600 ppm, y de la presencia de compuestos sinérgicos. El tocoferol con mayor actividad es el isómero alfa. Los factores externos (temperatura, refinación, almacenamiento) hacen disminuir el contenido de los tocoferoles, así como el grado de madurez tiene un gran impacto en el contenido, siendo la aceituna verde la más rica en estos compuestos.

La clorofila presente en el aceite proviene del fruto, que durante el procesado transforma estos compuestos en derivados más estables, como la feofitina y las pirofeofitinas. Esta derivación lleva cambios estructurales, que se reflejan con un cambio en el color del aceite, pasando de verde brillante a amarillo. El contenido en clorofilas en el fruto, disminuye a medida que éste madura. Las clorofilas y feofitinas, tienen un efecto pro-oxidante en presencia de luz, pero en condiciones de almacenamiento en ausencia de luz pueden actuar con antioxidantes, ya que en vez de facilitar la activación del oxígeno, actúan como donador de hidrógenos (Endo et al., 1984; Bradley y Min, 1992; Gutiérrez-Rosales et al., 1992).

Los carotenoides protegen al aceite de la foto-oxidación debido al sistema de dobles enlaces conjugados que presenta, siendo el β -caroteno el segundo con mayor número de dobles enlaces conjugados y por tanto el segundo en mayor poder antioxidante. Sin embargo, este efecto protector no es observado durante el almacenamiento en ausencia de luz. Los carotenoides tienen una menor estabilidad a la temperatura que las clorofilas (Morales y Przybylski, 2013).

El grado de oxidación se evalúa por diferentes métodos, el índice de peróxidos, absorbancia UV y el análisis sensorial, entre otros. Un aumento de los ácidos grasos libres en el índice de peróxidos indica que hay oxidación, ya sea por el almacenamiento

o procesamiento del aceite (Garrido-Delgado et al., 2015). Pero los defectos sensoriales se perciben antes de que los cambios se observen en los parámetros de calidad (Raffo et al., 2015).

Como se ha indicado, los procesos de oxidación son, en el caso de grasas y aceites, la principal causa de deterioro de su calidad. Desde el punto de vista industrial se hace, por tanto, necesario proteger el aceite de posibles procesos oxidativos que modifiquen su composición y produzcan efectos perjudiciales, como la aparición de características organolépticas indeseables, la reducción drástica de las notas sensoriales agradables de aroma y sabor o la reducción del contenido de ácidos grasos insaturados y de compuestos antioxidantes de origen natural, que afectan tanto a la vida útil (shelf life) del aceite como a sus propiedades sensoriales y saludables.

Es por este motivo por lo que es interesante conocer cómo afecta la oxidación a los compuestos fluorescentes del aceite de oliva virgen. La generación o degradación de compuestos fluorescentes por la oxidación del aceite de oliva es de interés para la industria ya que el uso de una técnica robusta, cómoda y rápida permitiría saber cuál es la calidad del aceite en ese momento e incluso predecir su vida útil.

1.3. Aceite de oliva virgen aderezado

Los aceites de oliva virgen aderezados son aquellos que son elaborados con plantas aromáticas/medicinales para darle mayor valor nutricional y/o cambiar sus atributos sensoriales y/o aumentar su tiempo de vida útil (Issaoui et al., 2011). Se ha demostrado que la adición de este tipo de plantas al aceite retrasa el proceso de oxidación y modifica su composición por migración de compuestos desde las plantas al aceite (Alcalá, 2016).

Las plantas aromáticas se usan como fuente de antioxidantes naturales porque tienen compuestos antimicrobianos y antioxidantes. Por este motivo se suelen adicionar al aceite para prolongar su vida útil, ya que evitan o retrasan la oxidación y los atributos sensoriales desagradables, y es por esto que son más apreciados por los consumidores (Baiano et al., 2009). Aunque la concentración de plantas añadidas debe ser baja o moderada, ya que se debe evitar la sobre-aromatización, para que el cliente no lo rechace (Nenadis et al., 2010; Sousa et al., 2015).

1.4. Espectrofluorimetría

La puesta a punto de procedimientos que permitan evaluar el estado de oxidación del aceite de forma rápida, económica y siguiendo los principios de la química verde son una demanda por parte de la Industria del sector, que tiene que garantizar la estabilidad, seguridad y calidad del aceite de oliva virgen, pero que en ocasiones ve que el nivel de calidad inicialmente obtenido puede verse drásticamente alterado si las condiciones de almacenamiento posterior no son las adecuadas.

Se denomina química verde al uso de técnicas y metodologías químicas que reduzcan o eliminen el uso o generación de compuestos que son dañinos para el hombre o el medio ambiente. El objetivo principal, por tanto, es el de reducir los riesgos que están asociados con productos o procesos que son indispensables en el mundo, manteniendo el nivel de vida y el científico. Dentro de los métodos analíticos, la química verde se centra en diseñar métodos que reduzcan o eliminen las sustancias peligrosas usadas o generadas (Keith et al., 2007). La técnica espectrofluorimétrica cumple estos requisitos ya que permite trabajar con cantidades reducidas de muestra, evitar el uso de disolventes y obtener información completa de la muestra en un solo análisis, además de ser rápida y de bajo coste.

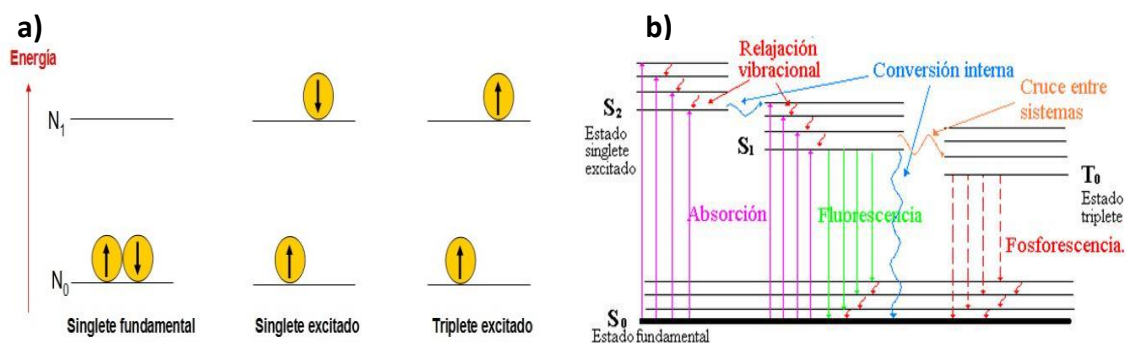


Figura 3. a) Configuración electrónica de una molécula en estado singlete fundamental, excitado y triplete excitado. b) Proceso de excitación y relajación de una molécula.

La fluorescencia es un proceso que consiste en la absorción de un fotón, con el consiguiente aumento de energía de un electrón de la molécula, este electrón excitado puede encontrarse en estado singlete o triplete excitado, según sea su spin. Los electrones, como se muestra en la Figura 3a se encuentran en un estado singlete fundamental, es decir, los dos electrones están en el orbital de mínima energía posible con los espines opuestos (Principio de exclusión de Pauli). El estado singlete excitado,

es donde los electrones conservan sus spines pero uno se encuentra en niveles de energía superiores (sin contar los estados vibracionales). Y también, se puede encontrar en estado triplete excitado, donde los electrones no tienen el mismo spin y están en estados excitados (Skoog et al., 2001).

La relajación de la molécula excitada puede producirse por diferentes procesos mecánicos. Ya sean con emisión de un fotón de radiación o no. Cuando hay emisión de radiación se pueden observar dos procesos, la fluorescencia y la fosforescencia. La fluorescencia es la emisión de un fotón de radiación de un estado singulete excitado al estado singulete fundamental. La fosforescencia implica, que el singulete excitado pasa, por conversión interna, a triplete excitado, y de ahí se relaja al estado fundamental, como se muestra en la Figura 3b. La mayor diferencia de energía entre los estados excitados y relajados, es en la absorción, luego vendría la fluorescencia, y por último la fosforescencia. En comparación, la fluorescencia siempre tiene una emisión en una longitud de onda menor (más energética), que se suele producir a temperatura ambiente, mientras que en la fosforescencia se da a baja temperatura. Pero la diferencia principal entre ambos procesos es la velocidad a la que ocurre, ya que la fluorescencia puede llegar a ser 10^4 segundos más rápida, es por eso que la fosforescencia se puede observar aun cuando ha cesado la radiación excitante. El electrón se relajará siguiendo el proceso que minimiza el tiempo de vida del estado excitado (Skoog et al., 2001).

1.4.1. Variables que afectan al proceso

Una de las variables a considerar, son los factores estructurales, dentro de los cuales destacan los sustituyentes de la molécula y su rigidez. Los sustituyentes afectan en cuanto a la deslocalización de los electrones, como son los grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{F}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NHCH}_3$ y $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, entre otros. Estos grupos suelen mejorar la señal de fluorescencia ya que aumenta la probabilidad de que el electrón pase de un estado relajado a un estado excitado. Por otro lado, grupos atradores de electrones como son $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NO}_2$, y $-\text{COOH}$, disminuyen esta posibilidad al alejar los diferentes estados energéticos. La rigidez molecular favorece el proceso de fluorescencia porque disminuyen tanto las transiciones sin emisión de radiación, como las conversiones internas.

Otro aspecto a tener en cuenta es la polaridad del disolvente, ya que si contiene átomos pesados disminuye la fluorescencia, así como también lo hace la presencia de oxígeno disuelto. Los cambios de pH también influyen ya que pueden favorecer los cambios de π a π^* (disminuir la distancia entre orbitales fundamentales y excitados), estos cambios de orbitales se pueden producir debido a los sustituyentes ácidos o básicos (Nahata, 2011). También según el pH, la molécula se encontrará en su forma ionizada o no ionizada y esto puede hacer que varíe tanto la intensidad, como la longitud de onda de emisión (Skoog et al., 2001).

La última variable a tener en cuenta, es la concentración del analito, ya que es, a través de la intensidad de la señal, con la que se puede determinar su concentración, y por tanto realizar análisis cuantitativos (Nahata, 2011). El analito absorbe los fotones con los cuales pasa a estado excitado, al relajarse emite otro fotón con una longitud de onda mayor. La intensidad de esta señal es la que se usa para medir la concentración del analito, aplicando la siguiente fórmula:

$$F = K'(P_0 - P)$$

Donde F es la potencia de la emisión, K' es una constante que depende de la eficacia cuántica del proceso, P₀ es la potencia de la luz que incide en la muestra, y P la potencia de la luz que sale, al atravesar la longitud del medio (Skoog et al., 2001).

Para relacionar esta fórmula con la concentración, se aplica la ley de Lambert-Beer, que relaciona la disminución de la intensidad de la señal con la concentración del analito (c) y la longitud del trayecto (b).

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc} \rightarrow A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \epsilon bc$$

A es la absorbancia, P₀ y P es la energía del haz cuando ha cruzado la celda con el blanco y con el analito, respectivamente, y ϵ es la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes.

Al sustituir la primera ecuación en la segunda, es cuando se consigue relacionar la intensidad con la concentración, dando lugar a una tercera fórmula:

$$F = K'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc})$$

Los espectros de fluorescencia se obtienen con equipos como el que se muestra en la Figura 4, compuesto por una fuente de luz, que emita en la región del espectro que se vaya a medir. Para asegurar que a la muestra le llega un haz de luz monocromática, dispone de un monocromador. El haz de luz incide en la muestra, que absorbe los fotones excitándose y la remite en todos los sentidos a una mayor longitud de onda. Esta energía emitida, vuelve a pasar por un monocromador. Se mide la luminiscencia producida, pero en un ángulo diferente al eje donde se encuentra la fuente, generalmente 90° (Rubinson y Rubinson, 2000). Por tanto, los espectrofluorímetros, pueden realizar espectros de emisión, en los cuales se excita a una longitud onda, y se hace un espectro de todas las longitudes de ondas emitidas. O también, un espectro de excitación, donde a la muestra llegan todas las longitudes de onda, y se selecciona una de emisión (Skoog et al., 2001).

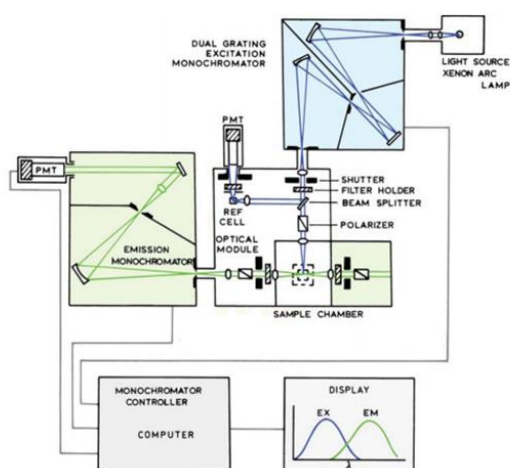


Figura 4. Componentes de un equipo de espectrofluorimetría.

La principal ventaja de las técnicas de fluorescencia es la sensibilidad, es decir, la capacidad de detectar bajas concentraciones de analito fluorescente. Además, la mayoría de los espectrofluorímetros permiten realizar tanto espectros de emisión, como de excitación lo que ayuda a caracterizar los analitos utilizando ambos tipos de espectros. También destaca la sencillez de la técnica, ya que puede no requerir apenas manipulación de la muestra (Lakowicz, 1999). Por tanto, es una técnica muy usada en química verde ya que usa poca cantidad de muestra y de disolvente, evitando así los riesgos asociados a estos y la generación de residuos tóxicos y peligrosos para el medio ambiente.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es desarrollar un método espectrofluorimétrico que permita establecer el estado de oxidación de los aceites de oliva vírgenes, basándose en sus espectros de emisión luminiscente y, posteriormente, predecir el tiempo de vida útil de los aceites.

Este objetivo principal tiene una serie de objetivos parciales que consisten en:

- Realizar un estudio de la vida útil del aceite de oliva virgen extra mediante el análisis espectrofluorimétrico de muestras almacenadas durante un periodo de tiempo en las condiciones habituales de un comercio.
- Evaluar las modificaciones sufridas en los espectros debidas a los procesos oxidativos que se hayan producido durante el tiempo de almacenamiento, y relacionar estas modificaciones con los cambios químicos producidos en sus componentes mayoritarios y minoritarios.
- Estudiar el efecto que ejercen distintas especies vegetales como el romero y la albahaca en el aceite de oliva virgen extra, y evaluar su capacidad para alargar la vida útil del aceite.

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestras

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado se ha usado una muestra comercial de Aceite de Oliva Virgen Extra, de la variedad Manzanilla, que pertenece a la campaña 14/15.

Se tomaron alícuotas de 100 mL, que se depositaron en recipientes de vidrio (Figura 5). En el caso de las muestras de aceite aderezado, se prepararon en los mismos recipiente con una cantidad de material vegetal (romero o albahaca) del 5 % p/p. La albaca (*Ocimum basilicum*, L.) y el romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) previamente se secaron en estufa a 60 °C durante 10 horas.

Se preparó un recipiente para cada mes dentro de las 3 series de muestras, con el fin de que no fuera necesario abrir el envase hasta el momento del análisis. A todos los recipientes se les dejó el mismo espacio de cabeza para que las muestras estuvieran en contacto con el mismo volumen de aire. Además, los recipientes se situaron en la misma estantería, a temperatura ambiente y con periodos de luz/oscuridad naturales, para asegurar que estuviesen en las mismas condiciones durante el estudio de los nueve meses (de enero a septiembre). Una vez al mes se retiró uno de los recipientes de cada tipo para llevar a cabo el análisis. En la Tabla 1 se describen las muestras analizadas.



Figura 5. Muestras de aceite de oliva virgen dispuestas para la retirada de una muestra para cada análisis.

Tabla 1. Muestras de aceite de oliva virgen extra y aderezadas utilizadas en el estudio.

CÓDIGO	TIEMPO (MES)	PLANTA	CÓDIGO	TIEMPO (MES)	PLANTA
AC 0	Control	No	RM 5	5	Romero
AC 1	1	No	RM 6	6	Romero
AC 2	2	No	RM 7	7	Romero
AC 3	3	No	RM 8	8	Romero
AC 4	4	No	RM 9	9	Romero
AC 5	5	No	AL 1	1	Albahaca
AC 6	6	No	AL 2	2	Albahaca
AC 7	7	No	AL 3	3	Albahaca
AC 8	8	No	AL 4	4	Albahaca
AC 9	9	No	AL 5	5	Albahaca
RM 1	1	Romero	AL 6	6	Albahaca
RM 2	2	Romero	AL 7	7	Albahaca
RM 3	3	Romero	AL 8	8	Albahaca
RM 4	4	Romero	AL 9	9	Albahaca

3.2. Materiales e instrumentos

Pipetas Pasteur de vidrio y plástico para la dispensación de las muestras.

Cubeta de 3 mL de vidrio óptico no fluorescente, tipo nº101-0S, de 10 mm de paso óptico (Special Optical glass, Hellma).

Espectrofluorímetro mod. RF-1501 Shimadzu Co® (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japón) (Figura 6). El espectrofluorímetro consta de una lámpara de Xenón de 150 W, monocromadores de excitación y emisión, y un detector. El equipo está conectado a un ordenador que controla el instrumento mediante el software PC-150x.



Figura 6. Espectrofluorímetro modelo RF-1501.

3.3. Procedimiento analítico

Para realizar el análisis, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se introducen 3 mL de muestra en el interior de la cubeta. Tras comprobar la inexistencia de burbujas en su interior, se introduce la cubeta en el compartimento del instrumento. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

Se utilizaron inicialmente tres longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) 330, 350 y 370 nm y se registró el espectro de emisión entre 220 a 900 nm. Todos los datos obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel. Antes de cada sesión de trabajo se realizó un blanco con agua ultrapura y se comprobó la relación señal/ruido y la intensidad de pico.

La limpieza de la cubeta se realizó con hexano en primer lugar, posteriormente con metanol, después con detergente de marca Extran (Merck, Darmstadt, Alemania) y agua destilada, y finalmente con acetona. Para el secado de la cubeta se le aplicó una corriente de aire.

3.4. Tratamiento de datos

Para el tratamiento de datos se utilizó el programa Excel como interfaz de la información proporcionada por el software del espectrofluorímetro y el programa estadístico Statistica versión 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK). En este trabajo se han aplicado procedimientos estadísticos univariantes y multivariantes.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos cuyo objetivo es realizar un primer análisis que facilita la interpretación de los datos y que permitan extraer la máxima información posible. Esta etapa implica algunos algoritmos estadísticos univariantes y el cálculo de diferentes parámetros para evaluar las características de las poblaciones de datos obtenidos. Este estudio, también conocido como pretratamiento de datos, es fundamental para no obtener conclusiones erróneas u obvias.

Se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) que es el análisis estadístico paramétrico de modelos lineales en los que intervienen la variable dependiente, la cual es cuantitativa, y las variables independientes o factores, que son cualitativas. Estos factores actúan como criterios de clasificación de los datos y los distintos valores que pueden tomar se denominan niveles. El propósito del ANOVA es encontrar diferencias significativas entre las medias comparando las varianzas de los grupos formados. El test de Brown-Forsythe se utilizó con el ANOVA para determinar las longitudes de onda de emisión de los espectros obtenidos para un $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ que mejor se correlacionaba con el tiempo de almacenamiento.

Por último, se ha aplicado análisis discriminante que tiene como objetivo construir un modelo en el que las variables puedan predecir el grupo más adecuado en el que se debe incluir una muestra. El análisis discriminante es usado tanto para determinar las variables que discriminan entre dos o más grupos constituidos de forma natural, como para determinar las variables que contribuyen a la mejor predicción entre grupos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Clasificación de la muestra de aceite de oliva virgen

4.1.1 Parámetros físico-químicos

Con el fin de determinar la categoría exacta de la muestra de aceite de oliva virgen comercial se determinaron los parámetros de calidad físico-químicos que permiten establecer las categorías de los aceites de oliva según los métodos ISO (ISO 660, ISO 3960 e ISO 3656) incluidos en la norma del COI (COI, 2016). Se determinaron el índice de acidez, índice de peróxidos, los coeficientes de extinción a 232 nm y 270 nm y el ΔK (Tabla 2). La evaluación de los parámetros de calidad físico-químicos permitió establecer que el aceite se podía clasificar en la categoría virgen extra al principio del estudio.

Tabla 2. Parámetros de calidad físico-químicos de la muestra de aceite control.

Parámetros de calidad(*)	
Índice de acidez (0,8°)	0,5°
Índice de peróxidos (20 meq O ₂ /Kg)	8 meq O ₂ /Kg
K232 (2,5)	1,5
K270 (0,22)	0,19
$\Delta K (\leq 0,01)$	0,007

(*)Valores máximos para poder ser considerado aceite de la categoría virgen extra.

4.1.2. Análisis espectrofluorimétrico

Se registraron los espectros de emisión de la muestra de aceite a una $\lambda_{ex} = 330$, 350 y 370 nm para seleccionar las mejores condiciones de medida (Figura 7).

Se llevó a cabo un estudio de precisión considerando la precisión de los espectros, tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia, y se seleccionó 330 nm como λ_{ex} más adecuada para el estudio. Por otra parte, en el espectro de emisión a $\lambda_{ex} = 330$ nm no se produjo saturación de la señal en ninguna

zona del espectro, lo que permitirá evaluar todos los cambios producidos durante el estudio.

Por tanto, fue 330 nm la longitud de onda de excitación elegida para llevar a cabo el estudio del tiempo de vida útil del aceite oliva y aceite aderezado.

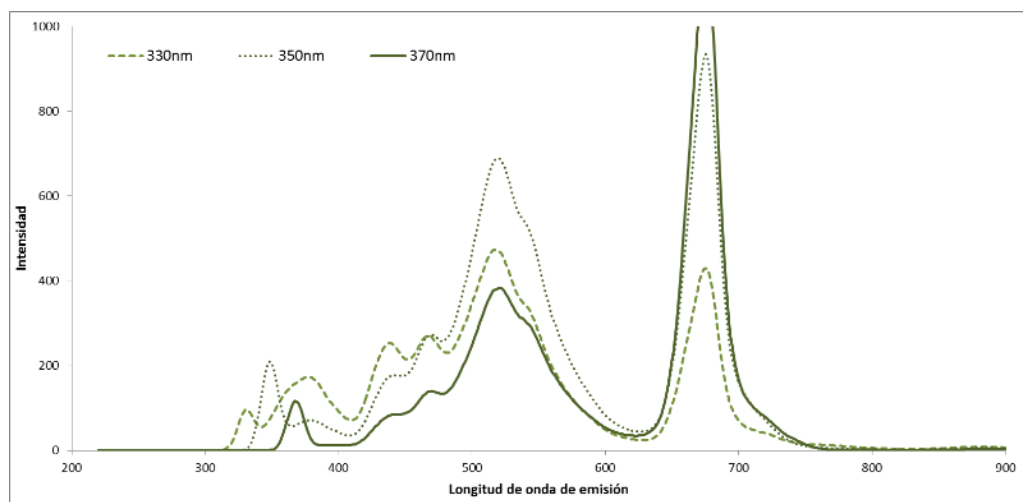


Figura 7. Espectros de emisión de la muestra de aceite control a las $\lambda_{ex} = 330, 350$ y 370 nm.

En el espectro de emisión del aceite de oliva virgen se pueden designar distintas zonas que han sido relacionadas con la concentración de diferentes compuestos fluoróforos presentes en la muestra (Sikorska et al., 2005). En la Figura 8, se representa el espectro de emisión a $\lambda_{ex} = 330$ nm del aceite de oliva virgen donde se han marcado tres zonas del espectro I, II y III que corresponden a los intervalos de 360 a 420 nm, 420 a 620 nm y 620 a 720 nm, respectivamente.

Se han descartado las zonas de longitudes de onda de emisión por debajo de la excitación y la zona del espectro muy alejada de la longitud de onda de excitación. Distintos autores (Galano et al., 2003; Guimet et al., 2004; Sikorska et al., 2005; Sayago et al., 2007) han relacionado en aceites de oliva vírgenes la zona I del espectro con la concentración de tocoferoles, tocotrienoles y compuestos fenólicos, la zona II con la formación de compuestos fluoróforos durante la oxidación del aceite y la presencia de dienos y trienos conjugados y la zona III con la concentración de pigmentos, principalmente clorofilas y feofitinas.

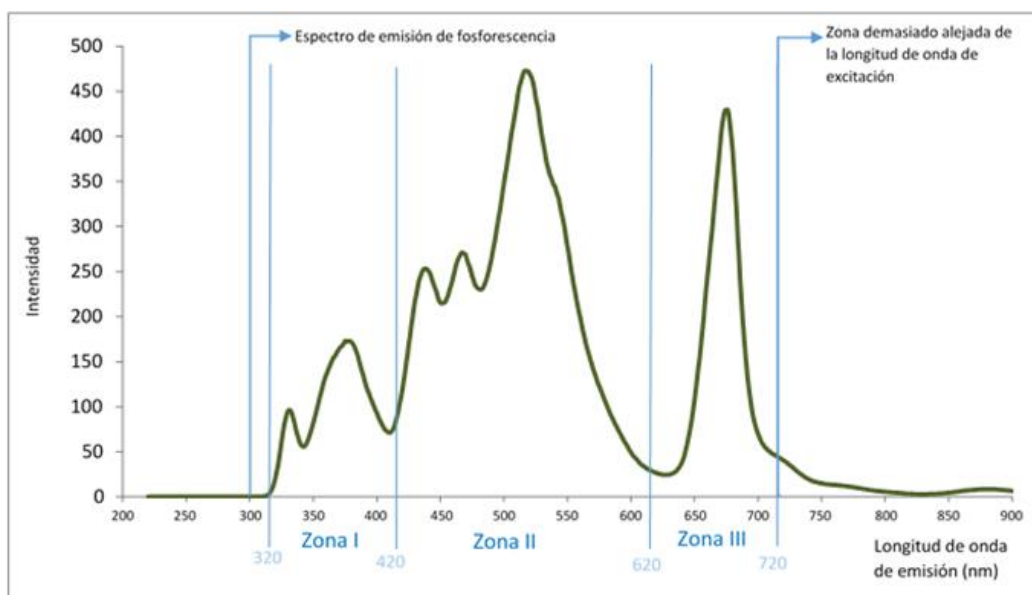


Figura 8. Espectro de emisión del aceite de oliva virgen control a 330 nm.

4.1.3. Precisión del método espectrofluorimétrico

Como se ha descrito anteriormente la adecuada precisión de los espectros de emisión obtenidos a esta $\lambda_{ex} = 330$ nm fue el principal motivo de la elección. Los valores de precisión obtenidos se muestran en la Tabla 3. Los parámetros estadísticos que se han usado para expresar tanto la repetibilidad como la precisión intermedia han sido la desviación estándar media (DSm) y el coeficiente de variación medio (CVm), admitiéndose como valores aceptables cuando el CVm se encuentra por debajo del 10%.

Para determinar la repetibilidad del método se analizó una única muestra de aceite de oliva virgen, realizándose seis replicados, con un único operador y durante una sesión de trabajo. Para la evaluación de la precisión intermedia se evaluó la misma muestra que en el ensayo de repetibilidad, siendo analizada por dos operadores distintos, en quintuplicado y durante cinco días diferentes. La Tabla 3 muestra los valores obtenidos para la desviación estándar media así como para los coeficientes de variación medios en ambos casos en cada una de tres las zonas señaladas en el espectro.

Tabla 3. Valores de desviación estándar media y coeficientes de variación medios en cada una de las zonas del espectro de emisión a $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$.

Zona del espectro	Zona I	Zona II	Zona III
λ_{em} (nm)	360 - 420	420 - 620	620 - 720
SDr media	17,71	25,41	1,64
CVr medio (%)	5,53	6,81	2,85
SDR media	34,11	34,75	5,45
CVR medio (%)	8,92	9,87	4,27

Como puede observarse los resultados indican que la repetibilidad es muy buena, con valores, para el coeficiente de variación medio, inferiores al 10% en todos los casos. Se producen aumentos y disminuciones en los valores obtenidos coincidiendo con la presencia de picos de emisión. En cuanto a la precisión intermedia, los valores del CVR medio (%) fueron superiores a los obtenidos en la evaluación de la repetibilidad debido a la mayor variación introducida, pero en todos los casos fueron también inferiores al 10%. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de este mismo tipo (Sayago et al., 2007).

4.2. Evolución del aceite durante el almacenamiento

Se registraron los espectros de fluorescencia del aceite durante los nueve meses de almacenamiento (Figura 9). Como puede observarse se produjeron variaciones de intensidad en las tres zonas del espectro, pero estas variaciones tuvieron correlación positiva con el tiempo en el caso de las zonas I y II, donde se produce un aumento en la intensidad de fluorescencia durante el almacenamiento, y una correlación negativa con el tiempo de almacenamiento en la zona III, donde se produjo una disminución en la intensidad de emisión de las bandas. Los cambios se produjeron de forma más drástica durante los primeros cinco meses de almacenamiento, produciéndose luego una modificación más lenta de la mayor parte del espectro. Estos cambios pueden estar originados por la formación de compuestos de oxidación y por una disminución de los pigmentos relacionados con la zona III del

espectro, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Guimet et al., 2004; Sikorska et al., 2005).

El análisis de la varianza (ANOVA), considerando la intensidad de fluorescencia de los aceites, mostró que el tiempo de almacenamiento tenía un efecto significativo ($p < 0,01$) en la variación del espectro de emisión. Considerando las zonas del espectro de emisión, el ANOVA mostró que el tiempo de almacenamiento afectaba de forma significativa a todas las longitudes de onda del espectro.

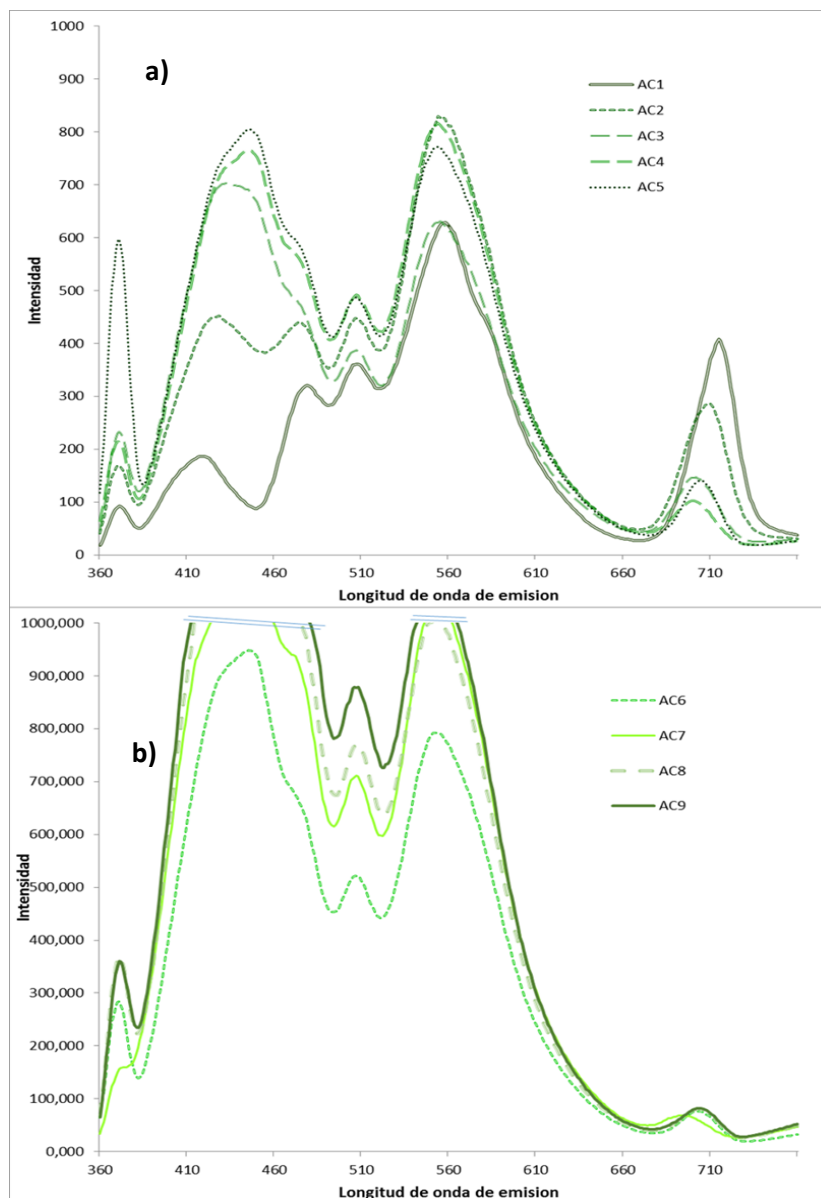


Figura 9. Espectros de emisión (del aceite durante el almacenamiento: a) de 0 a 5 meses b) de 6 a 9 meses.

Estos resultados muestran que el espectro de emisión del aceite de oliva virgen a una $\lambda_{ex} = 330$ nm contiene información relevante sobre su estado de oxidación y puede servir para evaluar la vida útil de los aceites.

4.3. Aceite de oliva aderezado (romero y albahaca)

Se han registrado los espectros de emisión de las muestras de aceite aderezado con romero y albahaca en las mismas condiciones que el aceite sin aderezar. En la Figura 10 se muestra el espectro de emisión de los aceites aderezados y sin aderezar después de un mes de almacenamiento. Se observa el mismo perfil, desde un punto de vista cualitativo, en aceite aderezado que sin aderezar y se observan las tres zonas características. Aunque el aceite sin aderezar alcanzó valores de intensidad más altos que los aderezados, la aplicación de un ANOVA a los datos de las muestras del primer mes no mostró diferencias significativas entre ellas, probablemente porque este primer mes de almacenamiento no es suficiente el tiempo de contacto para que se produzca efecto de la presencia de las plantas aromáticas sobre el aceite.

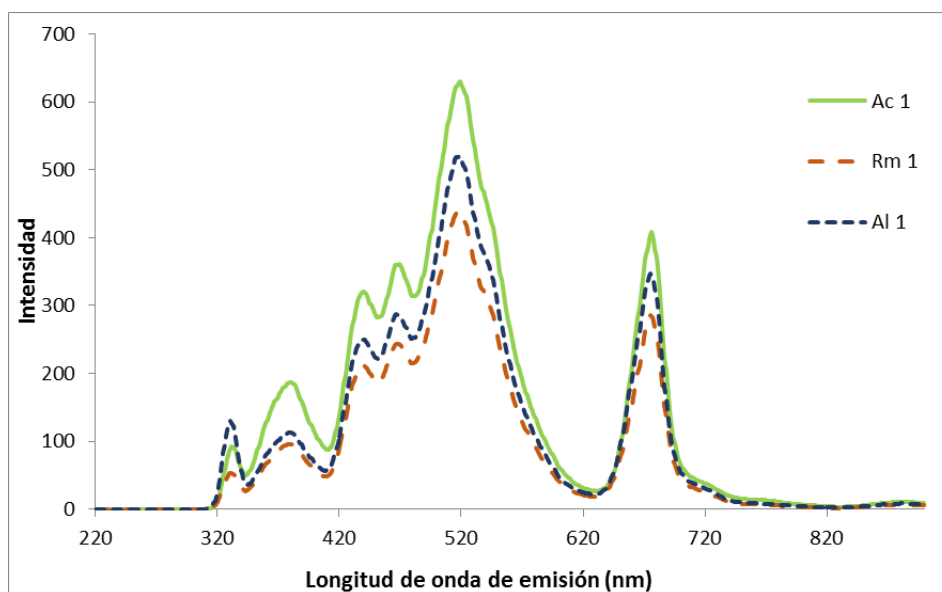


Figura 10. Espectro de emisión del aceite (Ac) y aceite aderezado con romero (Rm) y albahaca (Al) después de un mes de almacenamiento.

Como en el caso del aceite sin aderezar se ha estudiado la evolución de los aceites durante los nueve meses de almacenamiento. Como se observa en las Figuras 11 y 12, correspondientes a romero y albahaca, respectivamente, hay variaciones de intensidad en las zonas del espectro, y estas variaciones son en el mismo sentido que

el aceite sin aderezar, es decir, se produce un aumento en la intensidad de fluorescencia durante el almacenamiento en las zonas I y II y una disminución en la zona III, aunque la intensidad de las bandas es menor en ambos casos que en el caso del aceite sin aderezar, sobre todo durante los primeros meses de almacenamiento (Figuras 11a y 12a), lo que indicaría una evolución más lenta de la oxidación en el caso de la presencia de las plantas, debido a la migración de compuestos antioxidantes desde el material vegetal hacia el aceite, que retrasa la aparición de compuestos de oxidación, lo que ha sido descrito por otros autores que describen la migración de. Esto está de acuerdo con lo encontrado por otros autores que reportan que los compuestos antioxidantes de las plantas pueden mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales (Yong et al., 2016).

Los espectros correspondientes a los 6-9 meses de almacenamiento (Figuras 11b y 12b) alcanzan también valores altos de intensidad de fluorescencia en presencia de las plantas pero los valores alcanzados están por debajo de los del aceite sin aderezar en muchas zonas del espectro.

Del mismo modo que el aceite sin aderezar, se realizó un ANOVA, considerando la intensidad de fluorescencia de los aceites aderezados, y los resultados mostraron que el tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo ($p < 0,01$) en la variación del espectro de emisión. Considerando las zonas del espectro de emisión, el ANOVA mostró que el tiempo de almacenamiento afecta de forma significativa a todas las longitudes de onda del espectro, en el caso del aceite aderezado con romero, y en el aceite aderezado con albahaca hay también un efecto significativo en todas las longitudes de onda del espectro excepto en el intervalo de 643 a 648 nm, zona en la que no aparece ninguna banda de interés.

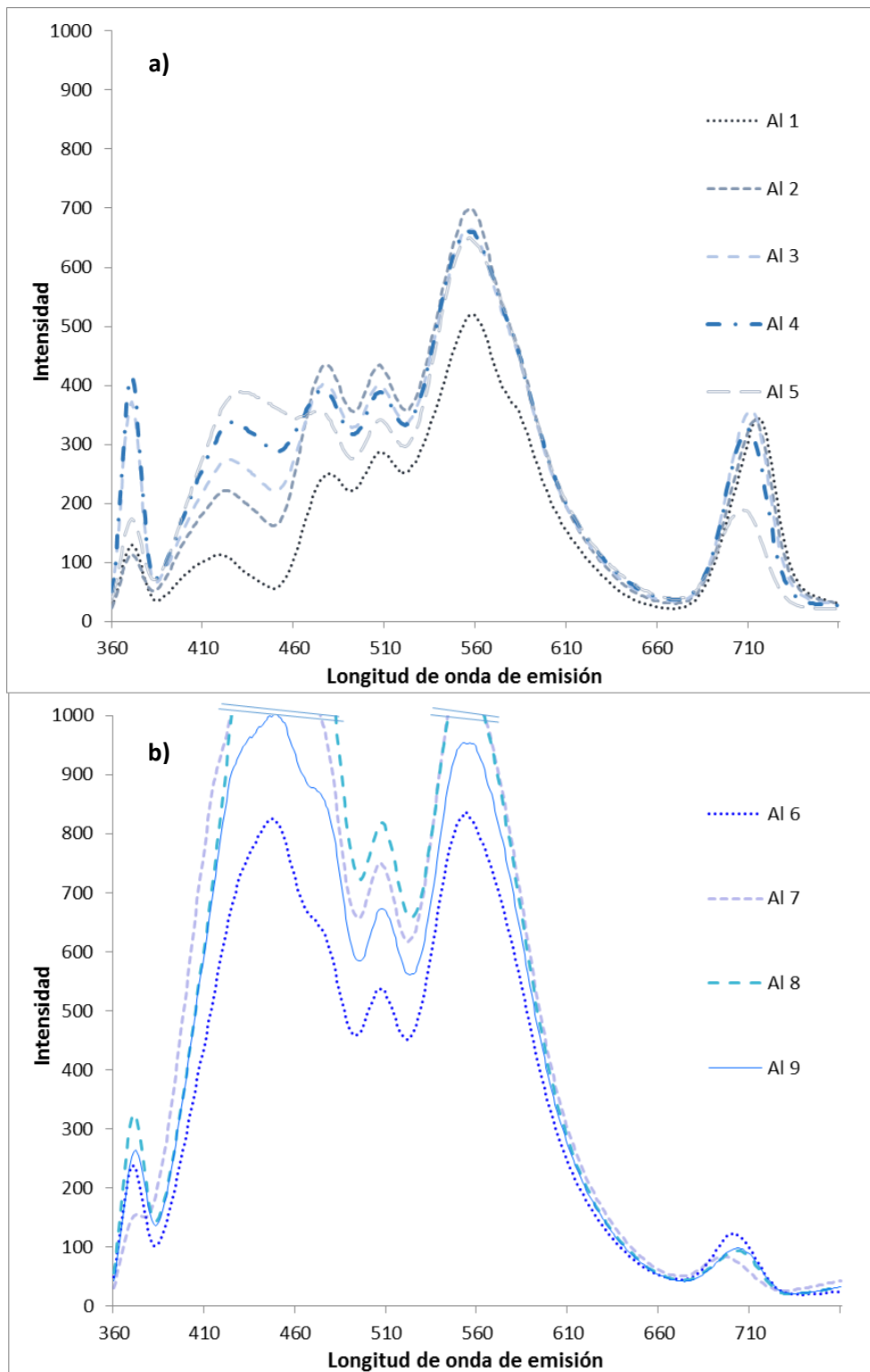


Figura 11. Espectros de emisión del aceite aderezado con albahaca durante el almacenamiento: a) de 0 a 5 meses b) de 6 a 9 meses.

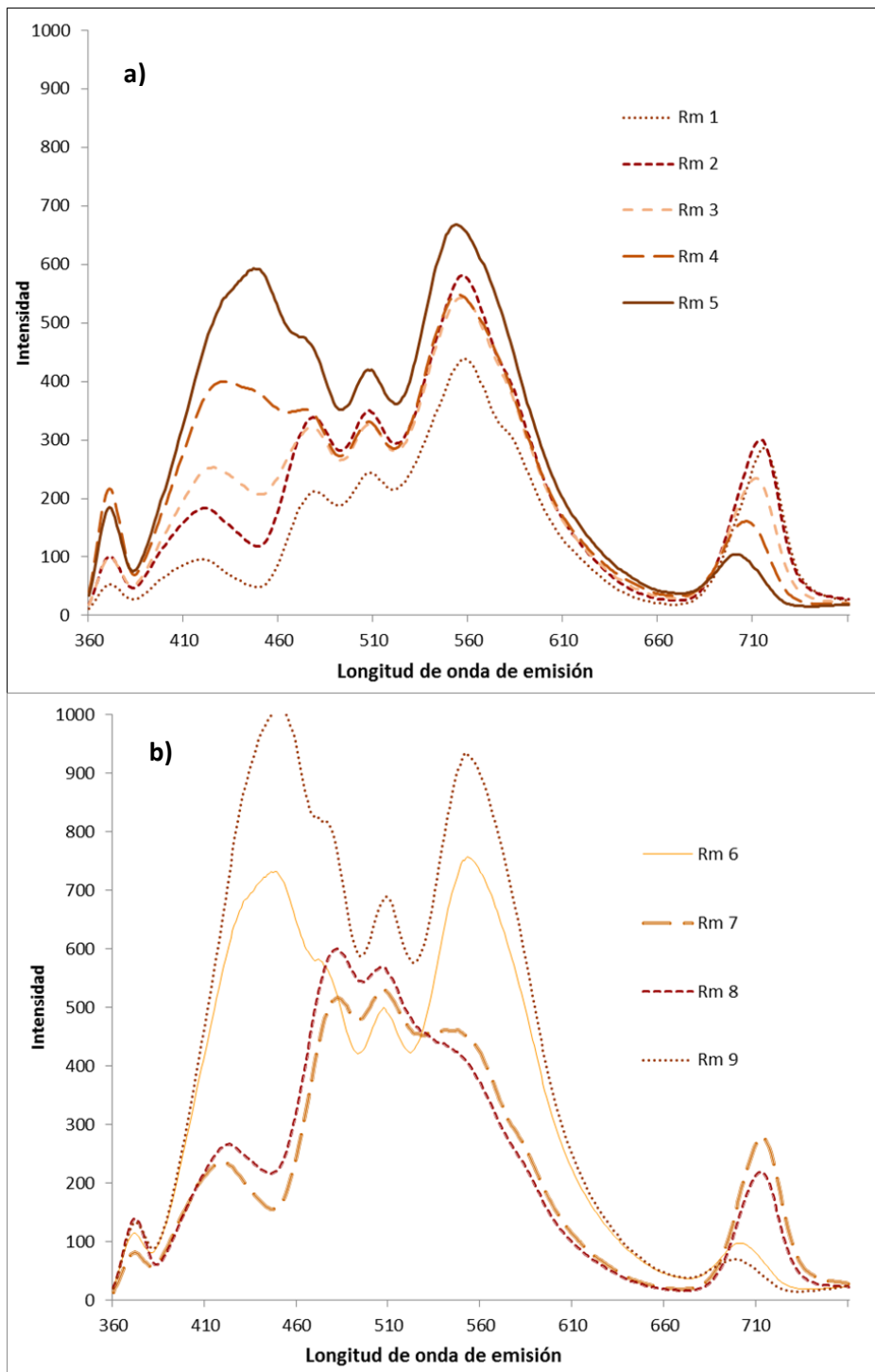


Figura 12. Espectros de emisión del aceite aderezado con romero durante el almacenamiento:
 a) de 0 a 5 meses b) de 6 a 9 meses.

En todos los espectros estudiados se observó una disminución de la banda de la zona III correspondiente a los pigmentos clorofílicos y derivados, que corresponde a la degradación que sufren los pigmentos durante el almacenamiento de los aceites, debido a la oxidación, la acción de la luz y la temperatura, que origina la degradación

de las clorofilas que pasan a feofitinas y posteriormente a compuestos no coloreados, como ha sido demostrado por otros autores (Caponio et al., 2005).

Al representar la intensidad de emisión del máximo de esta banda (677 nm) frente al tiempo, se observó una disminución de la intensidad de emisión en las tres matrices estudiadas, aunque la pendiente de esta disminución fue mayor para el aceite sin aderezar, se produce un mismo nivel de intensidad en los 3 casos a partir del sexto mes, lo que parece indicar que el efecto protector de la presencia de las plantas es mayor durante los primeros meses (Figura 13).

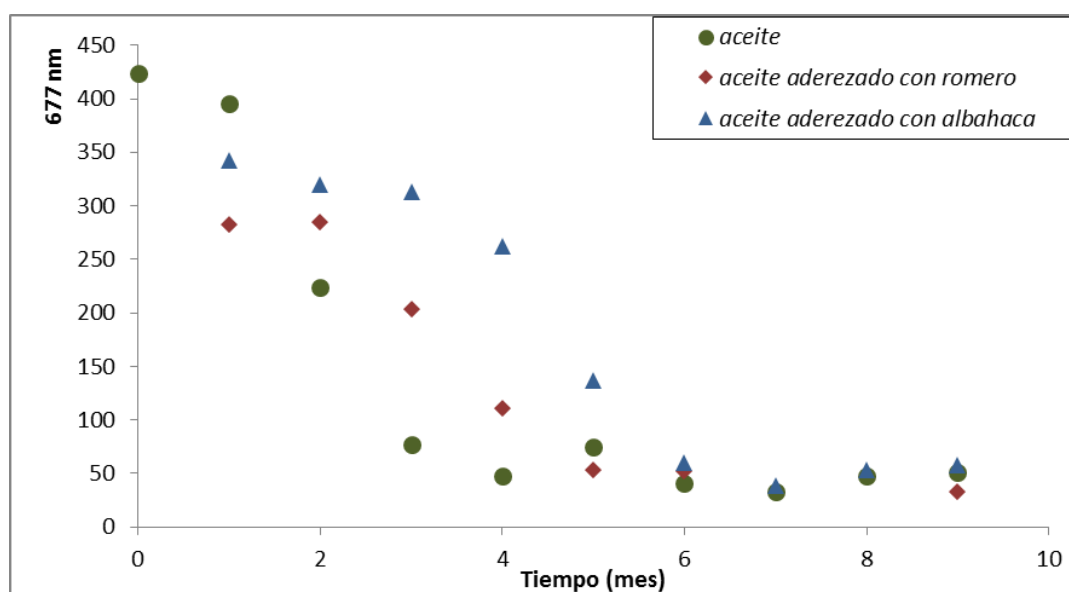


Figura 13. Representación de la intensidad del máximo de la banda de la zona III (677 nm) frente al tiempo en las muestras de aceite sin aderezar y aderezado con romero y albahaca.

4.4. Aceite de oliva vs aceite aderezado: aplicación de estadística multivariante

Con el fin de poner de manifiesto las posibles diferencias existentes entre las muestras almacenadas con y sin aderezo se aplicaron una serie de procedimientos estadísticos a los datos obtenidos.

En primer lugar tras el ANOVA realizado con todas las longitudes de onda de los espectros de emisión se realizó un test de Brown-Forsythe que seleccionó las longitudes de onda que presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras con y sin aderezo. Solo fueron seleccionadas longitudes de onda de la zona I,

correspondiente a la información aportada por tocoferoles y compuestos fenólicos (Tabla 4), compuestos antioxidantes de los aceites. Esto es probablemente debido a que es la zona del espectro que puede presentar más diferencias entre las 3 matrices ya que cuando se produce la oxidación los compuestos antioxidantes protegen de la alteración hasta que se degradan y en este caso, las muestras aderezadas deben tener un mayor contenido que las no aderezadas, lo que justifica la selección.

Tabla 4. Longitudes de onda de emisión que presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras aderezadas y no aderezadas según el test de Brown-Forsythe.

nm	F	p
361	4,703999	0,012655
362	4,573701	0,014166
363	4,469833	0,015505
364	4,295164	0,018057
365	4,127271	0,020921
366	4,055566	0,022284
367	3,992487	0,023559
368	3,840128	0,026957
369	3,681781	0,031030
370	3,356536	0,041515

Por último, se aplicó un análisis discriminante a los tres tipos de aceites en base a los valores de emisión en las longitudes de onda seleccionadas por el test de Brown-Forsythe. El Análisis Lineal Discriminante (LDA) es un método de clasificación en la estadística multivariante que tiene como objetivo determinar hasta qué punto es posible separar dos o más grupos de muestras previamente establecidos, y qué variables son las que mejor discriminan entre ellos. Se obtuvo un porcentaje correcto de clasificación de un 71 % de las muestras, lo que significa que ese porcentaje de las muestras se clasifican correctamente en su grupo en base a las funciones de clasificación obtenidas, siendo las longitudes de onda de emisión de 361, 365, 366, 368 y 369 nm las variables con mayor peso (Figura 14).

La Figura 14 muestra el resultado del análisis discriminante, se observa que hay una separación entre las muestras aderezadas y no aderezadas, que podría explicarse por el diferente contenido de antioxidantes presentes en las matrices, la clasificación no es total porque las muestras esta también afectadas por el tiempo de almacenamiento lo que dificulta su total separación y favorece que se produzca algún desplazamiento de las muestras, pero en definitiva se detecta la presencia de dos grupos, uno constituido por el aceite y otro por las muestras aderezadas, lo que indica que existe información en los espectros que permite detectar esa diferencia.

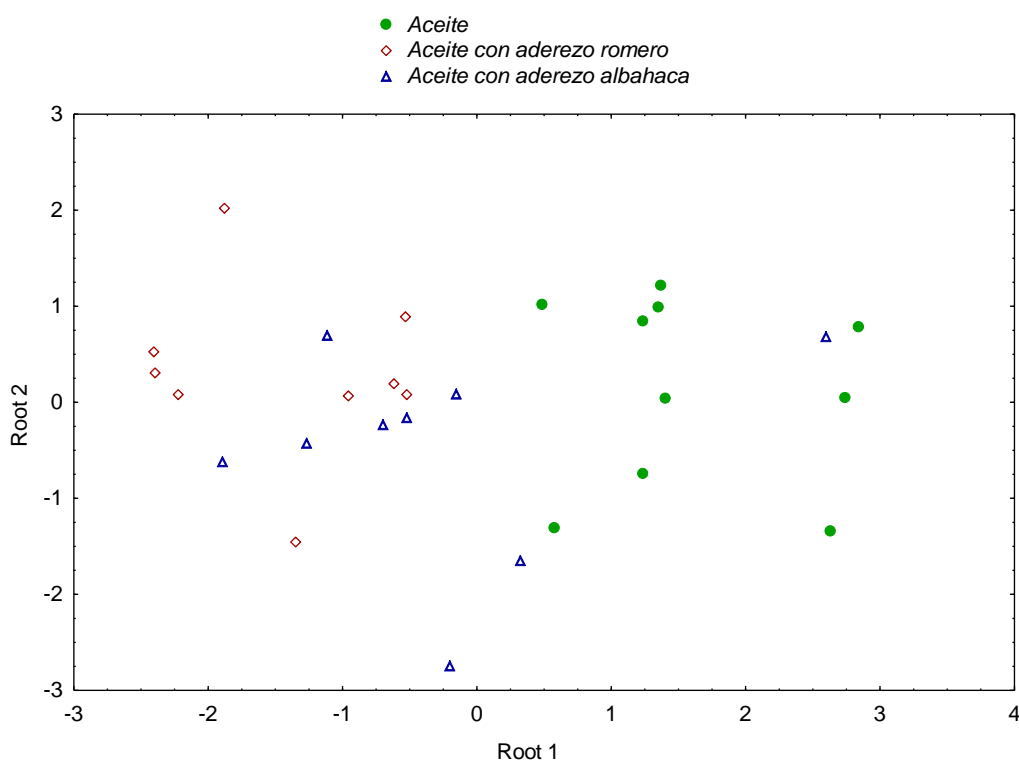


Figura 14. Separación de las muestras en base a los datos seleccionados por el test de Brown-Forsythe usando las funciones discriminantes calculadas.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que sería posible evaluar el estado de oxidación de un aceite en base a su espectro de emisión y diferenciarlo de muestras con diferente estado de oxidación, lo que profundizando más en este tipo de estudios podría dar lugar a una predicción del tiempo de vida útil de los aceites basándose en esta información.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha seleccionado, en base a la precisión, tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia, la λ_{ex} de 330 nm para obtener el espectro de emisión y llevar a cabo el estudio de vida útil del aceite de oliva virgen y del aceite aderezado.
2. En el espectro de emisión del aceite de oliva virgen se seleccionaron tres zonas que se corresponden con la concentración de compuestos fluoróforos, como tocoferoles, tocotrienoles, compuestos fenólicos, dienos y trienos conjugados, clorofilas y feofitinas.
3. Se producen variaciones significativas en la intensidad de emisión de las bandas durante los nueve meses de almacenamiento, debido posiblemente a la formación de compuestos de oxidación y la disminución en la concentración de pigmentos. Estas variaciones son más drásticas durante los primeros cinco meses de almacenamiento.
4. Los espectros de emisión de los aceites aderezados con romero y albahaca tienen el mismo perfil cualitativo. La variación en el espectro de emisión de los aceites aderezados durante el almacenamiento tiene una evolución más lenta, debido a la cesión de los compuestos antioxidantes de la planta.
5. Aplicando el test de Brown-Forsythe a los valores de intensidad de emisión se seleccionaron las longitudes de onda correspondientes a la primera zona del espectro (360-420 nm), relacionadas con la concentración de tocoferoles y compuestos fenólicos, como las más significativas para diferenciar los aceites con y sin aderezo. Por otra parte, el análisis discriminante permitió la clasificación parcial de los aceites.
6. Con la información del espectro de emisión es posible evaluar el estado de oxidación de un aceite, y profundizando más en este tipo de estudios, podría ser posible predecir el tiempo de vida útil.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá A. Evaluación del tiempo de vida útil del aceite de oliva virgen y aderezado con plantas aromáticas mediante marcadores volátiles. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Sevilla. 2016.
- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *J Chromatogr A*. 2004; 1054(1-2): 17–31.
- Baiano A, Terracone C, Gambacorta G, Notte E La. Changes in Quality Indices, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Flavored Olive Oils during Storage. *J Am Oil Chem Soc*. 2009; 86(11): 1083–92.
- Beltrán G, Del Río C, Sánchez S, Martínez L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from Picual. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 3434-40.
- Bradley DG, Min DB. Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992; 31: 211–36.
- Caponio F, Bilancia MT, Pasqualone A, Sikorska E, Gomes T. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *Eur Food Res Technol*. 2005; 221(1-2): 92-8.
- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernández-Gutiérrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J Sep Sci*. 2005; 28(9-10): 837–58.
- COI. Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T.20/NC nº 15/Rev. 8. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2015.
- COI. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº3/Rev. 11. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 2016.
- Dziedzic SZ, Hudson BJE. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem*. 1984; 14: 45–51.

- Endo Y, Usuki R, Keneda. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation. *J Am Oil Chem Soc.* 1984; 61: 781–84.
- Galano T, Duran I, Correa CA, Roldán B, Rodríguez MI. Simultaneous fluorometric determination of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oil by partial least squares calibration. *J Agri Food Chem.* 2003; 51: 6934-40.
- Garrido-Delgado R, Dobao-Prieto MDM, Arce L, Valcárcel M. Determination of volatile compounds by GC-IMS to assign the quality of virgin olive oil. *Food Chem.* 2015; 187: 572–9.
- Guimet F, Ferre J, Boqué R, Rius FX. Application of unfolded principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. *Anal Chem Acta.* 2004; 515: 75-85.
- Gutiérrez-Rosales F, Garrido-Fernández J, Gallardo-Guerrero L, Gandul-Rojas B, Mínguez-Mosquera MI. Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1992; 69: 866–71.
- International Organization of Standardization. Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and acidity. Geneva, Switzerland: ISO; 2009. Serie de Informes Técnicos: 660.
- International Organization of Standardization. Animal and vegetable fats and oils - Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction. Geneva, Switzerland: ISO; 2011. Serie de Informes Técnicos: 3656.
- International Organization of Standardization. Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination. Geneva, Switzerland: ISO; 2017. Serie de Informes Técnicos: 3960.
- Issaoui M, Flamini G, Hajaj ME, Cioni PL, Hammami M. Oxidative evolution of virgin and flavored olive oils under thermo-oxidation processes. *J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88(9): 1339–50.

- Keith LH, Gron LU, Young JL, Safety C, Way C, College H, et al. Green Analytical Methodologies. *Chem Rev.* 2007; 107: 2695-2708.
- Kyriakidis N, Skarkalis P. Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils. *AOAC Int.* 2000; 83: 1435-39.
- Lakowicz J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2^aed. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999.
- León-Camacho M, Morales MT, Aparicio R. Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Traceability Issues. En: Harwood JL, Aparicio R. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. 2^a ed. New York: Springer; 2013. p.163-217.
- Morales MT, Przybylski R. Olive oil oxidation. En: Harwood JL, Aparicio R, editores. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. Gaithersburg, MA (USA): Aspen Publishers; 2013. p.459–90.
- Nahata A. Spectrofluorimetry as an Analytical Tool. *Pharm Anal Acta.* 2011; 2(8): 8–10.
- Nenadis N, Moutafidou A, Gerasopoulos D, Tsimidou MZ. Quality characteristics of olive leaf-olive oil preparations. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010; 112(12): 1337–44.
- Procida G, Cichelli A, Lagazio C, Conte LS. Relationships between volatile compounds and sensory characteristics in virgin olive oil by analytical and chemometric approaches. *J Sci Food Agric.* 2015; 96(1): 311-18.
- Raffo A, Bucci R, D’Aloise A, Pastore G. Combined effects of reduced malaxation oxygen levels and storage time on extra-virgin olive oil volatiles investigated by a novel chemometric approach. *Food Chem.* 2015; 182: 257–67.
- Rubinson J, Rubinson K. Química analítica contemporánea. 1^aed. México: Pearson Education; 2000.
- Samaniego-Sánchez C, Oliveras-López MJ, Quesada-Granados JJ, Villalón-Mir M, Serrana HLG. Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012; 114(2): 194–204.

- Sayago A, García-González DL, Morales MT, Aparicio R. Detection of the presence of refined hazelnut oil in refined olive oil by fluorescence spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 2068-71.
- Sikorska E, Górecki T, Khmelinskii IV, Sokorski M, Koziol J. Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Food Chem.* 2005; 89: 2017-25.
- Skoog D, Holler F, Nieman T. *Principios de análisis instrumental.* 5ªed. Madrid: McGRAW-HILL; 2001.
- Sousa A, Casal S, Malheiro R, Lamas H, Bento A, Pereira JA. Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *Food Sci Technol.* 2015; 60(1): 22–8.
- Velasco J, Dobarganes C. Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2002; 104: 661–76.
- Yong Y, Xiaoxiao S, Xianon S, Baoukun Q, Zhongjian W, Yang L, et al. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Industrial Crops and Products.* 2016; 80: 141–47.