

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**ANÁLISIS QUÍMICO Y SENSORIAL DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA
MONOVARIETALES DEL TRUJAL ARTAJO (FONTELLAS, NAVARRA)**

presentado por

Andrea Urzaiz Huguet - (e)k

aurkeztua

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIAS
NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO NEKAZARITZA ETA ELIKADURA INDUSTRIAK**

Septiembre, 2010 / 2010, Iraila

- **Título del Trabajo Fin de Carrera:** Análisis químico y sensorial de aceites de oliva vírgenes extra monovarietales del Trujal Artajo (Fontellas).
- **Tutor:** Juan Ignacio Maté Caballero.
- **Departamento:** Tecnología de los alimentos.
- **Alumna:** Andrea Urzaiz Huguet.

El Trabajo Fin de Carrera presentado se basa en el análisis de aceites de oliva vírgenes extra para su caracterización según la variedad de aceituna de la que procedan y se ha llevado a cabo en la empresa Trujal Artajo S. L.

Juan Ignacio Maté Caballero, profesor de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos autoriza la presentación de este trabajo.

El tutor del Trabajo,

La alumna,

Juan Ignacio Maté Caballero

Andrea Urzaiz Huguet

Pamplona, Septiembre de 2010

AGRADECIMIENTOS:

Al profesor Juan Ignacio Maté Caballero por confiar en mí para entregar este trabajo.

A Iván, por guiarme en el laboratorio.

A mi familia e Imanol por apoyarme cuando lo necesitaba.

RESUMEN

“Análisis químico y sensorial de aceites de oliva vírgenes extra monovarietales del Trujal Artajo (Fontellas, Navarra)”

El aceite de oliva tiene una consolidada tradición en la Comunidad Foral de Navarra y en la actualidad se ha incrementado la producción notablemente. El trabajo se basa en la diferenciación, a distintos niveles, de los aceites vírgenes extra que oferta un trujal Navarro (Trujal Artajo) situado en La Ribera.

Se analizan, desde el punto de vista químico y desde el punto de vista organoléptico, las variedades Arbequina, Manzanilla cacereña, Koroneiki, Arróniz y Arbosana. El aceite de Arbequina se estudia en dos variantes, el aceite de oliva virgen extra convencional y el ecológico.

A partir de estos análisis se trata de caracterizar las variedades a partir de los parámetros que diferencian a cada una. Hay que tener en cuenta que los factores extrínsecos a la variedad son para todas muy parecidos debido a que están en una misma finca, sobre el mismo suelo, bajo el mismo clima y bajo los mismos tratamientos exceptuando el olivar ecológico. Esta última investigación sobre el aceite ecológico se realiza para observar la incidencia de los tratamientos en la misma variedad.

Los métodos de análisis químico se llevan a cabo en el laboratorio y los parámetros analizados son el grado de acidez, el índice de peróxidos, las K_{270} , K_{232} , ΔK , la humedad y materias volátiles, las impurezas insolubles en éter de petróleo, las ceras, el estigmastadieno, el monopalmitato de 2-glicerilo, la composición de los ácidos grasos, la diferencia entre el ECN42 real (HPLC) y ECN42 teórico y la composición de los esteroides. Se consideran todos estos parámetros porque son los que aparecen en el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis,

El análisis organoléptico se realiza en un panel de cata profesional en donde se valoran los seis aceites, primero para puntuarlos y clasificarlos según la ficha oficial y segundo para encontrar diferentes matices sensoriales.

Después de realizar todos los análisis pertinentes, se observó que las variedades de olivar utilizadas en la elaboración de los aceites influían de forma significativa en la composición en ácidos grasos y en la composición en esteroides de los aceites. Del resto de parámetros no se pueden sacar las mismas conclusiones ya que en ellos influye más el proceso de elaboración.

Índice

Índice

1. Antecedentes (p. 11)

1.1. El aceite de oliva (p.12)

1.1.1. Clasificación (p. 12)

1.1.2. Composición (p. 13)

1.2. La denominación de origen protegida “Aceite de Navarra” (p. 15)

1.3. Estudio del mercado del aceite de oliva (p. 16)

1.3.1. Estudio a nivel internacional (p. 16)

1.3.2. Estudio a nivel nacional y autonómico (p. 18)

1.4. Aspectos previos a la elaboración (p. 19)

1.4.1. El olivo (p. 19)

1.4.2. La aceituna (p. 20)

1.5.2.1. Variedad Arbequina (p. 21)

1.5.2.2. Variedad Arbosana (p. 21)

1.5.2.3. Variedad Arróniz (p. 21)

1.5.2.4. Variedad Koroneiki (p. 21)

1.5.2.5. Variedad Manzanilla Cacereña (p. 22)

1.4.3. La finca (p. 23)

1.5.3.1. Clima (p. 24)

1.5.3.2. La plantación (p. 25)

1.5.3.3. Riego y fertilización (p. 25)

1.5.3.4. Tratamientos fitosanitarios (p. 26)

1.4.4. Condiciones de cosecha (p. 28)

1.5. El proceso de elaboración (p. 30)

1.6. Comercialización (p. 37)

1.7. Significado de los parámetros químicos a analizar (p. 38)

1.7.1. Grado de acidez (p. 38)

1.7.2. Índice de peróxidos (p. 39)

1.7.3. K_{232} , K_{270} , ΔK (p. 42)

1.7.4. Humedad y materias volátiles (p. 43)

1.7.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo(p. 43)

1.7.6. Ceras (p. 44)

- 1.7.7. Estigmastadieno (p. 44)
- 1.7.8. Monopalmitato de 2-glicerilo (p. 45)
- 1.7.9. Composición de los ácidos grasos (p. 45)
- 1.7.10. Diferencia ECN42 real y teórico (p. 46)
- 1.7.11. Composición de los esteroides y eritrodiol + uvaol (p. 47)
- 1.7.12. Valores límite de los parámetros analizados para el aceite de oliva virgen extra (p. 48)

1.8. La cata o análisis sensorial (p. 50)

2. Objetivos (p. 52)

3. Diseño experimental (p. 54)

3.1. Análisis químico (p. 54)

3.2. Análisis sensorial (p. 55)

4. Materiales y métodos (p. 57)

4.1. Material base (p. 58)

4.2. Análisis químico (p. 59)

- 4.2.1. Grado de acidez (p. 59)
- 4.2.2. Índice de peróxidos (p. 61)
- 4.2.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK) (p. 64)
- 4.2.4. Humedad y materias volátiles (p. 66)
- 4.2.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo (p. 67)
- 4.2.6. Contenido de ceras mediante cromatografía de gases (p. 68)
- 4.2.7. Determinación de estigmastadienos (p. 70)
- 4.2.8. Monopalmitato de 2-glicerilo (p. 74)
- 4.2.9. Composición de ácidos grasos (p. 78)
- 4.2.10. Diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC. (p. 80)
- 4.2.11. Composición de esteroides y eritrodiol + uvaol (p. 86)

4.3. Análisis sensorial (p. 91)

4.4. Método de análisis estadístico (p. 94)

5. Resultados y discusión (p. 96)

5.1. Caracterización de los aceites según análisis químico (p. 97)

- 5.1.1. Grado de acidez (p. 97)
- 5.1.2. Índice de peróxidos (p. 98)
- 5.1.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK) (p. 99)
- 5.1.4. Humedad y materias volátiles (p. 101)
- 5.1.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo (p. 102)
- 5.1.6. Ceras (p. 103)
- 5.1.7. Estigmastadieno (p. 104)
- 5.1.8. Monopalmitato de 2-glicerilo (p. 104)
- 5.1.9. Ácidos grasos (p. 105)
- 5.1.10. Diferencia entre el ECN42 real y teórico (p. 112)
- 5.1.11. Esteroles y eritrodiol + uvaol (p. 113)

5.2. Caracterización de los aceites según análisis sensorial (p. 119)

6. Conclusiones (p. 120)

7. Bibliografía (p. 123)

8. Anexos (p. 127)

Índice de figuras y tablas

Figuras:

Figura 1. Evolución en el tiempo de la superficie cultivada de olivar en el mundo por países. Fuente: Elaboración propia. Datos: FAOSTAT 2008.

Figura 2. Evolución en el tiempo de la producción mundial de aceite de oliva virgen en miles de toneladas por países. Fuente: Elaboración propia. Datos: Consejo oleícola internacional 2010.

Figura 3. Análisis de la producción según clases. Fuente: Anuario de estadística agraria 2008

Figura 4. Rama de olivo arbequina en fase de crecimiento

Figura 5. Rama de Arbosana en fase de crecimiento

Figura 6. Rama de Arróniz en fase de crecimiento

Figura 7. Rama de Koroneiki en fase de crecimiento

Figura 8. Rama de Manzanilla cacereña en crecimiento

Figura 9. Vista aérea de la finca de olivar situada al lado de la A-68 km 103

Figura 10. Gráfico climático de la estación de Buñuel

Figura 11. Vendimiadora New Holland VX7090

Figura 12. Diagrama de flujo de tecnología de la elaboración del aceite de oliva virgen extra Artajo

Ilustración 13. Molino de criba rotante 50 CV. Pievalisi

Ilustración 14. Decánter Pievalisi SPI 111 S

Ilustración 15. Centrífuga vertical Pievalisi

Figura 16. Depósitos de decantación

Figura 17. Formato de comercialización en botellas de 250 ml de los aceites estudiados. De izquierda a derecha: Arbequina, Manzanilla Cacereña, Koroneiki, Arbosana, Arróniz.

Figura 18. Logotipo del CPAEN-NNPEK. Consejo de la producción agraria ecológica de Navarra

Figura 19. Oxidación enzimática de los ácidos grasos insaturados. (Aparicio, Harwood 2003)

Figura 20. Oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y formación de productos primarios (hidroperóxidos) y secundarios (compuestos no volátiles y volátiles responsables del flavor desagradable) (Aparicio y Harwood, 2003)

Figura 21. Cambios de los ácidos grasos saturados e insaturados (%) durante el proceso de deterioro oxidativo del aceite de oliva virgen (Aparicio y Harwood en 2003)

Figura 22. Reacción de interesterificación

Figura 24. Aceites a analizar después de dar entrada en el laboratorio

Figura 25. La muestra antes de ser valorada y después

Figura 26. Reacción de oxidación del ioduro potásico por parte de los peróxidos

Figura 27. Dos réplicas de la solución que contiene la muestra antes (izquierda) y después (derecha) de ser valoradas con tiosulfato sódico

Figura 28. Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Gamma

Figura 29. Cromatógrafo de gases HP 6890 con el que se realizan los análisis de las ceras y del monopalmitato de 2-glicerilo. Lleva acoplado el sistema de inyección de muestra automático

Figura 30. Cromatógrafo de gases Agilent 6890N para la determinación de los estigmastadienos y los esteroides con sistema de inyección automática de muestras Agilent 7683 ALS

Figura 31. Cromatógrafo de gases HP 5890 para la determinación de la composición de ácidos grasos

Figura 32. Cromatógrafo de líquidos Waters Alliance HPLC con detector de índice de refracción (RI) 2414, de Waters, con el que se realiza la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del ECN42 real.

Figura 33. Tabla de cálculo del ECN42 teórico y de la diferencia de éste con el real. Fuente: Consejo oleícola internacional

Figura 34. Cromatógrafo de gases con el horno abierto utilizado para la determinación del estigmastadieno, la composición de los esteroides y la cuantificación de los esteroides totales y el eritrodiol + uvaol.

Figura 35. Ficha de cata oficial del Reglamento (CE) 640/2008 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites y sobre sus métodos de análisis

Figura 36. Valores medios de acidez expresada en porcentaje de ácido oleico para cada variedad de aceite

Figura 37. Valores medios de índice de peróxidos expresado en miliequivalentes de oxígeno por kilo de aceite

Figura 38. Valores medios de K_{232}

Figura 39. Valores medios del K_{270}

Figura 40. Valores medios de ΔK para todas las variedades

Figura 41. Valores medios de humedad para todas las variedades

Figura 42. Resultados del contenido en ceras totales en ng/ μ l

Figura 43. Resultados de la prueba del monopalmitato de 2-glicerilo expresado en %

Figura 44. Media del porcentaje de ácido palmítico en las variedades estudiadas

Figura 45. Media del porcentaje de ácido palmitoleico en las variedades estudiadas

Figura 46. Media del porcentaje de ácido oleico en las variedades estudiadas

Figura 47. Media del porcentaje de ácido linoleico en las variedades estudiadas

Figura 48. Media del porcentaje de ácido linolénico en las variedades estudiadas

Figura 49. Perfil resumen de la composición de los ácidos grasos en cada aceite monovarietal

Figura 50. Diferencia gráfica entre el ECN42 teórico y el ECN42 real calculado mediante HPLC

Figura 51. Media del porcentaje de campesterol en las variedades estudiadas

Figura 52. Media del porcentaje de β -sitosterol en las variedades estudiadas

Figura 53. Media del porcentaje de Δ^5 -avenasterol en las variedades estudiadas

Tablas

Tabla 1. Superficie de olivar en España. Año 2009. Fuente: Anuario de estadísticas agroalimentarias 2008 (MARM)

Tabla 2. Toneladas de aceite virgen extra y virgen producidas por cada Comunidad Autónoma en 2007. Fuente: Anuario de estadística agraria 2008

Tabla 3. Composición de las aceitunas

Tabla 4. Tabla resumen de las variedades a estudiar

Tabla 5. Ficha climática de la estación de Buñuel

Tabla 6. Aplicaciones mensuales de agua y fertilizante en régimen convencional

Tabla 7. Aplicaciones mensuales de agua y fertilizante en régimen ecológico

Tabla 8. Tratamientos fitosanitarios realizados la campaña de 2009 al olivar convencional

Tabla 9. Tratamientos realizados en la campaña anterior al olivar ecológico

Tabla 10. Clasificación de los aceites según parámetros químicos. Reglamento (CE) nº 702/2007 de la comisión de 21 de junio de 2007 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

Tabla 11. Cantidad de muestra y precisión necesarias según la acidez prevista

Tabla 12. Cantidad de muestra a pesar según índice de peróxidos esperado

Tabla 13. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis de ceras

Tabla 14. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis del estigmastadieno

Tabla 15. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis del monopalmitato de 2-glicerilo

Tabla 16. Media y desviación estándar resultante de los análisis de la acidez expresada en porcentaje en ácido oleico

Tabla 17. Media y desviación estándar resultante de los análisis del índice de peróxidos expresados en miliequivalentes de oxígeno por kilo de muestra

Tabla 18. Media y desviación estándar resultante de los análisis espectrofotométricos

Tabla 19. Media y desviación estándar de la humedad y materias volátiles (% en peso)

Tabla 20. Media y desviación estándar de los resultados de impurezas insolubles en éter de petróleo expresados en porcentaje (P/P)

Tabla 21. Contenido en ceras totales expresado en % (P/P)

Tabla 22. Contenido en monopalmitato expresado en %

Tabla 23. Media y desviación estándar de la composición de ácidos grasos expresados en porcentaje del total de ácidos grasos

Tabla 24. Comparación de las variedades en el grado de saturación

Tabla 25. Valores del ECN42 teórico y real y la diferencia entre ambos

Tabla 26. Resumen de los datos obtenidos en un único análisis de cuantificación de los esteroides totales y del eritrodiol + uvaol

Tabla 27. Media y desviación típica de la composición de esteroides expresados en porcentaje del total de esteroides

Tabla 128. Resultados del panel de cata según la ficha oficial del Reglamento (CE) Nº 640/2008

1. Antecedentes

1. Antecedentes

1.1. El aceite de oliva

- 1.1.1. Clasificación
- 1.1.2. Composición

1.2. La denominación de origen protegida “Aceite de Navarra”

1.3. Estudio del mercado del aceite de oliva

- 1.3.1. Distribución geográfica a nivel internacional
- 1.3.2. Distribución geográfica a nivel nacional y autonómico

1.4. Aspectos previos a la elaboración

- 1.4.1. El olivo
- 1.4.2. La aceituna
 - 1.5.2.1. Variedad Arbequina
 - 1.5.2.2. Variedad Arbosana
 - 1.5.2.3. Variedad Arróniz
 - 1.5.2.4. Variedad Koroneiki
 - 1.5.2.5. Variedad Manzanilla Cacereña
- 1.4.3. La finca
 - 1.5.3.1. Clima
 - 1.5.3.2. La plantación
 - 1.5.3.3. Riego y fertilización
 - 1.5.3.4. Tratamientos fitosanitarios
- 1.4.4. Condiciones de cosecha

1.5. El proceso de elaboración

- 1.5.1. Tecnología del proceso
- 1.5.2. Ingeniería del proceso
- 1.5.3. Comercialización

1.6. Significado de los parámetros químicos a analizar

- 1.6.1. Grado de acidez
- 1.6.2. Índice de peróxidos
- 1.6.3. K_{270} , K_{232} , ΔK
- 1.6.4. Humedad y materias volátiles
- 1.6.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo
- 1.6.6. Ceras

- 1.6.7. Estigmastadieno
- 1.6.8. Monopalmitato de 2-glicerilo
- 1.6.9. Composición de los ácidos grasos
- 1.6.10. Diferencia ECN42 real (HPLC) y teórico
- 1.6.11. Composición de los esteroides
- 1.6.12. Valores límite de los parámetros analizados para el aceite de oliva virgen extra

1.7. La cata o análisis sensorial

1. Antecedentes

1.1. El aceite de oliva

El aceite de oliva es, según el Consejo Oleícola Internacional y el reglamento, el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.). Esta denominación no es aplicable a los aceites de orujo de oliva.

1.1.1. Clasificación

Para hablar en profundidad del aceite de oliva es necesario clasificarlos primero de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1513/2001 del consejo de 23 de julio de 2001, que modifica el Reglamento 136/66/CEE y el Reglamento (CE) nº 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva:

1. Aceites de oliva vírgenes: Aceites obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos, en condiciones que no produzcan la alteración del aceite, y que no hayan sufrido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolvente, mediante coadyuvante de acción química o bioquímica, o por procedimiento de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. El aceite de oliva virgen debe ser exclusivamente el zumو oleoso de las aceitunas.

Los aceites de oliva vírgenes se clasifican y denominan de la siguiente forma:

- Aceite de oliva virgen extra: Aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 g por 100 g y cuyas demás características corresponden a las previstas para esta categoría.
- Aceite de oliva virgen: Aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2,0 g por 100 g y cuyas demás características corresponden a las previstas para esta categoría.
- Aceite de oliva virgen lampante: Aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 2,0 g por 100 g y/o cuyas características organolépticas y demás características corresponden a las previstas para esta categoría. Se destina al refinado con vistas al consumo humano o a usos técnicos.

El Consejo Oleícola Internacional reconoce una calidad intermedia entre aceite de oliva virgen y aceite de oliva virgen lampante. Éste se denomina aceite de oliva corriente y su acidez libre en ácido oleico máxima es de 3,3 g por 100 g.

2. Aceite de oliva refinado: Aceite de oliva obtenido por refinado de aceites de oliva vírgenes. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 g por 100 g, y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría.

3. Aceite de oliva: aceite constituido por una 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 g por 100 g, y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría.

El reglamento también distingue otro tipo de aceites, los aceites de orujo de oliva, pero éstos ya no se consideran aceites de oliva como tal puesto que están extraídos refinando los orujos.

1.1.2. Composición

El aceite de oliva virgen está compuesto en un 98-99% de triglicéridos (triacilglicéridos), pero no todos los ácidos grasos se encuentran en los triglicéridos, sino que también hay ácidos grasos libres, cuya proporción es variable y depende del grado de hidrólisis. La composición de los ácidos grasos en el aceite de oliva varía con la variedad, las condiciones climáticas y la localización geográfica del olivar.

La mayor parte de los ácidos grasos del aceite de oliva son monoinsaturados. Una composición generalizada atendiendo al tipo de insaturación sería; un 72% de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico principalmente), un 14% de ácidos grasos poliinsaturados y otro 14% para los ácidos grasos saturados.

Los componentes menores del aceite de oliva son indicadores específicos de su autenticidad y le añaden propiedades sensoriales y biológicas únicas (Aparicio y Harwood, 2003):

- El escualeno es el representante mayoritario de los hidrocarburos terpénicos del aceite de oliva (300-700 ppm), mientras que el β -caroteno, precursor biológico de la vitamina A, se encuentra en muy pequeñas cantidades (pocos ppm).
- Los alcoholes triterpénicos (24-metilen-cicloartenol, junto con cicloartenol, α -amirina y β -amirina) son específicamente importantes desde el punto de vista biológico. El eritrodol también lo es desde el punto de vista analítico, en la detección de la presencia de aceite de orujo de oliva.
- Los esteroides constituyen la huella analítica que permiten la autenticación del aceite de oliva, sobretodo porque el contenido de β -sitosterol aparente es menor del 93% del total de esteroides.
- Los tocoferoles, especialmente el α -tocoferol o vitamina E (150-300 ppm), son importantes antioxidantes.

- Los compuestos fenólicos, algunos de los cuales proporcionan el característico sabor del aceite de oliva, incrementan sus propiedades antioxidantes.
- Para finalizar la composición, también se encuentran presentes unos cien compuestos aromáticos, cuya composición química depende de la variedad, condiciones pedoclimáticas y calidad del aceite.

1.3. La denominación de origen protegida “Aceite de Navarra”

Recientemente, se ha creado la denominación de origen protegida “Aceite de Navarra”. Con esta denominación se pretende conseguir que los que estén bajo ella cumplan unas exigencias de calidad para satisfacer al consumidor.

Con el sello de la Denominación de Origen, únicamente se comercializa Aceite de Oliva Virgen Extra, de acidez inferior a 0,5 grados, sin defectos y con un frutado superior a 3. Las botellas presentan siempre el logotipo de la Denominación y una contraetiqueta numerada.

El Aceite de Oliva Virgen Extra de Navarra es el aceite de Europa que más al norte se produce. El área geográfica delimitada por la D.O.P. "Aceite de Navarra" comprende un total de 135 municipios del Sur de Navarra. Una zona que se caracteriza por una clara influencia mediterránea, con fuertes contrastes térmicos, pluviometría escasa, alta insolación, influencia de viento dominante del noroeste (cierzo) y corto periodo libre de heladas. Los suelos son pardo calizos carbonatados.

El Aceite de Navarra es un aceite de oliva exclusivamente Virgen Extra obtenido, al menos en un 90%, de las variedades Arróniz (autóctona), Arbequina o Empeltre, así que de las variedades estudiadas sólo entran la Arbequina y la Arróniz.

Desde el punto de vista organoléptico, es un aceite de perfil equilibrado y complejo, con una elevada intensidad del atributo frutado (>3), que presentan un aroma con matices que van desde la oliva verde a las especias y olivas maduras. En boca resultan entre ligeros y medianamente amargos y picantes, con toques de alcachofa (Arróniz), plátano (Arbequina), o almendrados y dulces (Empeltre).

El Instituto de Calidad Agroalimentaria de Navarra (ICAN) es la entidad que certifica la trazabilidad en todo el proceso y la calidad del aceite obtenido.

1.4. Estudio de mercado del aceite de oliva

Para evaluar las tendencias del mercado del Aceite de Oliva es necesario observar los datos de producción y consumo del mismo a nivel internacional y a nivel nacional comparando entre sí las diferentes autonomías.

La producción del aceite de oliva está centrada principalmente en los países mediterráneos, que es donde se encuentra el 96% de la producción en el mundo.

1.4.1 Distribución geográfica a nivel internacional

El olivar es originario de una región geográfica que ocupa desde el sur del Cáucaso hasta Irán, Palestina y la zona costera de Siria y se extendió por Chipre hacia Turquía y a través de Creta hacia Egipto, hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. En el siglo XV se comenzó a expandir por América con los viajes oceánicos y en la actualidad se cultiva también en Sudáfrica, China, Japón y Australia. (Civantos, 2008).

Hablando de la actualidad, el cultivo del olivo (*Olea Europaea*; variedad sativa) se centra en la cuenca Mediterránea, como ya se nombra antes, pero en cuanto a principales países productores hay que señalar a España, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos. La superficie ocupada por olivar en el mundo son unos 11 millones de hectáreas y en la Figura 1 se refleja cómo está distribuida por países.

En este gráfico (Figura 1) se distingue a Túnez, España e Italia como países con más superficie olivarera a fecha de 2008 pero, en lo que respecta a producción de aceite de oliva (Figura 2) es algo diferente. Éste hecho tiene la explicación de que la densidad de árboles y los rendimientos cambian según el país y que en Túnez la superficie ha crecido recientemente y todavía no tienen plantaciones a pleno rendimiento. También es destacable que, a excepción de España y Túnez, que han incrementado su superficie, todos los países se mantienen estables.

España es el principal país productor del mundo, relevado sólo en ocasiones puntuales por Italia. Estos dos países junto con Grecia, Túnez, Siria, Turquía y Marruecos suponen el 90% total de la producción. Lo que da una idea de lo concentrado que está el sector en torno a seis países principalmente.

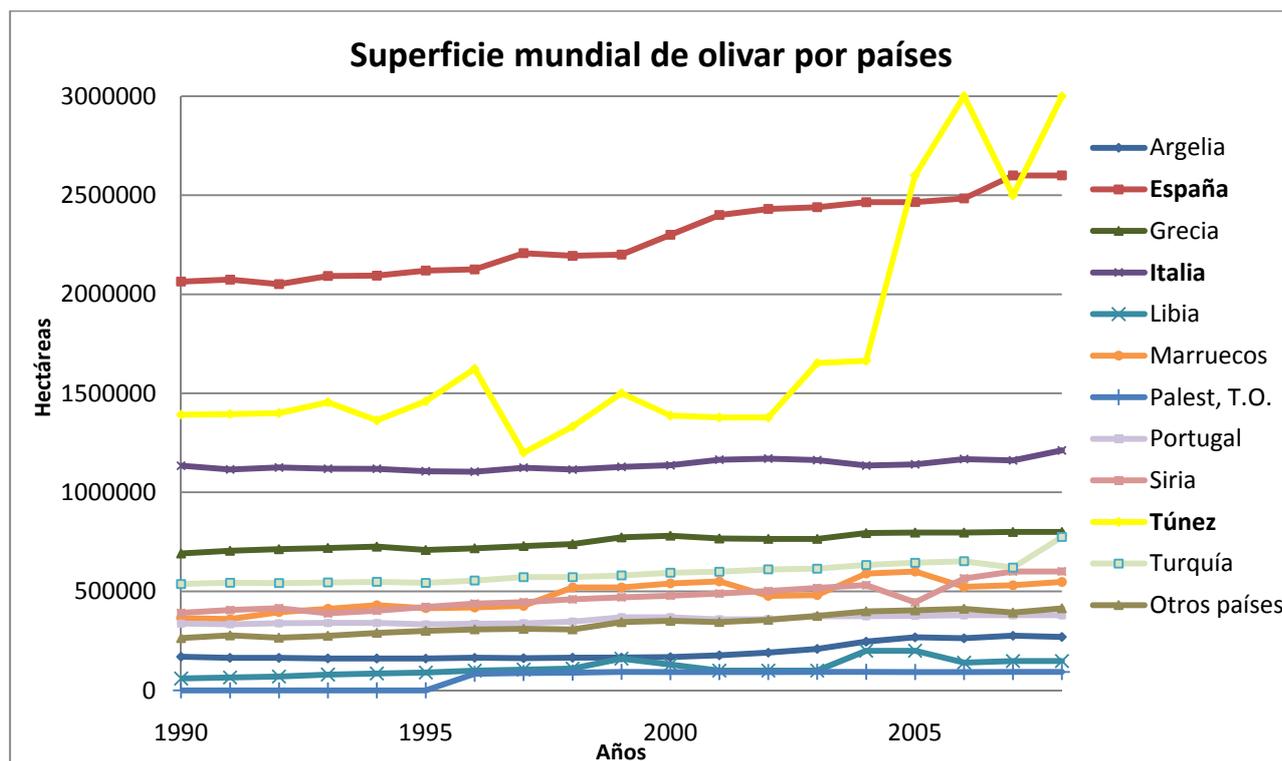


Figura 1. Evolución en el tiempo de la superficie cultivada de olivar en el mundo por países. Fuente: Elaboración propia. Datos: FAOSTAT 2008.

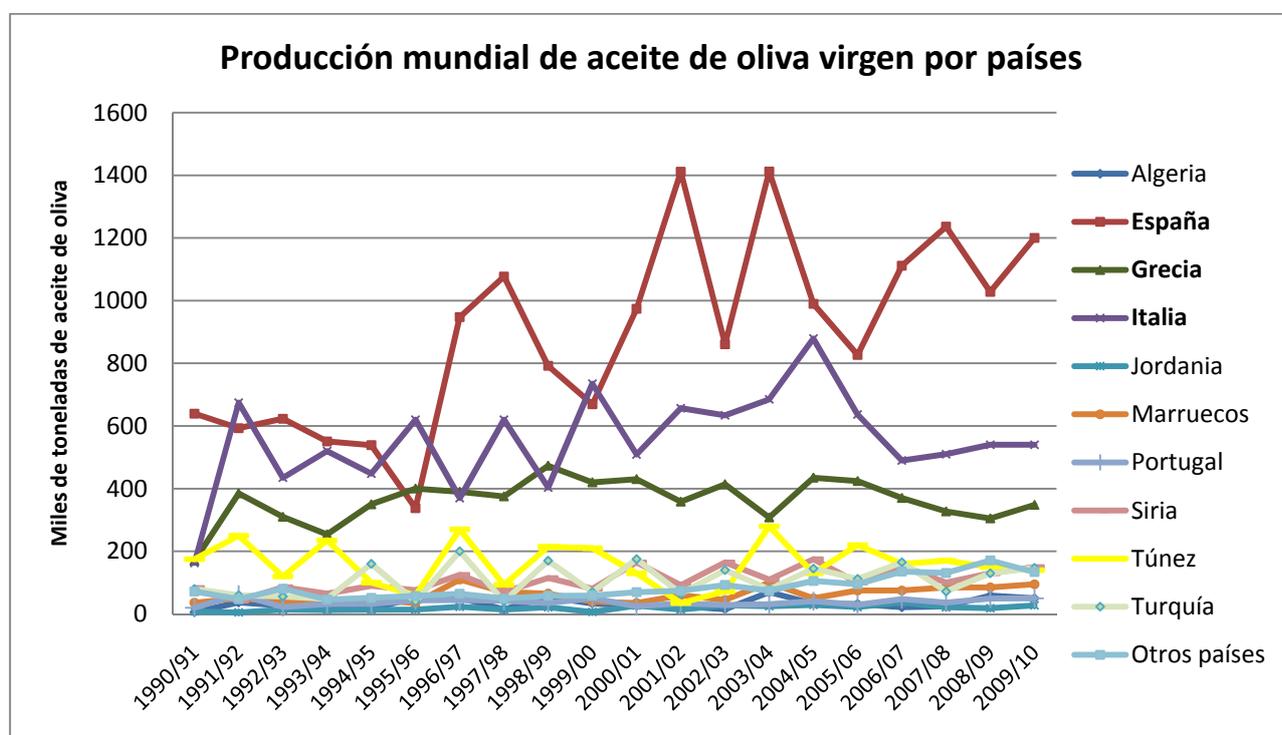


Figura 2. Evolución en el tiempo de la producción mundial de aceite de oliva virgen en miles de toneladas por países. Fuente: Elaboración propia. Datos: Consejo oleícola internacional 2010.

Comparando entre sí los gráficos de la superficie y de la producción es destacable, que la segunda sea tan inestable. La tendencia en la producción de aceite

de oliva virgen es a la alta, aunque la superficie se mantenga, el olivar español ha estado sometido a un proceso de renovación que está dando lugar al aumento de productividad. Este proceso llevaba consigo un aumento de las plantaciones densas en las zonas más adecuadas para el cultivo del olivar.

1.4.2. Distribución geográfica a nivel nacional y autonómico

España cuenta con olivares repartidos por casi todo el territorio, lo que le sitúa a la cabeza de la producción mundial de aceite de oliva en el mundo. Las últimas estadísticas del Ministerio de agricultura sitúan la superficie de olivar en España en 2.568.383 ha (Encuesta sobre superficies del MARM, 2009) con el desglose de la Tabla 1.

Tabla 1. Superficie de olivar en España. Año 2009. Fuente: Anuario de estadísticas agroalimentarias 2008 (MARM)

CULTIVO	Secano (ha)	Regadío (ha)	Total (ha)
OLIVAR ACEITUNA DE MESA	50.830	42.185	93.015
OLIVAR ACEITUNA DE ALMAZARA	1.828.285	647.082	2.475.368
OLIVAR TOTAL	1.879.116	689.267	2.568.383

En lo que respecta a la cantidad y calidad del aceite producido en España, nos encontramos con los siguientes datos:

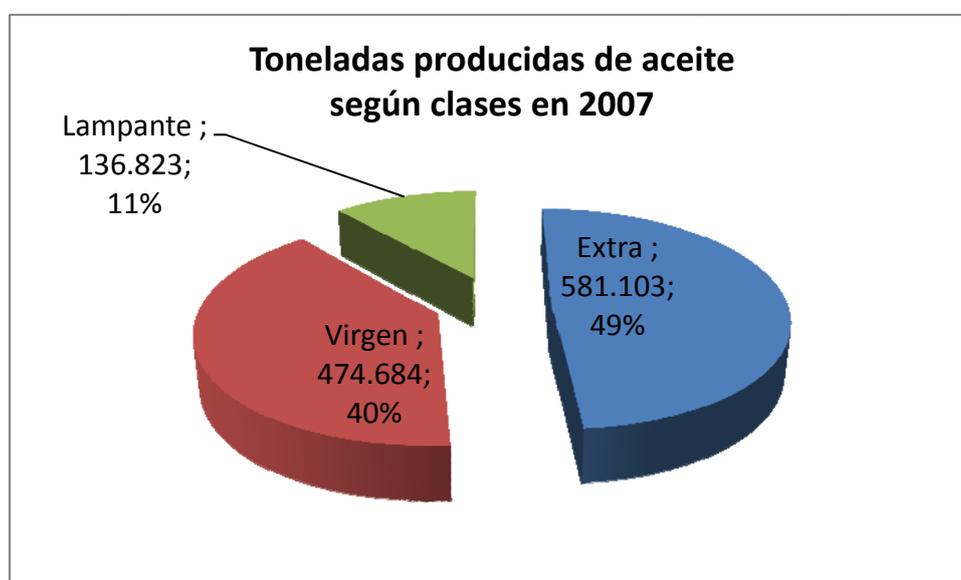


Ilustración 3. Análisis de la producción según clases. Fuente: Anuario de estadística agraria 2008

La variación de la producción de aceite virgen extra y virgen entre Comunidades Autónomas es visiblemente notable en la Tabla 2, puesto que Andalucía copa el 83,33% del sector. Si habláramos de refinado el porcentaje sería incluso más alto.

Tabla 2. Toneladas de aceite virgen extra y virgen producidas por cada Comunidad Autónoma en 2007. Fuente: Anuario de estadística agraria 2008

Comunidades Autónomas	Producciones virgen y virgen extra (toneladas)
PAÍS VASCO	79
NAVARRA	2.547
LA RIOJA	569
ARAGÓN	8.193
CATALUÑA	14.057
BALEARES	271
CASTILLA Y LEÓN	892
MADRID	5.116
CASTILLA-LA MANCHA	82.083
C. VALENCIANA	20.997
R. DE MURCIA	4.141
EXTREMADURA	36.930
ANDALUCÍA	879.888
CANARIAS	24
TOTAL	1055787

1.5. Aspectos previos a la elaboración

1.5.1. El olivo

El olivo, *Olea europea* L., pertenece a la familia botánica Oleaceae, que comprende especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos, pero ninguna produce fruto comestible, excepto el olivo.

El olivo cultivado (*Olea europea* L.) es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 metros de altura según la variedad y el sistema de plantación. Puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada y la ramificación natural tiende a producir una copa bastante densa, pero la poda sirve para aclararla y permitir la penetración de la luz. Las características de densidad de la copa, el porte, el color de la madera y la longitud de entrenudos varían según el cultivar.

El olivo es un árbol polimórfico, con fases juvenil y adulta. Las diferencias entre estas fases se manifiestan en la capacidad reproductora (sólo en la fase adulta).

1.5.2. La aceituna

El fruto del olivo es la aceituna, una drupa de tamaño variable. Normalmente mide de 1 a 4 cm de longitud y de 0,6 a 2 cm de diámetro. Esto depende de las variedades, naturaleza de los suelos, climatología del año, etc.

La composición del fruto en el momento de recolección, cuando el fruto está totalmente desarrollado, es un aspecto importante de cara a la elaboración del aceite:

- Agua de vegetación: 40 a 55%
- Aceite: 18 a 32%
- Hueso: 14 a 22%
- Almendra o semilla: 1 a 3%
- Epicarpio y resto de la pulpa: 8 a 10%

La composición química de las principales partes de la aceituna quedan reflejadas en el siguiente cuadro:

Tabla 3. Composición de las aceitunas

Zona	% sobre materia seca				
	Materia nitrogenada	Materia grasa	Celulosa bruta	Extracto no nitrogenado	Material mineral
Epicarpio	9,8	3,4	2,4	82,8	1,6
Mesocarpio	9,6	51,8	12,0	24,2	2,3
Endocarpio	1,2	0,8	74,1	22,7	1,2

1.5.2.1. Variedad Arbequina



Figura 4. Rama de olivo arbequina en fase de crecimiento

Es una variedad considerada resistente al frío y susceptible a clorosis férrica en terrenos muy calizos. Es apreciada por su precoz entrada en producción, elevada productividad, buen rendimiento graso y excelente calidad de aceite, aunque presente baja estabilidad por su contenido bajo en ácido oleico y alto en linoleico. El árbol tiene un vigor reducido, lo que facilita las plantaciones intensivas. El tamaño de los frutos es pequeño y se le atribuye cierta tolerancia a repilo y verticiclosis.

1.5.2.2. Variedad Arbosana

Se trata de una variedad catalana de elevada productividad pero poco rendimiento y que entra en producción la última. Por su escaso vigor está muy bien adaptada a plantaciones de alta densidad (seto). Sensible al frío, de fruto pequeño que madura varias semanas después que la Arbequina. Produce un aceite virgen de frutado verde intenso con niveles altos de amargo, picante y astringente.



Figura 5. Rama de Arbosana en fase de crecimiento

1.5.2.3. Variedad Arróniz

Es una variedad autóctona de Navarra que entra en producción después de la arbequina. Posee un ciclo vegetativo corto, ya que se produce en olivares de floración tardía y maduración media. Es una variedad que ofrece, además, un alto rendimiento graso y que se caracteriza por la presencia de un gran número de antioxidantes vegetales que permiten una larga vida al producto final. Por su alto contenido en ácido oleico y polifenoles resulta ser muy resistente al enranciamiento Su aceite es frutado medio alto con notas amargas y picantes, muy equilibrado y aromático.



Figura 6. Rama de Arróniz en fase de crecimiento

1.5.2.4. Variedad Koroneiki

Variedad de origen griego. Es productiva y de precoz entrada en producción. Se la considera resistente a la sequía pero sensible al frío. Tolerante a "repilo" (*Spilocaea oleagina*). Fruto muy pequeño que madura entre la Arróniz y la Arbosana. Produce aceites vírgenes apreciados comercialmente, de color verde intenso y bastante rico en ácido oleico, polifenoles y compuestos amargos que le confieren una larga vida útil.



Figura 7. Rama de Koroneiki en fase de crecimiento

1.5.2.5. Variedad Manzanilla Cacereña

Se trata de una variedad muy interesante por su productividad precoz y constante, ya que se recoge la primera así como por su doble aptitud para aceituna de mesa y para aceite. Su contenido en aceite es bajo, pero de calidad. Se adapta muy bien a la recolección mecánica por su baja resistencia al desprendimiento.



Figura 8. Rama de Manzanilla cacereña en crecimiento

A modo resumen se presenta esta tabla que especifica los parámetros más significativos de cara a planificar la producción:

Tabla 4. Tabla resumen de las variedades a estudiar

Variedad	Año plantación	Superficie (ha)	Orden y fecha de recolección	Índice madurez óptimo	Rendimientos finales en aceite (% del peso inicial)
Arbequina	2001	63,52	2ª Primera semana de noviembre	2,3	15,5
Arbequina ecológica	2001	21,11	2ª Primera semana de noviembre	2,3	15,2
Arbosana	2006	6,52	5ª Cuarta semana de noviembre	2,1	11,5
Arróniz	2006	5,41	3ª Segunda semana de noviembre	2,65	17
Koroneiki	2006	2,21	4ª Tercera semana de noviembre	2,50	19
Manzanilla cacereña	2006	3,94	1ª 24-25 de octubre	2,55	15,8

1.5.3. La finca

La finca se sitúa en el término municipal de la localidad de Fontellas, en la Ribera de Navarra.

En la fotografía aérea la finca está separada por sectores y el número en blanco es la superficie en hectáreas de cada uno de ellos. La distribución de las variedades es la siguiente:

- Arbequina convencional: Sectores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10
- Manzanilla cacereña: Sector 11
- Arróniz: Sector 12
- Koroneiki: Sector 13
- Arbosana: Sector 14
- Arbequina ecológico: Sectores 17, 18, 19 y 20

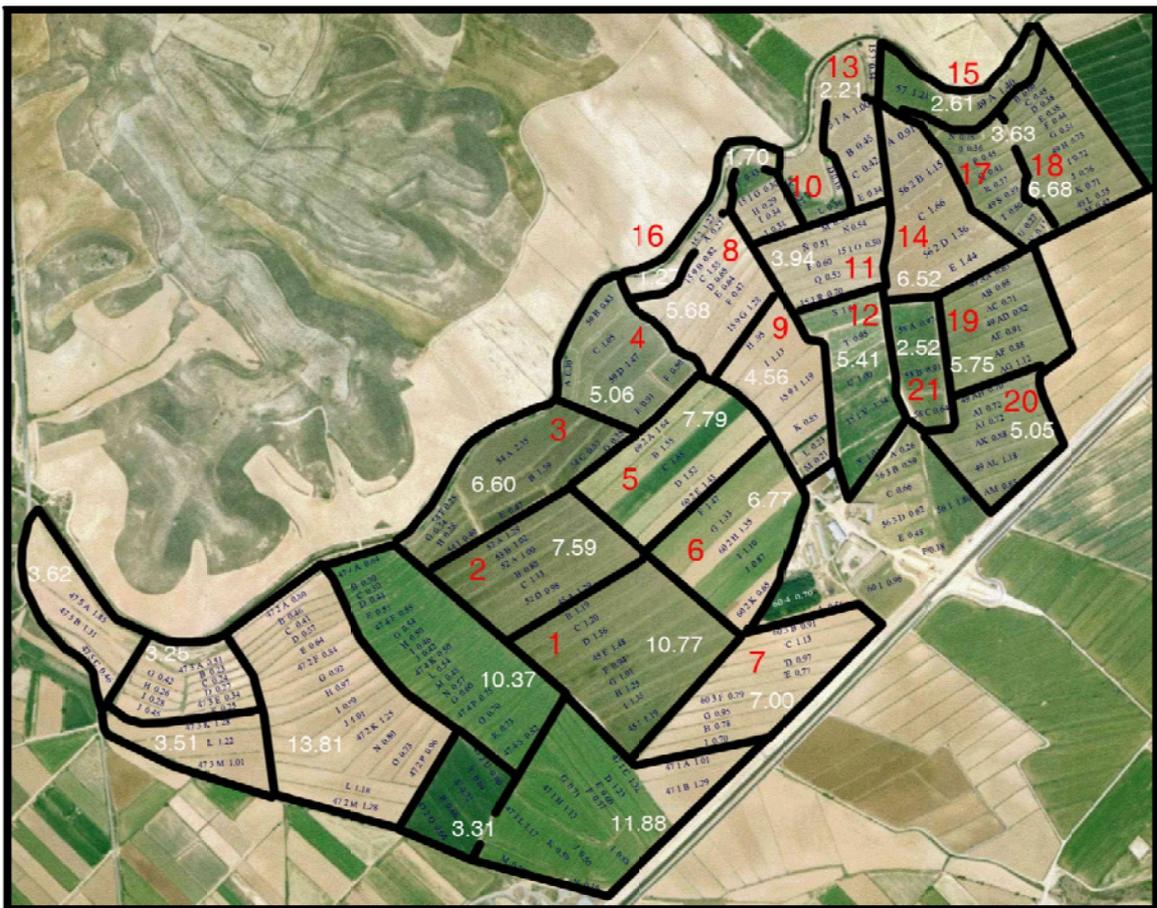


Figura 9. Vista aérea de la finca de olivar situada al lado de la A-68 km 103

1.5.3.1. Clima

La climatología de Fontellas, situada a 277 m de altitud sobre el nivel del mar, está definida como “clima estepario semiárido” según la clasificación climática de Köppen y se caracteriza porque las lluvias son escasas.

El gráfico climático de la estación de Buñuel es el más cercano y es representativo de la zona:

Latitud: 4648630. **Longitud:** 629027. **Altitud:** 244 m

Periodo Precipitación: 1928-2004. **Periodo Temperatura:** 1964-2004

Tabla 5. Ficha climática de la estación de Buñuel

Parámetro	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Año
Precipitación media (mm)	25,0	24,6	26,7	38,5	46,6	36,7	20,0	22,5	36,1	36,0	37,7	31,4	381,8
Días de lluvia	6,0	5,0	6,0	6,0	6,0	3,0	1,0	2,0	3,0	6,0	7,0	7,0	58,0
Días de nieve	0,9	0,7	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	2,2
Días de granizo	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Temperatura media de máximas (°C)	10,5	12,8	16,3	18,6	23,2	28,1	31,3	30,7	26,4	20,7	14,2	10,6	20,3
Temperatura media (°C)	6,1	7,7	10,3	12,6	16,8	21,2	24,0	23,6	19,8	15,0	9,4	6,5	14,4
Temperatura media de mínimas (°C)	1,7	2,5	4,3	6,6	10,5	14,3	16,6	16,5	13,3	9,2	4,6	2,4	8,5
Días de helada	12,0	9,0	4,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	10,0	40,0
Evapotranspiración potencial, índice de Thornthwaite (ETP)	12,0	17,0	33,0	50,0	86,0	123,0	148,0	135,0	91,0	55,0	23,0	13,0	786,0

- Precipitación máxima histórica en 24 horas para un periodo de retorno de 10 años: 83.3 mm
- Fecha media primera helada otoño: 30 de Octubre
- Fecha media última helada primavera: 18 de Abril

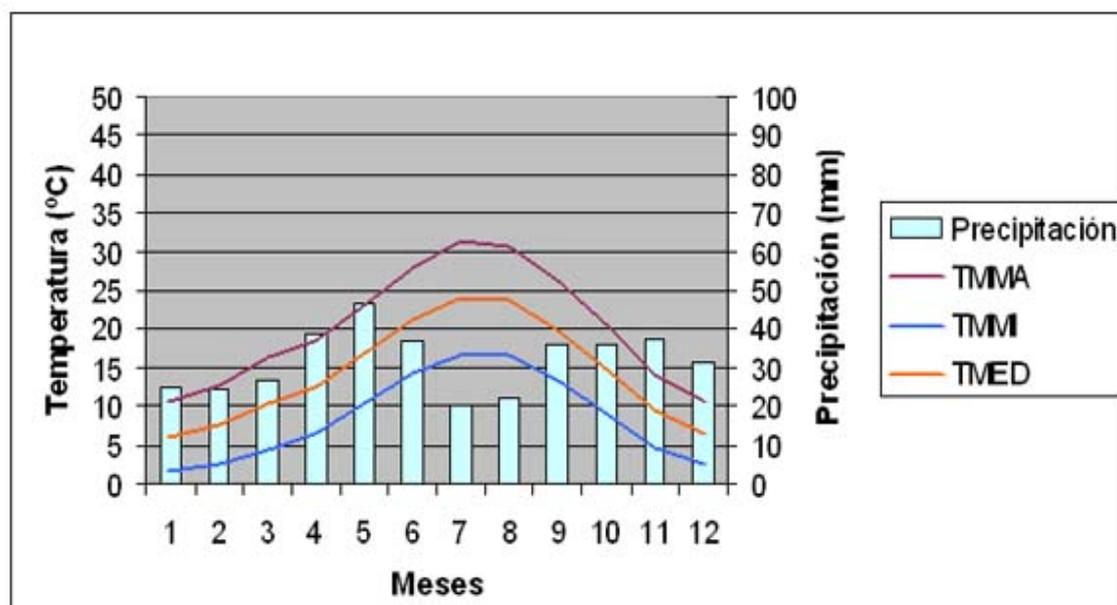


Figura 10. Gráfico climático de la estación de Buñuel

1.5.3.2. La plantación

El sistema de plantación establecido es el llamado “en espaldera” para todas las variedades. Esto significa que la densidad es mayor de 1500 árboles/ha para una recolección mecanizada.

La plantación ecológica de Arbequina tiene un sistema de corte de las hierbas en lugar de tratarlo con herbicida, y así se forma una cubierta vegetal que no tienen el mismo aspecto.

1.5.3.3. Riego y fertilización

Los fertilizantes y el agua de riego en la finca se aplican conjuntamente, así que lo más correcto sería llamarlo fertirrigación. Es un medio de aprovechar el agua como vehículo de los fertilizantes.

La aplicación de éstos es realizada por el sistema del riego por goteo, con el que el aprovechamiento del agua es máximo.

Cabe destacar que la diferencia principal entre diferentes zonas de la finca viene dada por el sector ecológico.

En la siguiente tabla están reflejadas las cantidades mensuales de agua y fertilizantes aplicadas en la campaña anterior para cada régimen.

Tabla 6. Aplicaciones mensuales de agua y fertilizante en régimen convencional

Fertirrigación convencional	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	TOTAL
Agua (m3/ha)	150	150	250	400	500	500	400	150	2500
12(N)-3(P)-5(K). Ácido líquido ph 1,5 (kg)	60	60	60	60					240
2-4-11 + 1%Mg. Ácido líquido ph 1,5 (kg)					150	150	150	150	600

Tabla 7. Aplicaciones mensuales de agua y fertilizante en régimen ecológico

Fertirrigación ecológica	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	TOTAL
Agua (m3/ha)	150	150	250	400	500	500	400	150	2500
Bior ph 3,5 (l) enmienda orgánica en fertirrigación	10	10	10	10	10	10	10	10	80

1.5.3.4. Tratamientos fitosanitarios

En la plantación es necesario estar al tanto de las plagas y enfermedades de la zona porque deben realizarse tratamientos fitosanitarios preventivos, ya que una vez que el olivo es atacado no se recupera con facilidad.

Tabla 8. Tratamientos fitosanitarios realizados la campaña de 2009 al olivar convencional

Tratamientos convencional	Fecha	Productos	Dosis/100 l agua	Observaciones
Prefloral	2ª semana de mayo	Juvinal	30cc	Prays oleae, saisetia oleae (cochinilla)
		Cuproxat	400 cc	Repilo y tuberculosis
		Heliosufre	300 cc	Negrilla y acariosis
Semana 25 del año	3ª Semana de junio	Decis expert	10 cc	Prays oleae, glyfodes y barrenillo
		Flint	15 g	Repilo
Semana 34 del año	3ª Semana agosto	Decis expert	10 cc	Mosca (Bractocaea)
		Cuprosan Pro	400 g	Repilo
Semana 38 del año	3ª semana septiembre	Decis expert	10 cc	Mosca (Bractocaea)
		Flint	15 g	Repilo

La tabla anterior muestra de manera esquemática los tratamientos realizados a las variedades a excepción del ecológico.

Los tratamientos preventivos de diversas plagas y enfermedades deben ser elegidos cuidadosamente en el olivar ecológico, además de tratar con precaución las parcelas colindantes que se encuentren en régimen convencional.

Tabla 9. Tratamientos realizados en la campaña anterior al olivar ecológico

Tratamientos ecológico	Fecha	Producto	Dosis/100 l agua	Observaciones
Prefloral	2ª semana mayo	Fulmit (aceite parafínico)	1 l	Cochinilla
		Neem (extracto de árbol, azadiractina)	250 cc	Glyfodes y orugas defoliadoras (margaronia)
		Cuproxat (sulfato tribásico de cobre)	400 cc	Repilo y tuberculosis
		Dipel (Bacillus thuringensis)	50 g	Prays oleae
Semana 25 del año	3ª semana junio	Neem (extracto de árbol, azadiractina)	250 cc	Glyfodes, barrenillo (que es cuando aparece) y orugas defoliadoras (margaronia)
		Cuproxat (sulfato tribásico de cobre)	400 cc	Repilo y tuberculosis
		Dipel (Bacillus thuringensis)	50 g	Prays oleae
Semana 30 del año	4ª semana julio	Fulmit (aceite parafínico)	1 l	Cochinilla
		Neem (extracto de árbol, azadiractina)	250 cc	Glyfodes, barrenillo y orugas defoliadoras (Margaronia)
		Cuproxat (sulfato tribásico de cobre)	400 cc	Repilo y tuberculosis
Semana 34 del año	3ª semana agosto	Neem (extracto de árbol, azadiractina)	250 cc	Mosca
		Cuproxat (sulfato tribásico de cobre)	400 cc	Repilo y tuberculosis
Semana 38 del año	3ª semana septiembre	Neem (extracto de árbol, azadiractina)	250 cc	Mosca
		Cuproxat (sulfato tribásico de cobre)	400 cc	Repilo y tuberculosis

1.5.4. Condiciones de cosecha

La cosecha llega para cada variedad en diferente fecha, ya que está la producción planificada para que se elabore una sola variedad simultáneamente y por ello se han utilizado variedades que lleguen al punto óptimo de madurez en diferentes momentos.

Las fechas de cosecha de cada variedad están reflejadas anteriormente, pero para determinarlas hay que comenzar realizando pruebas del índice de madurez según se acercan las que se prevé que serán. Las pruebas consisten en lo siguiente (Barranco, 2008):

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

Siendo A, B, C, D, E, F, G, H, el número de frutos de las clases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, respectivamente, el índice de madurez se obtiene por la fórmula:

$$I.M.= \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7}{100}$$

Una vez que se realizan los análisis a las variedades más tempranas con tiempo, se comienza la cosecha cuando el valor es el que aparece previamente en la clasificación de las variedades.

La cosecha se realiza de forma mecanizada con la vendimiadora NEW HOLLAND VX7090:



Figura 11. Vendimiadora New Holland VX7090

El árbol pasa por completo debajo de la cosechadora y unas varillas vibrantes hacen que caiga la aceituna para ser recogida por cintas que la elevan hasta los depósitos laterales.

Cuando la vendimiadora está completa, ésta descarga sobre un remolque para que inmediatamente se lleven la aceituna a ser procesada. Como la finca rodea al trujal no pasa apenas tiempo.

La capacidad horaria de cosecha es de unos 3.000 kg, y al final de la jornada de cosecha, en la que la vendimiadora está operativa unas 15 horas, se consigue cosechar unas 35-40 t/día o 5-6 ha/día, dependiendo de la madurez de la siguiente aceituna en recolectar.

1.6. El proceso de elaboración

El proceso de la elaboración del aceite de oliva virgen extra de Artajo es el mismo en todas las variedades, exceptuando las posibles fluctuaciones de la temperatura y las pequeñas diferencias de tiempo que transcurre la materia prima en cada fase del proceso.

El punto crítico a la hora de elaborar un aceite de oliva de calidad es el tiempo que pasa desde que la aceituna es recolectada del árbol hasta que es procesada.

1.6.1. Tecnología del proceso

Los pasos que se siguen en el trujal para elaborar sus aceites vírgenes extras de la marca Artajo se resumen en el siguiente diagrama de flujo de tecnología del proceso (Figura 12).

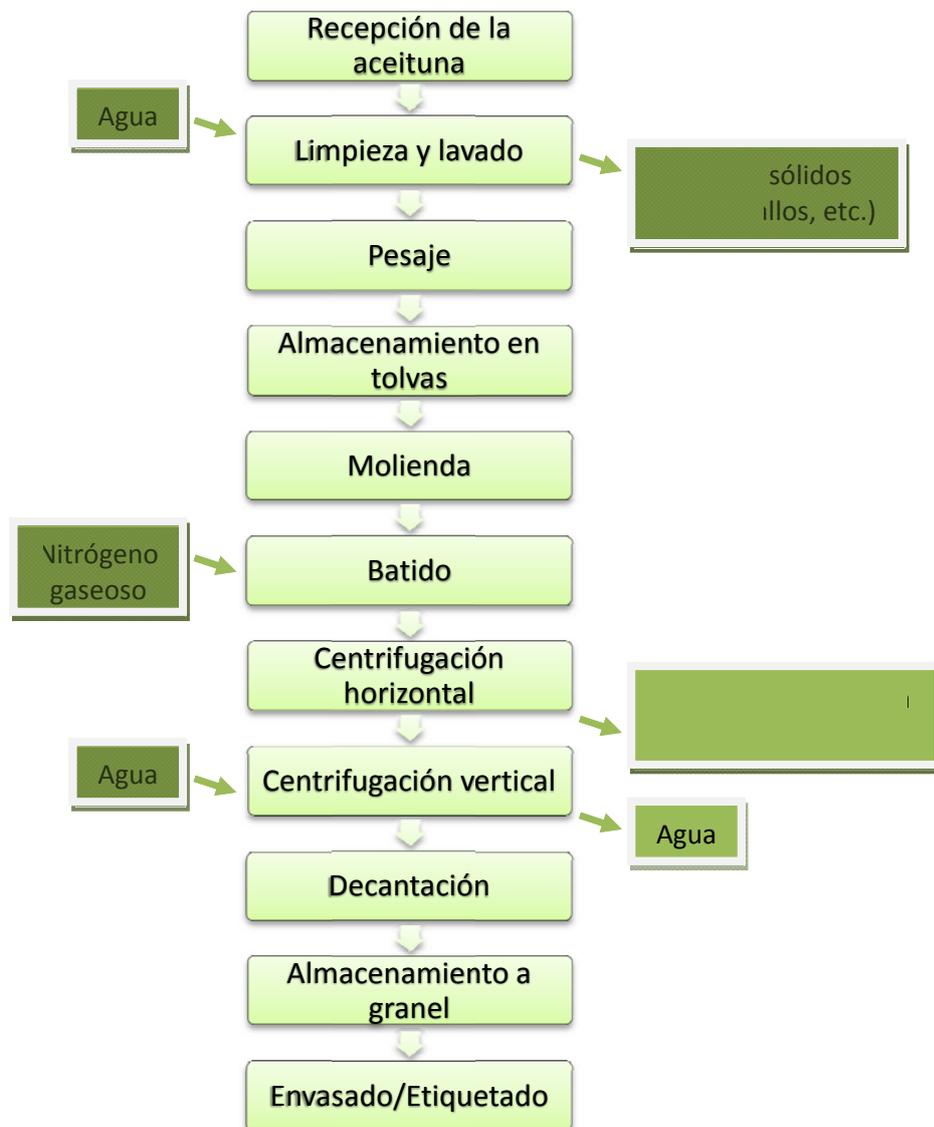


Figura 12. Diagrama de flujo de tecnología de la elaboración del aceite de oliva virgen extra Artajo

El proceso comienza cuando una variedad llega a su punto de madurez óptimo, entonces comienza la cosecha mecanizada de la aceituna con la cosechadora. Ésta va volcando las cargas de aceituna que recoge al remolque y cuando se llena, un tractor lleva el producto directamente al trujal.

La recepción se lleva a cabo en una tolva subterránea del patio del trujal donde los remolques que llegan vuelcan las aceitunas directamente y sin que pase más de una hora sin ser lavado. Así se consigue la calidad óptima de la aceituna al ser procesada, que es lo que va a condicionar que consigamos un aceite de calidad.

Una vez en la tolva subterránea de recepción, las aceitunas ascienden por una cinta transportadora a hacia la máquina limpiadora-lavadora-pesadora. El agua es recirculada para no derrochar pero se cambia con frecuencia para evitar estropear la aceituna.

Las pesadas se almacenan en el ordenador central para contabilizar lo que ha traído cada tractor y conocer así la cosecha real (solo aceituna).

Cada pesada, de 60 kilos, va saliendo de la máquina compacta de lavado, despallado y pesado por las cintas transportadoras hacia tres tolvas de almacenamiento, en las que no pasa mucho tiempo hasta su molturación.

La siguiente fase, la molienda, consiste en que de las tres tolvas vaya cayendo aceituna al molino que tritura el fruto para que por un sinfín pase a una batidora. El proceso de molturación de la aceituna tiene como finalidad romper las células del mesocarpio que contienen el aceite de la pulpa. A este proceso es necesario llegar en el menor tiempo posible para evitar el atrojado (fermentación), la principal causa de pérdida de calidad en los aceites.

El tornillo sinfín, atraviesa un tabique para llegar a otra sala que es la zona de extracción y la pasta llega a la batidora. Ésta la mantiene un tiempo determinado y a una temperatura, conseguida con una camisa de agua en las paredes de la batidora. Además en el trujal la batidora consta de tres cuerpos de eje horizontal de los que cae la pasta del de arriba al de abajo. La batidora sirve para agitar la pasta con un sistema de paletas con la finalidad de que las gotas de aceite se vayan uniendo hasta formar una fase oleosa y separarlo del agua. La calidad del aceite que se busca requiere 1h 15' en la batidora y una temperatura nunca superior a 27°C. Un aspecto importante que tiene lugar durante el batido es el sellado hermético de la batidora para aplicar nitrógeno de forma que se frene la oxidación.

Después del batido viene la separación de fases. Todo se realiza en un sistema continuo, en el que la masa se introduce en un cilindro horizontal que rota a velocidad

máxima. Debido a la diferencia de densidades se separa aceite, agua y orujo. Hay dos sistemas de extracción de fases; el de tres fases y el de dos. En el trujal se utiliza el segundo, y consiste en un circuito herméticamente cerrado en el que un decánter (centrifugación horizontal) separa el aceite de oliva y el alpeorujo (Restos de aceituna molturada una vez separado el aceite. Contiene partes sólidas y alpechines, que son líquidos residuales). No se adiciona casi agua porque el volumen de alpechín es insignificante. Se considera un sistema muy ecológico.

El aceite proveniente del decánter se limpia con una centrifugadora vertical con dos salidas previa adición de agua y así se obtiene el aceite de oliva sin decantar separado del agua.

De un depósito al que cae el aceite después de la centrifugación vertical, el aceite pasa a unos decantadores, ya que en el trujal no filtran el aceite para evitar pérdidas de aroma, y en éstos pasa unas horas hasta su paso a la bodega para que sea almacenado a granel. La sala de los depósitos se encuentra a una temperatura de 18°C, puesto que es la óptima para el aceite. Además, los depósitos se llenan con una parte de nitrógeno para evitar oxidaciones previas a la venta.

Cuando se realizan los pedidos importantes es envasado y etiquetado en sus diversos formatos y se guarda en el almacén de producto terminado a la espera de su distribución.

Un aspecto a considerar es que cuando se quiere extraer otro tipo diferente de aceite u otra variedad en el trujal limpian toda la maquinaria interiormente para que no se mezclen aceites de diferentes calidades o variedades.

En el edificio de producción hay dos zonas, una donde se procesa la aceituna y otra a partir de cuándo las aceitunas son molturadas, puesto que desde el molino pasan a otra sala donde tiene lugar el resto del proceso. Las dos zonas se encuentran informatizadas. En la primera parte desde el ordenador se controla a qué tolva va la aceituna y cuándo debe ser molida y en la segunda se extrae el aceite a partir de la pasta.

1.6.2. Ingeniería del proceso

Los equipos utilizados en el proceso de elaboración, en el orden en que son utilizados para la elaboración de aceite son los siguientes:

Tolva receptora de aceitunas: Llegan las aceitunas directamente del remolque. Es un cono construido en chapa de 3 mm reforzado con anillos perimetrales de chapa plegada de 3 mm. Está fabricada con cono individual. Diseñada para apertura con compuerta tajadera regulable neumática. Está empotrada en la obra.

Cintas transportadoras alimentarias: Son de plástico blanco y transportan las aceitunas desde la tolva de recepción hasta la máquina de limpieza, lavado, pesaje y despalillado. También son utilizadas para transportar la aceituna de la anterior máquina a las tolvas.

Máquina compacta de limpieza y lavado SAFI COM 20: Con esta máquina realizan con eficiencia las primeras fases del proceso. **Características:**

- Producción: 20/25.000 kg/h
- Peso: 4.200 kg
- Potencia: 23,6 CV
- Criba de rodillos equilibrados y auto-limpiables
- Molinete para separación de ramas
- Separación de hoja mediante turbinas de aire
- Recogedor de hoja con tolva
- Separación de fruto y piedra por diferencia de densidad
- Desalojo de piedra por transportador sinfín
- Sistema de lavado mediante cinta inversora
- Depósito de agua con una capacidad de 6.000 l, diseñado para la evacuación de agua y lodos por transportador sinfín
- Impulsión de agua mediante bomba sumergible
- Bandeja vibratoria para escurrido del fruto
- Despalilladora formada por 16 husillos helicoidales de nylon
- Escalera de acceso y pasillos en tramex galvanizado
- Fabricado íntegramente en acero inoxidable

Complemento de báscula para la máquina compacta SAFI COM 20: Es un módulo aplicado a la máquina compacta anterior con los que podemos realizar la función de pesado antes de enviar la aceituna a las tolvas. Es informatizado e incluye todo el equipo. **Características:**

- Producción: 7.000/8.000 kg/h
- Peso: 75 kg
- Chasis monoblock
- Bandeja receptora
- Tolva de pesaje
- Monitor LCD
- Terminal de pesaje y control
- Cuadro de maniobras para apertura y cierre de compuertas
- Repetidor de peso
- Programa de gestión de pesaje

- Programa de trazabilidad (cliente, calidad, variedad, término, paraje, finca matrícula, tolva de destino y aceituna lavada / no lavada)
- Fabricado íntegramente en acero inoxidable.

Tolvas de almacenamiento de aceituna: Hay tres, son de acero inoxidable y almacenan la aceituna durante corto tiempo. Una de ellas está conectada al molino directamente.

Molino de criba rotante de 50 CV Peralisi: Se trata de un molino de criba rotante con sentido de giro inverso a los martillos dotado de sistema de descarga continua y forzada de pasta. Molinos de martillo a 3.000 rpm. La producción máxima puede ser de hasta 7.000 kg/hora y de 168.000 kg/día.

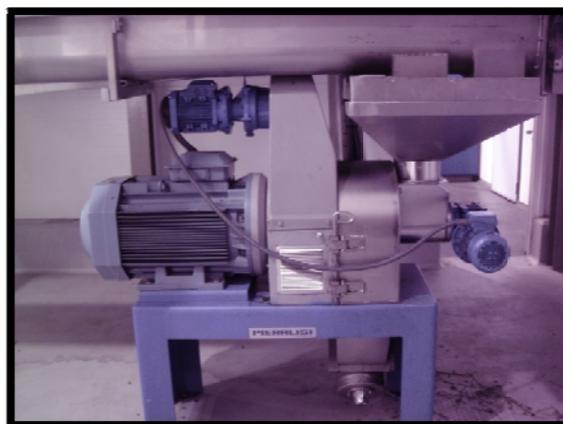


Ilustración 13. Molino de criba rotante 50 CV. Peralisi

Elevador sinfín de pasta desde el molino hacia la batidora: Es una tubería con un tornillo sinfín, por el que pasa la pasta molturada hasta el cuerpo superior de la batidora. En la foto anterior podemos observar cómo va hacia arriba para depositar la pasta en el cuerpo superior de la batidora que está en la otra zona de la fábrica.

Batidora de 3 cuerpos Peralisi 900: Con esta batidora se consigue que las gotas de aceite comiencen a juntarse. Se le pueden aplicar diferentes temperaturas a sus camisas de agua. Capacidad para 6.000 kg. Potencia de 7,5 CV y unas dimensiones de 1.580 x 3.430 x 3.240. Tiene sistema de carga automático y continuo y válvulas de salida controladas por ordenador. Está fabricada en acero inoxidable. Está sellada para incorporar nitrógeno desde una bombona.

Dos decanters pialisi SPI-111-S: La separación de fases se realiza en éstos, y además de ellos salen también los residuos. Su producción es de 2500 kg/hora de cada uno de ellos. El producto va por un circuito hermético que permite la separación de fases. La velocidad del tambor interior es de 3.500 rpm y tiene un diámetro de 353 mm.



Ilustración 14. Decánter Pieralisi SPI 111 S

Separador centrífugo vertical P-2000: Añade agua para limpiar el aceite y luego lo separa de esa agua. De este separador ya sale aceite (sin decantar). **Características:**

- Velocidad del tambor: 6.400 rpm
- Potencia instalada: 5,5 kW
- Diámetro del tambor: 316 mm.
- Arranque directo
- Peso del tambor: 127 kg
- Peso de la máquina: 830 kg



Ilustración 15. Centrifuga vertical Pieralisi

Depósitos de decantación: El aceite se mantiene un tiempo en estos decantadores porque hay proceso de filtración y deben caer las impurezas a la parte cónica inferior. Son de acero inoxidable. De estos, el aceite pasa a las bodegas del otro edificio.



Ilustración 16. Depósitos de decantación

1.6.3. Comercialización

Los aceites analizados en este estudio son comercializados todos bajo la misma marca, Artajo, en formatos de 250 ml (Figura 17) y de 500 ml. Se presentan todas las variedades en la misma botella y se distinguen unas de otras por el color de la cápsula superior de metal y de la etiqueta.



Figura 17. Formato de comercialización en botellas de 250 ml de los aceites estudiados. De izquierda a derecha: Arbequina, Manzanilla Cacereña, Koroneiki, Arbosana, Arróniz.

Aunque los aceites analizados sean seis, en la imagen aparecen cinco porque el primero de ellos se comercializa en el mismo formato ya sea ecológico o no, pero si se trata del aceite virgen extra ecológico Artajo, la botella lleva el siguiente sello:



Figura 18. Logotipo del CPAEN-NNPEK. Consejo de la producción agraria ecológica de Navarra

1.7. Significado de los parámetros químicos a analizar

Es necesario en este estudio, describir uno a uno cada parámetro que se ha analizado para darle sentido a todo lo que se ha hecho y para encontrar el porqué de cada uno de esos análisis.

El reglamento que tomamos como referencia es el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis y posteriores modificaciones, en el cual se basan todos los procedimientos para la determinación de los distintos parámetros analizados en las muestras. Se han llevado a cabo todos los análisis de este reglamento para tener una referencia base, aunque algunos de los parámetros sirvan principalmente para detectar la adulteración de los aceites de oliva vírgenes, pero así autentificamos la pureza de cada aceite.

1.7.1. Grado de acidez

Los lípidos contenidos en la aceituna y que, después componen el aceite de oliva virgen son alterados por dos procesos principalmente; uno es la rancidez oxidativa u oxidación y el otro es la **rancidez hidrolítica o lipólisis**. Éste último es el que produce la liberación de los ácidos grasos de los glicéridos y comienza cuando el aceite está en el fruto. La aceituna sana y en estado de madurez óptimo tiene una acidez muy baja, pero una vez recolectada los ácidos grasos libres van en aumento.

La hidrólisis de los triglicéridos del aceite de oliva está causada por las enzimas lipasas que contienen algunos microorganismos junto con el agua que contienen las aceitunas y con la humedad del medio. Se produce durante el almacenamiento de la aceituna y por esta razón es imprescindible procesar el fruto lo más rápidamente que permita la industria.

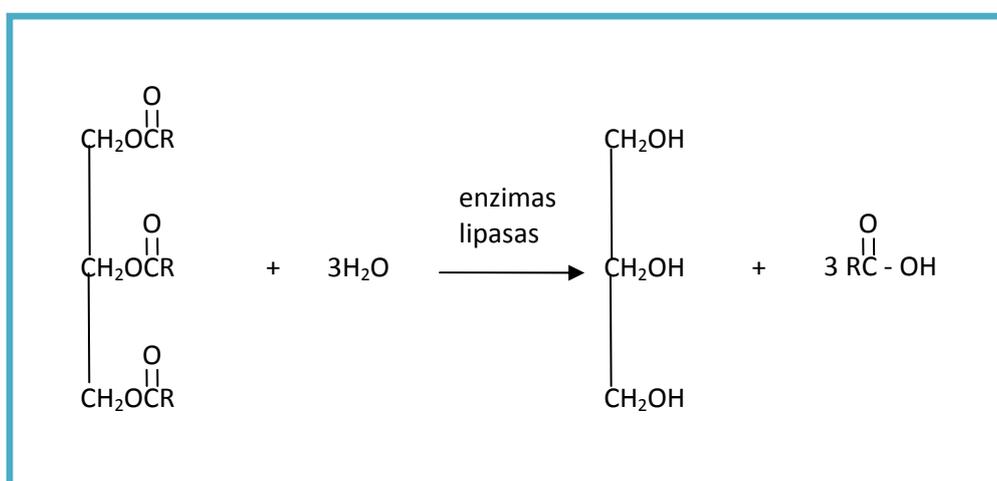


Figura 19. Hidrólisis enzimática de un triglicérido

Así pues, la acidez es un indicador de posibles alteraciones sufridas en el almacenamiento y en el proceso de elaboración, aunque un mal manejo del cultivo también puede ocasionar aumentos de la acidez. Se podría decir que la acidez determina la calidad del aceite en cierto modo, ya que es el principal factor que separa entre sí las categorías de aceite de oliva virgen extra y virgen, además nuestras papilas gustativas son muy sensibles a los ácidos grasos libres y sólo es necesaria una pequeña cantidad para estropear el sabor del aceite de oliva virgen.

La acidez se expresa en porcentaje de ácido oleico libre, que es el más abundante, y se determina según norma UNE 55.011 y según el Anexo II del Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, en lo que nos hemos basado para el análisis realizado. El valor de la acidez es el primer criterio de clasificación en los aceites de oliva (Tabla 10.a.).

Con respecto a la comparación de variedades basándonos en la acidez hay que decir que es un factor agronómico extrínseco, o lo que es lo mismo, que varía según las prácticas culturales, la recolección y el transporte del fruto a la almazara y esto significa que no es un parámetro que se pueda atribuir a la variedad, pero es necesario analizarlo para comprobar si ha habido diferencias entre los procesos de los aceites y porque la cantidad de agua del mesocarpo de las aceitunas sí que está relacionada con la variedad y este factor

1.7.2. Índice de peróxidos

La rancidez oxidativa u oxidación de los lípidos es un proceso que altera la materia grasa desde que comienza el almacenamiento y el proceso de elaboración de la aceituna. Esta oxidación lipídica conduce a la formación de compuestos incomedibles y tóxicos, lo que es inaceptable desde el punto de vista nutricional (Sanders, 1983).

Cuando los lípidos se oxidan forman hidroperóxidos y muchos sistemas catalíticos incluyendo la luz, la temperatura, los enzimas, los metales (Fe, Cu), las metaloproteínas, los pigmentos y los microorganismos pueden acelerar esta reacción. La mayor parte de éstas reacciones necesita de algún tipo de radical libre y/o especie oxigenada. La oxidación se puede producir tanto en la oscuridad (autooxidación) como en presencia de luz.

El aceite de oliva se considera resistente en cierta medida a la oxidación debido a su bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (a mayor número de dobles enlaces más fácil es la oxidación) y por la presencia de antioxidantes naturales tales como el α -tocoferol y los compuestos fenólicos, hidroxitirosoles, tirosol, ácido cafeico y otros (Tsimidou, Papadopoulos y Borkou 1992). Sin embargo, es susceptible de oxidarse y

muchos de los cambios indeseables en el aceite se pueden atribuir a procesos oxidativos. La principal causa es la presencia de oxígeno.

El deterioro oxidativo del aceite de oliva puede seguir rutas enzimáticas o químicas:

- Las enzimáticas siguen un proceso llamado cascada de los ácidos grasos poliinsaturados (Figura 20) y son necesarias una serie de acciones enzimáticas. La cascada comienza a actuar en el momento en que se produce cualquier daño al tejido del fruto, por lo que esta ruta está actuando durante el proceso de elaboración del aceite, además las enzimas provienen de la propia aceituna y de los microorganismos. Los compuestos que se producen dan lugar a sabores y olores desagradables (olor a rancio).

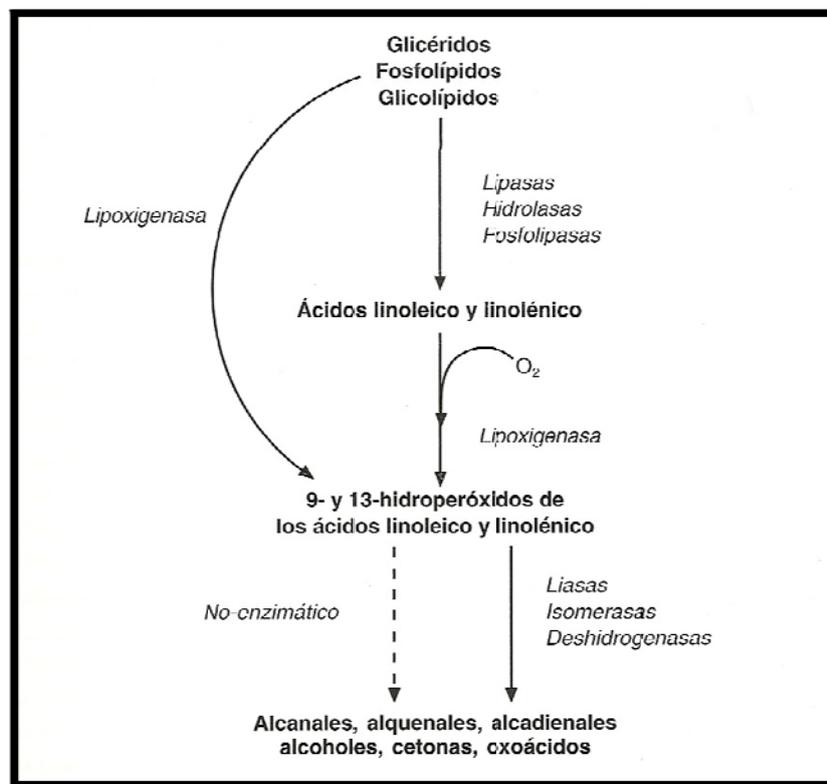


Figura 20. Oxidación enzimática de los ácidos grasos insaturados. (Aparicio, Harwood 2003)

- Las rutas químicas son la autooxidación de los lípidos y la oxidación fotosensibilizada:
 - ✓ En la autooxidación están involucrados muchos radicales libres y especies oxigenadas. Los sustratos de estas reacciones son los ácidos grasos insaturados y el oxígeno. El mecanismo de radicales libres de la oxidación de los lípidos se describe en un proceso de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Ingold, 1969). En la iniciación los radicales se forman directamente a partir de componentes lipídicos (a

partir de temperatura, luz y otros radicales o metales como iniciadores), en la propagación se forman los hidroperóxidos pero no son estables y se descomponen para producir compuestos no volátiles y volátiles. Entre estos productos también hay radicales, que estimulan la oxidación. La fase de la terminación comprende el agotamiento de los radicales libres reaccionando éstos entre sí.

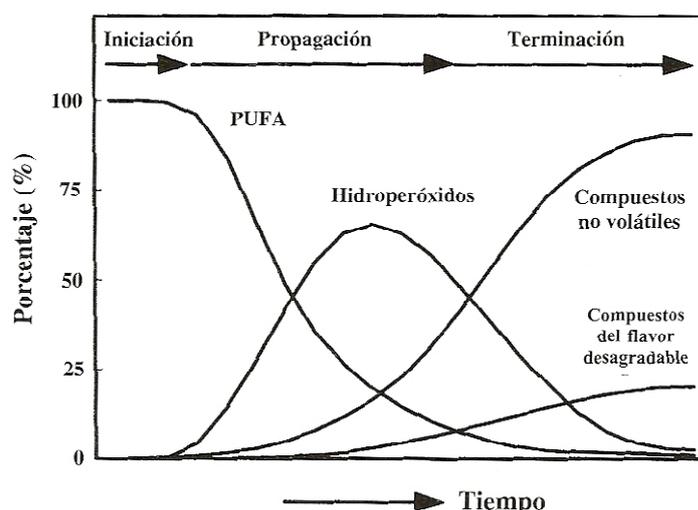


Figura 21. Oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y formación de productos primarios (hidroperóxidos) y secundarios (compuestos no volátiles y volátiles responsables del flavor desagradable) (Aparicio y Harwood, 2003)

- ✓ Otra ruta química es la oxidación fotosensibilizada, que se considera el factor más perjudicial para la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales. El aceite de oliva contiene fotosensibilizadores naturales que se activan cuando el aceite es expuesto a la luz durante su distribución comercial (Carlsson, Suprunchuk y Wiles, 1976). Ésta exposición a la luz produce hidroperóxidos cuando están presentes el oxígeno y el fotosensibilizador. Este proceso se inicia y propaga mediante las reacciones de los radicales libres y se forman isómeros similares a los hidroperóxidos formados en la autooxidación en ausencia de luz (Bradley y Min, 1992).

Para caracterizar cuán oxidados están los aceites hay varios parámetros relacionados. El índice de peróxidos es un parámetro con el cual tenemos un dato sobre hidroperóxidos o epiperóxidos y detecta la oxidación incipiente, antes de que se hayan formado carbonilos, y por tanto, antes de que haya manifestación de malos olores y sabores. Se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite y se determina según norma UNE 55.023 y según el Anexo III del Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. El índice de peróxidos también da una

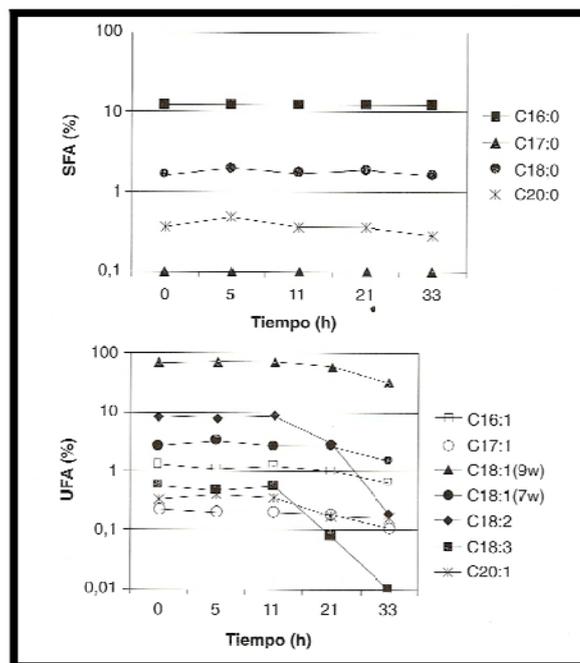
información sobre las alteraciones en tocoferoles y polifenoles, que son los antioxidantes naturales del aceite de oliva virgen.

La información completa sobre el estado de oxidación se adquiere con la determinación de los parámetros K_{232} , K_{270} y ΔK .

En las variedades estudiadas las diferencias pueden venir dadas por la cantidad de agua de la aceituna, que es variable según la variedad de olivo y también se pueden encontrar diferencias relacionadas con la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, ya que las variedades con los niveles más altos deberían ser más sensibles a la oxidación y por tanto, dar un nivel de peróxidos mayor.

1.7.3. K_{270} , K_{232} , ΔK

Los ácidos grasos poliinsaturados son sensibles a las autooxidaciones por radicales libres (Figura 22), induciendo la extensión de este proceso a otros ácidos grasos. Los productos primarios de la oxidación son, como se comenta anteriormente, los hidroperóxidos, poco estables y que absorben a una longitud de onda de 232 nm. Los siguientes productos que se forman después de los hidroperóxidos son las diacetonas y las cetonas alfa-insaturadas. Como éstas absorben cerca de los 270 nm, podremos detectarlas. También pueden formarse otras funciones oxigenadas, hidróxidos y carbonilos, que incrementan la absorbancia de la radiación UV entre 260 y 280 nm, con un máximo alrededor de los 270 nm. Esto último se calcula con la ΔK .



NOTA: SFA, ácidos grasos saturados; UFA, ácidos grasos insaturados

Figura 22. Cambios de los ácidos grasos saturados e insaturados (%) durante el proceso de deterioro oxidativo del aceite de oliva virgen (Aparicio y Harwood en 2003)

Para determinar el grado de oxidación se calcula el coeficiente de extinción específica (K), que aumenta conforme la alteración oxidativa es mayor, hasta fases muy avanzadas. Por esto complementa la información obtenida con el índice de peróxidos. Los valores entre los que debe estar cada tipo de aceite se reflejan en la Tabla 10. El método de hallar la K_{232} , la K_{270} y la ΔK es mediante un espectrofotómetro que lea las absorbancias, a través de una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso, a 232 nm, 266 nm, 270 nm y a 274 nm. Se determinan según el Anexo IX del Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

En cuanto a variedades, con estos valores, podemos distinguir cuáles son las que están en peores niveles de conservación, ya que con el coeficiente de extinción específica se pueden detectar niveles de oxidación más allá de los productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) y determinar así las diferencias en la estabilidad según la variedad.

1.7.4. Humedad y materias volátiles

Mide la presencia de productos que deben de eliminarse en casi su totalidad a lo largo de un correcto proceso de elaboración. La cantidad que se admite de estos compuestos es de hasta el 0,2 %.

Es importante controlar el proceso de elaboración para que no quede humedad en el aceite ya que, contribuye a acelerar la oxidación del mismo.

Se determina según norma UNE 55020.

1.7.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo

Indica la presencia de tierra, sustancias minerales, resinas, ácidos grasos oxidados, jabones alcalinos de los ácidos palmítico y esteárico, materias nitrogenadas, etc. Se analiza según norma UNE 55002, admitiéndose hasta 0,1% para aceites de oliva vírgenes.

El método se basa en filtrar el aceite de oliva con ayuda de éter de petróleo hasta que no queda nada de aceite en el filtro y únicamente quedan las impurezas insolubles. Pesando el filtro obtendremos la cantidad de las mismas.

Las impurezas excesivas pueden suponer un peligro para la conservación del aceite que puede tomar, durante ese periodo, malos olores y sabores potenciados por otros procesos de alteración. La variabilidad de los resultados puede deberse, principalmente, al proceso de elaboración.

1.7.6. Ceras

Las ceras son ésteres de los ácidos grasos y alcoholes grasos. Las principales ceras que se encuentran en el aceite de oliva son los ésteres C36, C38, C40, C42, C44 y C46.

Su presencia en el aceite de oliva virgen se debe a distintos factores, como puede ser que en la molienda, las ceras que recubren al fruto como capa protectora, pasen a formar parte de la pasta. También pueden aparecer en el aceite como resultado del aumento de la temperatura en el proceso de batido. Hay autores que han demostrado un aumento del contenido en ceras durante el almacenamiento y otros afirman que se produce un aumento de las ceras cuando se realizan varios procesos de centrifugación consecutivos (Alba *et al.*, 1996).

El análisis de ceras es de interés ya que su contenido varía según las categorías del aceite de oliva (Tabla 10.a.) y la información sobre su presencia puede ser usada como parámetro de calidad y pureza.

Los aceites vírgenes deben dar mayor contenido de C36 y C38, que de C40, C42, C44 y C46. Las ceras se determinan, previo fraccionamiento del aceite al que se le ha añadido un patrón interno adecuado (araquidato de laurilo), mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado. Se recupera la fracción eluida y a continuación se emplea el análisis directo por cromatografía de gases con columna capilar e inyección en columna fría.

El método para determinar el contenido de ceras es el que aparece en el Anexo IV del Reglamento (CEE) nº 183/93 que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Las diferencias en el contenido de ceras de los aceites analizados puede ser consecuencia del método de elaboración y del tiempo que lleven almacenados, ya que los aceites se producen en el orden de maduración de cada variedad.

1.7.7. Estigmastadieno

El análisis del hidrocarburo estigmasta-3,5-dieno ha sido propuesto como método para detectar la presencia de aceites refinados en el aceite de oliva virgen. El estigmastadieno se forma al eliminarse una molécula de agua del β -sitosterol, lo que se produce en la refinación durante la decoloración.

El método para determinar el estigmastadieno aparece en el Reglamento (CEE) nº 183/93 que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

1.7.8. Monopalmitato de 2-glicerilo

Con la evaluación de este compuesto se determina el porcentaje de ácido palmítico en posición 2 de los triglicéridos. Es un método que únicamente nos proporciona información sobre la presencia de aceites obtenidos por esterificación, ya que naturalmente el ácido esteárico esterifica con mayor proporción en posición 1 y 3. En la posición beta o 2, es más frecuente que se encuentren los ácidos insaturados oleico y linoleico.

El análisis del monopalmitato de 2-glicerilo se determina mediante el anexo VII que está en el Reglamento (CE) nº 702/2007 que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, y está incorporado a este reglamento con la modificación mencionada en el año 2007, ya que antes se determinaba el parámetro “ácidos grasos saturados en posición beta de los triglicéridos”.

1.7.9. Composición de los ácidos grasos

El conocimiento de la composición en ácidos grasos del aceite de oliva, tanto cualitativa como cuantitativamente, ha sido siempre un tema de gran interés debido a que son los componentes fundamentales y mayoritarios del aceite de oliva virgen.

Normalmente, los ácidos grasos se encuentran formando ésteres, habitualmente con la glicerina, para dar lugar a los glicéridos (mono, di y triacilgliceroles) y fosfátidos. Se encuentran también como ácidos grasos libres pero en una cantidad muy pequeña. A veces pueden formar ésteres con alcoholes grasos de estructura lineal (ceras) o terpénica (ésteres de terpenos y ésteres de esteroides).

Para el análisis de los ácidos grasos es necesario derivatizarlos formando ésteres metílicos antes de proceder con la cromatografía de gases en columna capilar, porque así son más fáciles de eluir. La reacción de interesterificación se lleva a cabo en medio metanólico con hidróxido potásico en ausencia de calor, y es la siguiente:

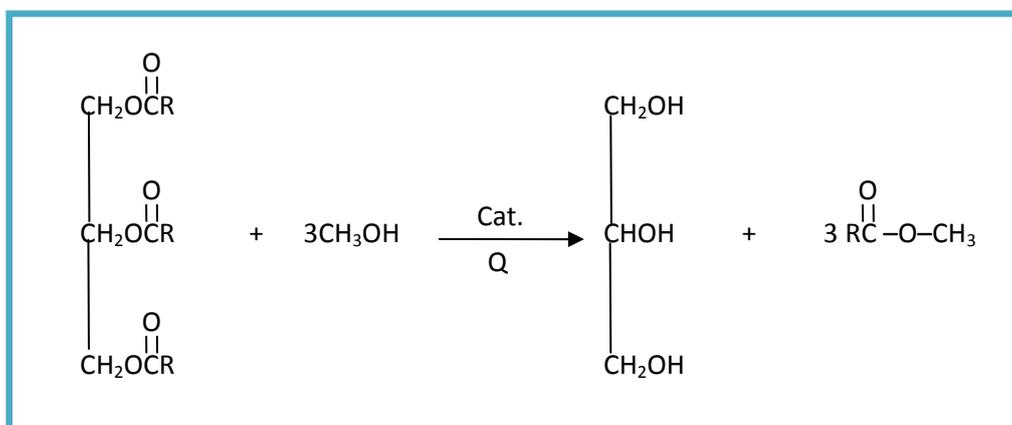


Figura 23. Reacción de interesterificación

En cuanto a la composición en ácidos grasos de aceites de oliva virgen extra, hay estudios realizados que muestran amplios márgenes de variabilidad, lo que se considera relacionado con factores genéticos y ambientales en el desarrollo de estos frutos (Kiritsakis, 1992). Ya que los factores ambientales, como se ha dicho previamente, son muy parecidos, podríamos atribuir las diferencias a los primeros, es decir, al cultivar. Otros autores indican igualmente al estudiar la composición ácida del aceite de oliva procedente de diferentes campañas, épocas de recolección y variedades, que el contenido graso tiene una fuerte componente varietal, atribuyendo a este factor más del 70 % de la variabilidad encontrada, en especial si se tienen en cuenta las variaciones porcentuales del contenido en ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Uceda *et al*, 1998).

El análisis de la composición de los ácidos grasos permite también, controlar posibles alteraciones del aceite de oliva virgen, puesto que los aceites de oliva vírgenes aseguran una cantidad suficiente de insaturados, especialmente monoinsaturados (oleico) con todas sus connotaciones beneficiosas para corregir riesgo de enfermedades cardiovasculares y a la vez presentan la insaturación idónea para elaboración de alimentos a alta temperatura sin deteriorarse (Hidalgo, 1993).

El perfil de los ácidos grasos es un parámetro que se ha utilizado múltiples veces para caracterizar aceites de oliva monovarietales así que en este estudio es el parámetro más importante a analizar, porque es lo que más va a diferenciar a unas variedades de otras, que es el objetivo general de todo el estudio. Los ácidos grasos que nos vamos a encontrar en el aceite analizado son; el ácido mirístico (C14:0), el ácido palmítico (C16:0), el ácido palmitoleico (C16:1), el ácido margárico (C17:0), el ácido margaroleico (C17:1), el ácido esteárico (C18:0), en mayor proporción el ácido oleico (C18:1), el ácido linoleico (C18:2), el ácido linolénico (C18:3), el ácido araquídico (C20:0), el ácido gadoleico (C20:1), el ácido behénico (C22:0) y el ácido lignocérico (C24:0).

Para su determinación se han seguido los métodos que detallan los Anexos X "A" y X "B" del Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

1.7.10. Diferencia ECN42 real y teórico

El ECN42 se define como el contenido de triglicéridos con número equivalente de carbonos 42. Éste puede ser calculado teóricamente a partir de la composición de los ácidos grasos y también se calcula experimentalmente por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

A partir de la diferencia entre el ECN42 real y el calculado teóricamente se pueden detectar aceites de semillas en el aceite de oliva porque ambos se

corresponden, dentro de ciertos límites, en el aceite de oliva virgen. También, a partir del HPLC realizado en esta prueba, se puede determinar la composición de los triglicéridos que contienen los aceites estudiados.

La variedad oleícola y la latitud no parecen afectar al ECN42, pero en cambio sí que afectan a los niveles de trilinoleína (León-Camacho, 1998), un triglicérido con tres ácidos linoleicos, poliinsaturados, que está en baja proporción en el aceite de oliva virgen, pero que es muy importante desde el punto de vista nutricional. Podemos analizar la concentración de trilinoleína en el HPLC.

El ECN real analizado por HPLC es la suma de los porcentajes de las áreas de los picos de los triglicéridos LLL, OLnL + PoLL y PLnL. La diferencia entre el ECN42 real y el teórico se expresa en % en moles, y se calcula según el Reglamento (CE) nº 2472/97 que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

1.7.11. Composición de los esteroles y eritrodiol + uvaol

Los principales esteroles del aceite de oliva son β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol y campesterol. Otros esteroles presentes, aunque en menores cantidades, son el estigmasterol, colesterol, 24-metilcolesterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, sitostanol, $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol, Δ^7 -estigmastenol y Δ^7 -avenasterol (Boskou y Morton, 1975; Boskou, 1978; Fedeli, 1977; Itoh *et al.*, 1981). El eritrodiol, entendido corrientemente como conjunto de los dioles eritrodiol y uvaol, es un componente insaponificable característico de algunos aceites.

El conocimiento del perfil de esteroles y el análisis del eritrodiol + uvaol se ha utilizado para detectar posibles mezclas fraudulentas de grasas de menor valor que el aceite de oliva, pero también se ha utilizado como un parámetro para caracterizar a los aceites de oliva monovarietales. Además se ha observado que el perfil de esteroles varía atendiendo a distintos factores como los agronómicos (clima, suelo, agua), la recolección (cultivar, madurez), factores tecnológicos (conservación del fruto o del aceite, sistemas de extracción), factores geográficos (altura, longitud) y a los procesos industriales.

Muchos de los esteroles presentan valores característicos según la variedad de aceituna de la que procede el aceite (Paganuzzi, 1987; Aparicio, Morales y Alonso, 1997). Razón por la que serán estudiados para poder encontrar diferencias significativas, sabiendo que los factores antes mencionados son muy parecidos en los aceites analizados al estar en una misma finca de una extensión limitada.

Para la determinación de estos compuestos mediante cromatografía de gases se ha seguido el método que aparece en los anexos V y VI del Reglamento (CEE) 2568/91.

1.7.12. Valores límite de los parámetros analizados para el aceite de oliva virgen extra

Tabla 10.a. Clasificación de los aceites según parámetros químicos. Reglamento (CE) nº 702/2007 de la comisión de 21 de junio de 2007 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

Categoría	Acidez (%)	Índice de Peróxidos mEq O ₂ /kg	Ceras mg/kg	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmas-Tadieno mg/kg	Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (teórico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total >14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total >14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
3. Aceite de oliva lampante	> 2,0	-	≤ 300	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total >14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	-	-	-
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total >14 %	-	≤ 0,3	-	≤ 1,10	≤ 0,16
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total >14 %	-	≤ 0,3	-	≤ 0,90	≤ 0,15
6. Aceite de orujo de oliva bruto	-	-	> 350	≤ 1,4	-	≤ 0,6	-	-	-
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	-	≤ 0,5	-	≤ 2,00	≤ 0,20
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	-	≤ 0,5	-	≤ 1,70	≤ 0,18

Tabla 10.b. Clasificación de los aceites según parámetros químicos. Reglamento (CE) nº 702/2007 de la comisión de 21 de junio de 2007 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

Categoría	Contenido de ácidos ⁽¹⁾						Suma de los isómeros trans-oleicos (%)	Sumas de isómeros translinoleicos + translinolénicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%)
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)	Delta-7-estigmasterol (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5

⁽¹⁾ Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,5-20,0; palmitoleico: 0,3-3,5; heptadecanoico: ≤ 0,3; esteárico: 0,5-5,0; oleico: 55,0-83,0; linoleico: 3,5-21,0.

1.8. La cata o análisis sensorial

La sensación que causa el aceite de oliva en el paladar del consumidor no puede ser valorada a través de ensayos químicos o físico-químicos, aunque se ha intentado. Los sentidos detectan, en muchos casos niveles muy bajos de ciertos productos, a menores concentraciones que los métodos analíticos y, aprecian como agradables o desagradables, el conjunto de los innumerables productos que constituyen el aroma. A la vez, la sensación que producen en el paladar puede estar adquirida por el olor.

Por estas razones se recurre a los análisis sensoriales, sometiendo la muestra a expertos catadores, en condiciones tipificadas. El juicio de cada uno tiene una alta componente de subjetividad, pero a más catadores, los resultados se objetivan.

Cuando se realiza una cata, el jefe del panel, a través de un programa estadístico, calculará la mediana del frutado y la mediana de los defectos tal y como indica el Reglamento (CE) nº 640/2008.

2. Objetivos

2. Objetivos

El presente estudio tiene como objetivo principal la comparación y diferenciación de aceites de oliva vírgenes extra procedentes de distintas variedades. Ésta diferenciación se va a llevar a cabo desde dos puntos de vista diferentes, como son el análisis químico de diversos parámetros (enumerados antes) y el análisis sensorial en cata profesional de cada uno de los aceites.

Hay que destacar que todos los aceites estudiados son de la misma finca, están bajo el mismo clima, son irrigados con la misma cantidad de agua y los tratamientos fitosanitarios realizados a todas las variedades de olivar, a excepción del ecológico, son los mismos. Por estas razones las diferencias pretenden ser atribuidas a la variedad de olivar.

Como otros objetivos específicos que surgen del desarrollo del anterior encontramos:

- **Objetivo 1:** Observar las diferencias que tienen entre sí dos aceites de la misma variedad (Arbequina) cuando uno es ecológico y el otro no lo es. Esto nos serviría para ver la influencia del cultivo ecológico del olivar y para determinar la incidencia que tienen los tratamientos fitosanitarios en el aceite.
- **Objetivo 2:** Caracterizar cada tipo de aceite a través de los diferentes análisis en aspectos como capacidad de conservación del aceite, combinación con diferentes alimentos según atributos organolépticos y calidad nutricional de cada uno.

Se valorará si las diferencias son lo suficientemente significativas para determinar si vienen dadas por la variedad.

3. Diseño experimental

3. Diseño experimental

Todos los aceites se van a estudiar desde el análisis químico y el análisis sensorial. La forma de llevar a cabo estos análisis es la siguiente:

3.1. Análisis químico

Se van a analizar químicamente los siguientes aceites de oliva vírgenes extra según el Reglamento (CE) Nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis y sus posteriores modificaciones:

- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbequina convencional
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Manzanilla cacereña
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Koroneiki
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbequina ecológico
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arróniz
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbosana

Cada uno de los aceites anteriores será analizado de los siguientes parámetros por triplicado estudiando los datos estadísticamente:

- o Grado de acidez
- o Índice de peróxidos
- o K_{270}
- o K_{232}
- o ΔK
- o Humedad y materias volátiles
- o Impurezas insolubles en éter de petróleo
- o Composición de los ácidos grasos
- o Composición de los esteroides

Los siguientes parámetros se determinarán de manera simple para seguir con el reglamento en el que se basan los análisis, pero como no son determinantes para caracterizar los aceites por la variedad pues no se profundizará en ellos:

- o Ceras
- o Estigmastadieno
- o Monopalmitato de 2-glicerilo
- o Diferencia ECN42 real y teórico

3.2. Análisis sensorial

En lo que respecta al análisis sensorial el diseño experimental consiste en catarlos, desde un panel de cata profesional, compuesto por 16 catadores, en el que todos y cada uno de ellos realiza un análisis de cada uno de los seis aceites de las diferentes variedades y lo plasma en la ficha oficial de cata del aceite de oliva virgen.

Esta ficha aparece en el Reglamento (CE) N° 640/2008 de la comisión de 4 de julio de 2008, que modifica el Reglamento (CE) N° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

A parte de la valoración de la ficha oficial se realizará un análisis descriptivo de las notas y aromas que contienen los aceites para caracterizarlos organolépticamente.

4. Materiales y métodos

4. Materiales y métodos

4.1. Material base

4.2. Análisis químico

- 4.2.1. Grado de acidez
- 4.2.2. Índice de peróxidos
- 4.2.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK)
- 4.2.4. Humedad y materias volátiles
- 4.2.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo
- 4.2.6. Contenido de ceras mediante cromatografía de gases
- 4.2.7. Determinación de estigmastadienos
- 4.2.8. Monopalmitato de 2-glicerilo
- 4.2.9. Composición de ácidos grasos
- 4.2.10. Contenido de triglicéridos con ECN 42 (Diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC)
- 4.2.11. Composición de esteroides

4.3. Análisis sensorial

4.4. Método de análisis estadístico

4.1. Material base

El aceite de oliva virgen extra de Artajo es el material base a analizar en todos las pruebas de este ensayo. Tiene seis variantes diferentes y en la Figura 24 se reflejan las botellas recogidas de cada depósito de aceite para realizar los análisis químicos en el laboratorio.



Figura 24. Aceites a analizar después de dar entrada en el laboratorio

Los aceites analizados se denominan de la siguiente manera, en orden de entrada de muestras al laboratorio:

- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbequina (D.O.P. Aceite de Navarra)
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Manzanilla Cacereña
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Koroneiki
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbequina ecológico (D.O.P. Aceite de Navarra)
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arróniz (D.O.P. Aceite de Navarra)
- Aceite de oliva virgen extra Artajo Arbosana

El aceite de oliva virgen extra Artajo en sus diferentes variedades se encuentra en depósitos de acero inoxidable, de los que se recogieron y embotellaron las muestras justo antes de ser analizadas. La muestra consiste en dos botellas de cada aceite monovarietal de 0,5 l, aunque se considera como un total de 1 l.

4.2. Análisis químicos

Los ensayos realizados a los distintos aceites de oliva vírgenes extra monovarietales se han llevado a cabo en el laboratorio de FOOD CONTROL SERVICE S.L. situado en el polígono industrial Las Labradas, vial País Vasco, Tudela (Navarra).

Para estudiar los diferentes parámetros estadísticamente los análisis más relevantes se han realizado por triplicado. Esto se ha llevado a cabo en el grado de acidez, el índice de peróxidos, la prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} y ΔK), la humedad y materias volátiles, impurezas insolubles en éter de petróleo, composición de ácidos grasos y en la composición en esteroides.

En cuanto a los parámetros de contenido en ceras, estigmastadieno, monopalmitato de 2-glicerilo, el número total de esteroides y el contenido en eritrodioleína + uvaol, se ha considerado que no suponen un identificador entre variedades, pero se han realizado análisis simples para seguir el guión marcado por el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

4.2.1. Grado de acidez

El método de análisis se basa en la disolución de la muestra en una mezcla de disolventes para la posterior valoración de los ácidos grasos libres mediante solución etanólica de hidróxido potásico utilizando fenolftaleína.

○ **Materiales**

- Balanza analítica 0,001 g de precisión.
- Matraces Erlenmeyer 250 ml.
- Embudo de cristal.
- Papel de filtro.
- Bureta 10 ml.
- Pipetas pasteur.
- Solución etanólica valorada de hidróxido potásico 0,1 N.
- Solución etanólica valorada de hidróxido potásico 0,0184 N.
- Mezcla de éter dietílico y etanol (96%) 1:1.
- Solución etanólica de fenolftaleína al 1%.
- Sulfato sódico anhidro.

○ **Método**

1. Homogeneizar la muestra con suave agitación.

2. Pesar en Erlenmeyer de 250 ml una cantidad de muestra según el grado de acidez previsto y anotar el peso exacto de cada muestra:

Tabla 11. Cantidad de muestra y precisión necesarias según la acidez prevista

º Acidez previsto	Peso de la muestra (g)	Precisión en pesada
< 1	De 10 a 20	0,05
1 a 4	De 2,5 a 10	0,02
4 a 15	De 0,5 a 2,5	0,01
15 a 75	De 0,1 a 0,5	0,001
> 75	0,1	0,001

3. Neutralizar la mezcla de disolventes en presencia de fenolftaleína con hidróxido potásico 0,1 N hasta débil coloración rosa.
4. Añadir la mezcla de disolventes previamente neutralizada. Disolver mediante agitación.
5. Rellenar la bureta de 10 ml hasta enrasar.
6. Valorar, agitando continuamente, con el hidróxido potásico 0,1 N poco a poco hasta que una gota produzca viraje débil. Será rosa anaranjado por el color del aceite y deberá permanecer 10”.
7. El volumen de KOH gastado deberá estar entre 1 y 10 ml, pero como la acidez es muy baja y gasta menos de 1 ml hay que preparar KOH menos concentrado (sobre 0,02 N). Para ello se vierte en un matraz aforado de 250 ml, 50 ml de KOH 0,1 N y se completa con alcohol 96º hasta enrase. Hay que realizar un contraste con ftalato ácido de potasio para determinar la normalidad del KOH exacta:
 - a. Se pesa el ftalato ácido de potasio exacto (entre 0,04 y 0,05 g) reactivo de análisis y seco.
 - b. Se añaden 50 ml de H₂O recién hervida y fría y unas gotas de fenolftaleína.
 - c. Desde la bureta enrasada, se echa la solución potásica hasta aparición de un rosa débil que persista más de 30” agitando.
 - d. Así la normalidad de la solución alcalina de KOH se calcula:

$$N = \frac{P}{V \times 0,20423}$$
 P = Peso, en gramos, del ftalato ácido de potasio
 V = Volumen, en ml, de solución de KOH gastada
 - e. Realizar el contraste por triplicado
8. Volver a valorar la muestra con el hidróxido potásico 0,0184 N obtenido. El color obtenido será anaranjado como en la Figura 25.

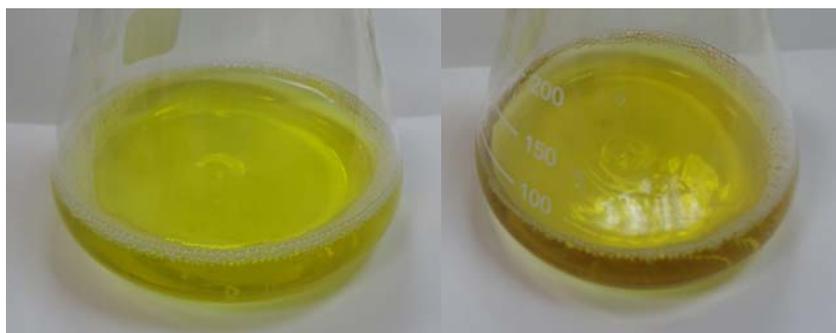


Figura 25. La muestra antes de ser valorada y después

9. Realizar por triplicado la valoración en cada uno de los aceites.
10. Para realizar los cálculos:

$$\text{Grado de acidez (\% de ácido oleico)} = \frac{V \times N \times 282}{10 \times P}$$

V = ml de KOH gastados

N = Normalidad del KOH utilizado

P = g de aceite de la muestra

4.2.2. Índice de peróxidos

El índice de peróxidos es la cantidad de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones que describe el método.

El índice obtenido puede tomarse como una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa.

El método se basa en calcular los miliequivalentes de oxígeno activo en un kilo a partir del yodo liberado del yoduro potásico. Los peróxidos e hidroperóxidos oxidan al yoduro potásico, en medio ácido (la muestra está disuelta en cloroformo y ácido acético glacial), según la reacción de la Figura 26.

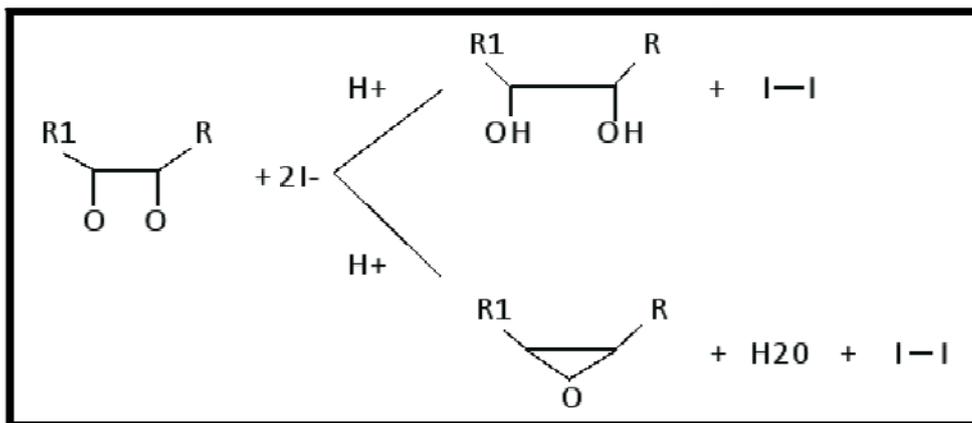


Figura 26. Reacción de oxidación del ioduro potásico por parte de los peróxidos

El yodo liberado será proporcional a los peróxidos existentes y se valora con tiosulfato sódico según la siguiente reacción:



El I_2 con el almidón (indicador) forma un complejo azul oscuro que desaparece al pasar éste a I^- visualizándose así el punto final de la reacción.

o **Materiales**

- Balanza analítica 0,001 g de precisión.
- Matraz Erlenmeyer 250 ml con cuello y tapón esmerilados.
- Bureta 25 ml ($\pm 0,05$ ml).
- Micropipeta.
- Pipeta 10 ml.
- Pipeta 15 ml.
- Probeta 100 ml.
- Agua desmineralizada para precipitación de reactivos.
- Cloroformo.
- Ácido acético glacial.
- Solución acuosa saturada de yoduro potásico:
 - o Disolver yoduro potásico en exceso en H_2O y conservar en frasco tapado bien tapado. Preparación en el momento.
- Solución acuosa de tiosulfato sódico 0,001 N comercial.
- Solución de almidón, en solución acuosa de 10 g/l, recién preparada con almidón soluble.

o **Método**

1. Homogeneizar la muestra y filtrar con papel de filtro con una cucharada de sulfato de sodio anhidro.
2. Pesarse la muestra de aceite en un Erlenmeyer en función del índice esperado y anotar el peso exacto:

Tabla 12. Cantidad de muestra a pesar según índice de peróxidos esperado

Índice esperado (meq O ₂ /kg)	Peso muestra (g)
De 0 a 12	De 5 a 2
De 12 a 20	De 2 a 1,2
De 20 a 30	De 1,2 a 0,8
De 30 a 50	De 0,8 a 0,5
De 50 a 90	De 0,5 a 0,3

3. Agregar 10 ml de cloroformo, en el cual se disuelve rápidamente la grasa por agitación ligera.
4. Añadir 15 ml de ácido acético glacial al Erlenmeyer.
5. Añadir 1 ml de solución acuosa saturada de yoduro potásico con la micro pipeta.
6. Cerrar rápido el matraz y agitar 1 minuto, con movimiento suave de rotación.
7. Mantenerlo en la oscuridad 5 minutos exactos a 15-25°C.
8. Añadir transcurridos los 5 minutos 75 ml (aprox.) de agua destilada con probeta y agitar vigorosamente.
9. Añadir unas gotas de almidón como indicador hasta que se oscurezca. Éste forma complejo con el I₂ de color azul oscuro que desaparece al pasar éste a I⁻.
10. Llenar la bureta con tiosulfato sódico 0,01 N y valorar el yodo liberado hasta viraje del indicador, que consiste en la desaparición del color oscuro para que la parte acuosa quede transparente. En la Figura 27 aparece el aceite con el color oscuro del indicador y una réplica una vez terminada la valoración.



Figura 27. Dos réplicas de la solución que contiene la muestra antes (izquierda) y después (derecha) de ser valoradas con tiosulfato sódico

11. Anotar el volumen de tiosulfato gastado.
12. Realizar el análisis por triplicado en cada muestra de aceite.
13. Para realizar los cálculos:

$V_1 - V_0$ = Volumen gastado de tiosulfato sódico

N = Normalidad del tiosulfato sódico

P = Peso, en gramos, de la muestra de aceite

4.2.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK)

El método de análisis se basa en que la materia grasa se disuelve en el ciclohexano y se determina la extinción de la solución a las longitudes de onda prescritas, respecto al disolvente puro. A partir de los valores espectrofotométricos se calculan las extinciones específicas (K).

De este método se obtienen tres parámetros, explicados anteriormente, que son los coeficientes de extinción K_{232} , K_{270} y la ΔK .

o **Materiales**

- Espectrofotómetro ultravioleta visible Thermo Spectronic Helios Gamma (Figura 28), con lectura múltiple de absorbancia.
- Balanza analítica 0,001 g de precisión.

- Cubeta de cuarzo con paso óptico de 1 cm.
- Matraces aforados de 10 ml.
- Matraces aforados de 25 ml.
- Ciclohexano de calidad para espectrofotometría.
- Sulfato sódico anhidro.



Figura 28. Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Gamma

○ Método

1. Homogeneizar y filtrar la muestra con papel de filtro con una cucharada de sulfato de sodio anhidro para que esté exenta de partículas en suspensión.
2. Encender el espectrofotómetro media hora antes y seleccionar las longitudes de onda adecuadas. Realizar un autocero con ciclohexano en la cubeta de cuarzo a 232 nm de longitud de onda.
3. Pesarse en tres Erlenmeyer de 10 ml de 40 a 60 mg de muestra y en otros tres de 25 ml, pesarse de 400 a 600 mg. Esto se realiza de esta manera para que el resultado del espectrofotómetro esté en rangos de longitudes de onda fiables.
4. Añadir 6 o 7 ml de ciclohexano a cada matraz y disolver la grasa agitando.
5. Completar hasta enrase de los matraces con ciclohexano y homogeneizar. Debe quedar una solución sin turbidez.
6. Rellenar la cubeta de cuarzo con los matraces de 10 ml, medir la extinción a 232 nm y anotar la absorbancia obtenida.

7. Limpiar bien la cubeta con ciclohexano entre cada medida.
8. Seleccionar ahora en el espectrofotómetro las longitudes de onda 266, 270 y 274 nm.
9. Llenar la cubeta de ciclohexano y hacer el autocero a las tres longitudes de onda.
10. Llenar la cubeta con los matraces de 25 ml y medir las tres absorbancias. Aparecen a la vez en la pantalla del espectrofotómetro.
11. Anotar todos los resultados obtenidos.
12. Para realizar los cálculos:

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda} \times V \times 10}{P} \quad \Delta K = K_{270} - \frac{K_{266} + K_{274}}{2}$$

K_{λ} = Coeficiente de extinción a longitud de onda λ nm

A_{λ} = Absorbancia

V = Volumen, en mililitros, del matraz usado

P = Peso, en miligramos, de la muestra de aceite

4.2.4. Humedad y materias volátiles

Se basa en someter a las muestras a una temperatura de 105°C que evaporen todo el agua y las materias volátiles que pueda contener el aceite.

○ **Materiales**

- Balanza analítica 0,001 g de precisión.
- Estufa de desecación de aire forzado.
- Desecador con agente desecante gel de sílice con indicador de humedad.
- Cápsulas de acero inoxidable para contener a la muestra.

○ **Método**

1. Homogeneizar la muestra.
2. Echar unos 15 – 20 g de aceite en la cápsula previamente desecada anotando el peso exacto.
3. Meter en estufa 5-6 horas.
4. Sacar de la estufa, dejar enfriar y pesar.
5. Introducir otra vez a la estufa y repetir las dos operaciones anteriores hasta que la pesada sea constante (hasta que la diferencia entre dos pesadas no sea mayor de 0,05 %).
6. Realizar tres réplicas de cada una de las seis muestras de aceite.
7. Para realizar los cálculos:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

P_1 = Peso, en gramos, de la cápsula metálica

P_2 = Peso, en gramos, de la cápsula metálica con la muestra húmeda

P_3 = Peso, en gramos, de la cápsula metálica con la muestra seca

4.2.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo

Este método indica la posible presencia de tierra, sustancias minerales, resinas, ácidos grasos oxidados, jabones alcalinos de los ácidos palmítico y esteárico, materias nitrogenadas, etc.

○ **Materiales**

- Balanza analítica 0,001 g de precisión.
- Estufa de desecación de aire forzado.
- Desecador.
- Matraces.
- Embudos.
- Soportes para embudos.
- Papel de filtro plegado.
- Éter de petróleo 40-60°C.

○ **Método**

1. Colocar el papel de filtro plegado en la estufa a 105 °C durante 30 minutos.
2. Sacar el papel y dejar enfriar en desecador.
3. Pesarse unos 20 g de aceite homogeneizado en un matraz y anotar el peso exacto.
4. Pesarse el papel de filtro desecado y colocarlo en embudo de vidrio encima de un matraz.
5. Filtrar cada muestra de aceite en un filtro identificado y lavar el matraz que contenía la muestra con éter de petróleo para que no quede nada en el recipiente y pase todo a través del filtro.
6. Pasar pequeñas porciones de éter de petróleo varias veces por el filtro para arrastrar por completo el aceite del filtro y que caiga todo al matraz para que sólo queden las impurezas insolubles en éter de petróleo.
7. Colocar el filtro exento de materia grasa en la estufa a 105°C durante al menos 2 horas. Podemos comprobar la ausencia de grasa poniendo el filtro al trasluz.
8. Dejar enfriar en el desecador y pesarse.
9. Introducir en la estufa 2 horas más hasta que la pesada sea constante.
10. La cantidad de impurezas insolubles en éter de petróleo se mide en porcentaje:

$$\text{Impurezas (\%)} = \frac{P_i - P_s}{P_m} \times 100$$

P_i = Peso, en gramos, del filtro desecado con impurezas

P_s = Peso, en gramos, del filtro seco

P_m = Peso, en gramos de la muestra

4.2.6. Contenido en ceras mediante cromatografía de gases

En este método se describe un procedimiento para la determinación de las ceras totales del aceite mediante la cromatografía de gases con columna capilar.

La materia grasa, a la que se le añade un patrón interno adecuado, se fracciona mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado; se recupera la fracción eluida en primer lugar y, después, se analiza directamente mediante cromatografía de gases en columna capilar e inyección en columna fría. Al final, a partir del cromatograma y del informe, se obtiene un número con la suma total de ceras.

○ **Materiales**

- Matraz Erlenmeyer de 25 ml.
- Columna de vidrio para cromatografía, de 15 mm de diámetro interior, 30 cm de longitud y provista de una llave.
- Cromatógrafo de gases HP 6890 (Figura 29) con las siguientes características:
 - Recinto termostático para la columna, provisto de programador de temperatura.
 - Inyector “on column” para introducción directa en columna.
 - Detector de ionización de llama (FID).
 - Registro de datos digitales.
 - Columna capilar de sílice fundida, de 15 m de longitud y de 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de la fase estacionaria semipolar SE-54, con un espesor uniforme de 0,25 μm .
 - Inyector automático de líquidos Agilent 7683 ALS, para inyección directa en columna con jeringa de 10 μl para 1 μl de muestra.
- Vibrador eléctrico.
- Rotavapor.
- Horno de mufla.
- Balanza analítica 0,001 g de precisión.
- Material de vidrio de laboratorio.
- Gel de sílice de granulometría 60 μm
 - Éste debe mantenerse a temperaturas de 500 $^{\circ}\text{C}$ en el horno durante unas 4 horas. Tras su enfriamiento, añadir un 2% de agua respecto a la cantidad de gel de sílice tomada. Se agita bien para homogeneizar la masa y se mantiene al abrigo de la luz durante al menos 12 horas antes de su uso.
- n-hexano.

- Éter etílico.
- n-heptano.
- Solución patrón de araquidato de laurilo al 0,2% (m/v) en hexano (patrón interno para ceras).
- Hidrógeno puro como gas portador.
- Hidrógeno puro como gas auxiliar.
- Aire puro (gas comprimido a alta presión) como gas auxiliar.

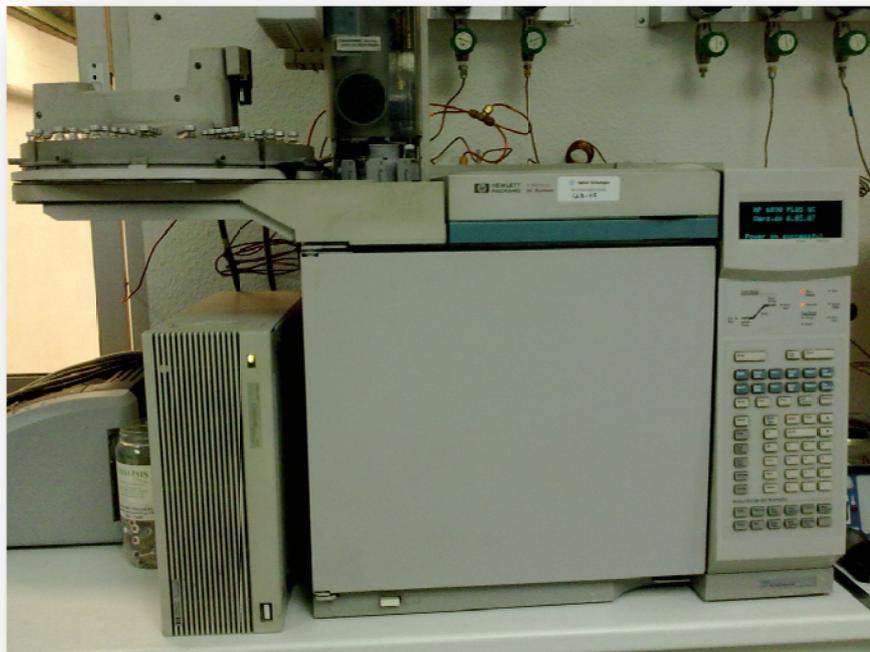


Figura 29. Cromatógrafo de gases HP 6890 con el que se realizan los análisis de las ceras y del monopalmitato de 2-glicerilo. Lleva acoplado el sistema de inyección de muestra automático

○ Método

1. Para preparar la columna cromatográfica y separar las ceras:
 - Suspender 15 g de gel de sílice en n-hexano e introducirlo en la columna.
 - Completar la sedimentación con ayuda de un vibrador eléctrico para obtener una capa cromatográfica más homogénea.
 - Hacer pasar 30 ml de n-hexano para eliminar las posibles impurezas.
 - Pesar exactamente 500 mg de la muestra en un Erlenmeyer de 25 ml y añadir 0,2 mg de araquidato de laurilo.
 - Transferir la muestra preparada a la columna cromatográfica, con ayuda de dos porciones de 2 ml cada una de n-hexano.
 - Dejar fluir el disolvente hasta que se sitúe a 1 mm por encima del nivel superior del absorbente y a continuación hacer pasar 70 ml más de n-hexano para eliminar los n-alcanos presentes de forma natural.

- Comenzar la elución cromatográfica recogiendo 180 ml de la mezcla de n-hexano/éter etílico 99:1 (preparada en el día) a un flujo de 15 gotas cada 10 segundos (esta fracción contiene las ceras).
 - Secar la fracción resultante, la que contiene las ceras, en el rotavapor hasta que se haya eliminado todo el disolvente.
 - Eliminar los dos últimos ml del disolvente con ayuda de una débil corriente de nitrógeno y añadir después de 2 a 4 ml de n-heptano.
2. Insertar la columna en el cromatógrafo de gases conectando la entrada al sistema en columna y el terminal de salida al detector FID y controlar el correcto funcionamiento.
 3. Condiciones de trabajo para la cromatografía de gases:
 - Temperatura de la columna (horno del cromatógrafo):

Tabla 13. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis de ceras

	30°C/ minuto		6°C/ minuto	
al inicio 80°C (30'')	➔	140°C (1')	➔	340°C (10')

- Temperatura del detector: 370°C.
 - Cantidad inyectada: 1 µl de la solución (2-4 ml) de n-heptano.
 - Gas portador: Hidrógeno (H₂) a un flujo de 8,8 ml/min.
 - La sensibilidad debe ser aquella que permita separar todas las ceras con una resolución satisfactoria de los picos. El trazado de la línea base deberá ser lineal, sin picos y sin derivas.
4. Cargar los viales de muestra en la bandeja del ALS anotando la posición de cada muestra.
 5. Fijar en el inyector automático de líquidos el tamaño de la jeringa y el tamaño de muestra que debe analizar (1 µl) y comenzar el análisis de las muestras (las seis variedades de aceite).
 6. Llevar a cabo el registro con el programa informático ChemStation de Agilent Technologies, Inc.
 7. Hemos obtenido un cromatograma y un informe del programa informático y éste nos saca la suma de las ceras totales directamente.

4.2.7. Determinación de estigmastadienos

Análisis realizado a todos los aceites para comprobar su pureza como vírgenes y corroborar la ausencia de otros aceites refinados.

El análisis consiste en la separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos mediante cromatografía en columna de gel de sílice y análisis mediante cromatografía de gases en columna capilar.

○ **Materiales**

- Matraces de 250 ml aptos para colocarles un refrigerante de reflujo.
- Embudos de decantación de capacidad para 500 ml.
- Matraces de 100 ml.
- Vibrador eléctrico.
- Rotavapor.
- Calentador.
- Columna de vidrio para cromatografía de 1,5 cm de diámetro interno y 50 cm de longitud provista de una llave de teflón. En su parte inferior se coloca un tapón de lana de vidrio.
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Figura 30) con las siguientes características:
 - Recinto termostático para la columna, provisto de programador de temperatura con precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - Inyector del gas portador para introducción directa en columna.
 - Detector de ionización de llama (FID).
 - Registro de datos digitales.
 - Columna capilar de sílice fundida, de 30 m de longitud y de 0,25 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de 0,25 μm de espesor de 5%-fenimetilsilicona, la fase estacionaria.
 - Inyector automático de líquidos Agilent 7683 ALS, con jeringa de 10 μl para 1 μl de muestra.
- n-hexano sin impurezas.
- Etanol 96 v/v.
- Sulfato sódico anhidro.
- Solución alcohólica de KOH al 10%. Añadir 10 ml de agua destilada a 50 g de KOH, agitar y diluir seguidamente la mezcla en etanol hasta un volumen de 500 ml. Preparar a diario y tapada.
- Gel de sílice 60 μm de granulometría.
 - Éste debe mantenerse a temperaturas de 500 $^{\circ}\text{C}$ en el horno durante unas 4 horas. Tras su enfriamiento, añadir un 2% de agua respecto a la cantidad de gel de sílice tomada. Se agita bien para homogeneizar la masa y se mantiene al abrigo de la luz durante al menos 12 horas antes de su uso.
- Solución patrón de colest-3,5-dieno en hexano con una concentración de 20 ppm, que se obtiene diluyendo la solución de colest-3,5-dieno 200 ppm en hexano (99% pureza).

- Hidrógeno puro como gas portador.
- Hidrógeno puro como gas auxiliar.
- Aire puro (gas comprimido a alta presión) como gas auxiliar.



Figura 30. Cromatógrafo de gases Agilent 6890N para la determinación de los estigmastadienos y los esteroides con sistema de inyección automática de muestras Agilent 7683 ALS

○ Método

1. Preparación de la columna sobre sílica gel:
 - Echar hexano en la columna para cromatografía hasta una altura aproximada de 5 cm, rellenar con papilla de sílica gel en el hexano (15 g en 40 ml) con la ayuda de pequeñas porciones de hexano.
 - Dejar sedimentar y completar la sedimentación aplicando una ligera vibración.
 - Añadir sulfato sódico anhidro hasta un altura de 0,5 cm y finalmente, eluir el exceso de hexano
2. Preparación de la materia insaponificable:
 - Pesar $20 \pm 0,1$ g de aceite en un matraz de 250 ml añadir 1 ml de la disolución patrón de colest-3,5-dieno ($20 \mu\text{g}$) y 75 ml de potasa alcohólica al 10%, colocar el refrigerante de reflujo y calentar hasta ligera ebullición durante 30 minutos.
 - Retirar de la fuente de calor y dejar enfriar sin que solidifique.
 - Añadir 100 ml de agua y pasar a un embudo de decantación con la ayuda de 100 ml de hexano. Agitar vigorosamente 30 segundos y dejar decantar. En caso de persistencia de emulsiones, añadir pequeñas cantidades de etanol.

- Transferir la fase acuosa inferior a un segundo embudo de decantación y extraer de nuevo con ayuda de 100 ml de hexano. Repetir la extracción y lavar los extractos de hexano tres veces cada vez con una mezcla de 100 ml de etanol-agua (1:1) hasta neutralidad del pH.
 - Pasar la solución de hexano a través de sulfato sódico anhidro (50 g), lavar con 20 ml de hexano y evaporar en un rotavapor a 30°C a baja presión.
3. Separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos:
- Introducir el residuo a la columna de fraccionamiento con ayuda de dos porciones de 1 ml de hexano y distribuir la muestra en la columna teniendo cuidado de que el nivel de la solución cubra el sulfato sódico.
 - Iniciar la elución cromatográfica con hexano a un flujo de 1 ml/minuto
 - Eliminar la primera elución de 25-30 ml y entonces recoger la fracción siguiente de 40 ml.
 - Evaporar la segunda fracción en el rotavapor a 30°C y a presión reducida hasta sequedad.
 - Disolver inmediatamente el residuo en 0,2 ml de hexano.
 - Guardar la solución en el refrigerador hasta el momento del análisis.
4. Cromatografía de gases en columna capilar. Condiciones de trabajo:
- Temperatura del inyector: 300°C.
 - Temperatura de la columna (Tabla 14)
 - Temperatura del detector: 320°C.
 - Inyección con una división de flujo (split-splitless) de 1:15.
 - Gas portador: Hidrógeno a 6 ml/min.

Tabla 14. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis del estigmastadieno

	2°C/ minuto	
al inicio 230°C (6')	→	280°C hasta el final

5. Cargamos la fracción eluida anterior, en la bandeja del ALS (inyector automático de líquidos) anotando el vial de cada muestra (se realizan las 6 variedades simultáneamente).
6. Fijar en el ALS, el tamaño de la jeringa y la cantidad de solución inyectada (2 µl).
7. Comenzar la cromatografía y registrar los datos de manera digital a través del programa informático ChemStation de Agilent Technologies, Inc.
8. Se obtiene un informe escrito con la cromatografía y los resultados de concentraciones.

4.2.8. Monopalmitato de 2-glicerilo

Se pretende determinar el porcentaje de ácido palmítico en posición 2 de los triglicéridos mediante la evaluación del monopalmitato de 2-glicerilo a partir del procedimiento que se describe.

Consiste en someter a la muestra de aceite a la acción de a lipasa pancreática, así la hidrólisis parcial y específica en las posiciones 1 y 3 de las moléculas de los triglicéridos implica la aparición de monoglicéridos en posición 2. Se determina el porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo mediante cromatografía de gases en columna capilar.

○ *Materiales*

- Matraz Erlenmeyer de 25 ml.
- Vaso de precipitados de 100, 250 y 300 ml.
- Columna de vidrio para cromatografía, con un diámetro interior de 21 mm, una longitud de 40 cm, una placa de vidrio fritado y una llave.
- Probetas graduadas de 10, 50, 100 y 200 ml.
- Matraces redondos de 100 y 250 ml.
- Rotavapor.
- Tubos de centrifuga de fondo cónico de 10 ml, con tapón esmerilado.
- Centrifuga para tubos de 10 y 100 ml.
- Termostato capaz de mantener la temperatura a 40°C ± 0,5°C.
- Pipetas graduadas de 1 y 2 ml.
- Jeringa hipodérmica de 1 ml.

- Microjeringa de 100 μ l.
- Embudo de 1000 ml.
- Cromatógrafo de gases HP 6890 (Figura 29) con las siguientes características:
 - o Recinto termostático para la columna, provisto de programador de temperatura.
 - o Inyector “on column” para introducción directa en columna.
 - o Detector de ionización de llama (FID).
 - o Registro de datos digitales.
 - o Columna capilar de sílice fundida, de 15 m de longitud y de 0,32 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de la fase estacionaria metilpolisiloxano al 5%, con un espesor uniforme de 0,25 μ m.
 - o Inyector en columna en frío automático de líquidos Agilent 7683 ALS para inyección directa en columna con microjeringa de 10 μ l de una aguja cementada, de 7,5 cm de longitud.
- Gel de sílice de granulometría 60 μ m
 - o Preparado de la siguiente manera: Poner el gel en una cápsula de porcelana. Se seca en estufa a 160°C durante 4 horas y se deja enfriar a temperatura ambiente en desecador. Se añade un volumen de agua equivalente al 5% del peso del gel de sílice, se tapa y se agita. Se deja reposar durante 12 h antes del empleo.
- n-hexano
- Isopropanol, solución acuosa 1/1 (V/V)
- Lipasa pancreática (actividad entre 2,0 y 10 uds. de lipasa por mg).
- Solución amortiguadora de tris-hidroxi-metilaminometano: solución acuosa 1M llevada a pH 8 con HCl concentrado.
- Colato de sodio, solución acuosa al 0,1%, preparada máx. 15 días antes.
- Cloruro de calcio, solución acuosa al 22%.
- Éter dietílico para cromatografía.
- Disolvente de desarrollo: mezcla n-hexano/éter dietílico (87:13).
- Hidróxido de sodio al 12% en peso.
- Solución etanólica de feniltaleína al 1%.
- Hidrógeno como gas portador.
- Hidrógeno puro como gas auxiliar.
- Aire puro (gas comprimido a alta presión) como gas auxiliar.
- Reactivo de sililación: mezcla piridina/hexametildisilazano, trimetilclorosilano 9/3/1.
- Muestras de referencia: monoglicéridos puros o mezclas de monoglicéridos cuya composición porcentual se conoce y es similar a la de la muestra.

○ **Método**

1. Preparación de la muestra:

- a. En el embudo de 1 000 ml, poner 50 g de aceite y 200 ml de n-hexano.
- b. Añadir 100 ml de isopropanol y una cantidad de la solución de hidróxido de sodio al 12 % correspondiente a la acidez libre del aceite más el 5 %.
- c. Agitar enérgicamente durante un minuto.
- d. Añadir 100 ml de agua destilada, agitar de nuevo y dejar en reposo.
- e. Decantar y después eliminar la capa inferior que contiene los jabones.
- f. Eliminar las eventuales capas intermedias y lavar la solución hexánica de aceite neutralizado con porciones sucesivas de 50 o 60 ml de la solución de isopropanol/agua 1/1 (V/V) hasta que desaparezca el color rosado de la fenoltaleína.
- g. Eliminar la mayor parte del hexano por destilación en vacío con rotavapor y pasar el aceite a un matraz redondo de 100 ml. Secar el aceite en vacío hasta la eliminación total del disolvente. Al final de esta operación, la acidez del aceite debe ser inferior al 0,5 %.
- h. Introducir 1,0 g de aceite preparado como se indica más arriba en un Erlenmeyer de 25 ml y disolver en 10 ml de mezcla de desarrollo. Dejar reposar la solución durante al menos 15 minutos antes de efectuar la cromatografía en columna de gel de sílice. Si la solución está turbia, centrifugarla a fin de garantizar condiciones óptimas de cromatografía.
- i. Preparación de la columna cromatográfica
 - Poner en la columna unos 30 ml de disolvente de desarrollo e introducir un trozo de algodón en la parte inferior de la columna con ayuda de una varilla de vidrio, después, apretar para eliminar el aire.
 - En un vaso de precipitados, preparar una suspensión de 25 g de gel de sílice en unos 80 ml de disolvente de desarrollo y pasarla a la columna con ayuda de un embudo. Verificar que todo el gel de sílice se ha introducido en la columna; lavar con el disolvente de desarrollo, abrir la llave y dejar que el nivel del líquido llegue a unos 2 mm por encima del nivel superior del gel de sílice.
- j. Cromatografía en columna
 - En un Erlenmeyer de 25 ml, pesar exactamente 1,0 g de muestra preparada.
 - Disolver la muestra en 10 ml de disolvente de desarrollo y poner la solución en la columna cromatográfica evitando remover la superficie de la columna.
 - Abrir la llave y dejar que salga la solución de la muestra hasta que llegue al nivel del gel de sílice.

- Desarrollar con 150 ml de disolvente de desarrollo con flujo a 2 ml/min.
- Recuperar el eluido en un matraz redondo de 250 ml, tarado previamente.
- Evaporar el disolvente en vacío y retirar las últimas trazas de este en corriente de nitrógeno.
- Pesar el matraz y calcular el extracto recuperado.

2. Hidrólisis con lipasa pancreática

- En el tubo de la centrífuga, pesar 0,1 g de la muestra preparada antes. Añadir 2 ml de solución amortiguadora, 0,5 ml de la solución de colato de sodio y 0,2 ml de la solución de cloruro de calcio, agitando bien tras cada adición. Cerrar el tubo con el tapón esmerilado y colocarlo en el termostato a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Añadir 20 mg de lipasa, agitar cuidadosamente (evitando mojar el tapón) y poner el tubo en el termostato durante 2 minutos exactos; retirarlo después, agitarlo enérgicamente durante un 1 minuto exacto y dejar enfriar.
- Añadir 1 ml de éter dietílico, taponar y agitar enérgicamente, después centrifugar y pasar la solución de éter a un tubo limpio y seco, con ayuda de una microjeringa.

3. Preparación de los derivados sililados y de la cromatografía de gases

- Mediante una microjeringa, introducir 100 μl de la solución anterior en un tubo de fondo cónico de 10 ml.
- Eliminar el disolvente en corriente ligera de nitrógeno, añadir 200 μl de reactivo de sililación, taponar el tubo y dejar reposar durante 20 minutos.
- Tras 20 minutos, añadir entre 1 y 5 ml de n-hexano (en función de las condiciones cromatográficas): la solución resultante está lista para la cromatografía de gases.

4. Cromatografía de gases

- Las condiciones de trabajo son las siguientes:
 - Temperatura del inyector: inferior a la temperatura de ebullición del disolvente ($68\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - Temperatura de la columna (horno del cromatógrafo):

Tabla 15. Temperaturas de trabajo del horno cromatográfico en el análisis del monopalmitato de 2-glicerilo

	15 $^{\circ}\text{C}$ / minuto		5 $^{\circ}\text{C}$ / minuto	
al inicio 60 $^{\circ}\text{C}$ (1')	→	180 $^{\circ}\text{C}$ (1')	→	340 $^{\circ}\text{C}$ (13')

- Temperatura del detector: 350°C.
 - Inyección directa en columna (t^a del inyector = t^a del horno).
 - Gas portador: Hidrógeno regulado a la velocidad lineal de 9,7 ml/min.
 - Cantidad de sustancia inyectada: 1 μ l de la solución (5 ml) de n-hexano.
- b. Cargamos la solución preparada para cromatografía de gases, en la bandeja del ALS (inyector automático de líquidos) anotando el vial de cada muestra (se realizan las 6 variedades simultáneamente).
- c. Fijar en el ALS, el tamaño de la jeringa y la cantidad de solución inyectada (1 μ l).
- d. Comenzar la cromatografía y registrar los datos de manera digital a través del programa informático ChemStation de Agilent Technologies, Inc.
- e. Se obtiene un informe escrito con la cromatografía y los resultados de concentraciones

4.2.9. Composición en ácidos grasos

Mediante el siguiente método se determina la composición cualitativa y cuantitativa de la mezcla de ésteres metílicos de los ácidos grasos de los aceites de oliva que se analizan.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos que obtendremos en el análisis final con la concentración de cada uno serán los siguientes:

- Ácido mirístico (C14:0)
- Ácido palmítico (C16:0)
- Ácido palmitoleico (C16:1)
- Ácido margárico (C17:0)
- Ácido margaroleico (C17:1)
- Ácido esteárico (C18:0)
- Ácido oleico (C18:1)
- Ácido linoleico (C18:2)
- Ácido linolénico (C18:3)
- Ácido araquídico (C20:0)
- Ácido gadoleico (C20:1)
- Ácido behénico (C22:0)
- Ácido lignocérico (C24:0)

Es necesario extraerlos primero y prepararlos con transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico. Es un procedimiento rápido y muy utilizado para la derivatización de los ácidos grasos formando ésteres metílicos, que son más fáciles de eluir en las columnas cromatográficas. Después de esta preparación estarán listos para inyectarse en el cromatógrafo de gases.

○ *Materiales*

Para la transesterificación en frío con solución metanólica de hidróxido potásico:

- Tubos de rosca (5 ml de volumen) con tapón con junta de teflón.
- Pipetas de 2 y 0,2 ml.
- Metanol con un contenido en agua igual o inferior al 0,5% (m/m).
- Heptano.
- Hidróxido potásico, solución metanólica 2 N: disolver 11,2 g de hidróxido potásico en 100 ml de metanol.

Para la cromatografía:

- Cromatógrafo de gases HP 5890 (Figura 31) con las siguientes características:
 - Recinto termostático para la columna u horno, provisto de programador de temperatura con precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - Inyector del gas portador división de flujo split-splitless.
 - Detector de ionización de llama (FID).
 - Registro de datos digitales.
 - Columna capilar de sílice fundida, de 60 m de longitud y de 0,25 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de 0,20 μm de espesor de una fase estacionaria de tipo poliglicol.
- Jeringa para inyección manual con capacidad de 10 μl .
- Hidrógeno como gas portador perfectamente desecado y con menos de 10 mg/kg de oxígeno.
- Hidrógeno puro como gas auxiliar.
- Aire (gas comprimido a alta presión) como gas auxiliar.



Figura 31. Cromatógrafo de gases HP 5890 para la determinación de la composición de ácidos grasos

○ Método

1. Para la transesterificación en frío con solución metanólica de hidróxido potásico: En un tubo de rosca de 5 ml se pesan aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Después se le añade 2 ml de heptano y se agita. Añadir 0,2 ml de la solución metanólica 2 N de hidróxido potásico, poner el tapón provisto de junta de teflón, cerrar bien y agitar enérgicamente durante 30 segundos. A continuación, se deja reposar hasta que la parte superior de la solución quede clara. Decantar la capa superior dónde están los ésteres metílicos y entonces la solución de heptano ya está lista para inyectarse en el cromatógrafo.
2. Condiciones operativas óptimas para la cromatografía:
 - Temperatura del inyector: 250°C aproximadamente.
 - Temperatura del detector: 330°C.
 - Temperatura de la columna: 187°C.
 - Gas portador: Hidrógeno regulado a velocidad lineal de 1,2 ml/min.
 - Cantidad de solución inyectada: 1 µl.
3. Se toma con la jeringa 1 µl de la solución de ésteres metílicos preparada en el punto 1 y se inyectan manualmente en la columna.
4. Proceder con el análisis, a temperatura de columna constante, registrando los datos con el programa informático Chemstation de Agilent.
5. Se obtendrá un informe con el cromatograma y la concentración de cada éster metílico de los ácidos grasos en formato digital.

4.2.10. *Contenido de triglicéridos con ECN 42 (Diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC)*

Con este método se determina la composición de triglicéridos de los aceites de oliva, expresados en su número equivalente de carbonos (ECN) en función de las diferencias existentes entre el contenido teórico, calculado a partir de la composición de ácidos grasos calculada en el método anterior, y los resultados analíticos obtenidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Para el análisis en HPLC de la muestra son necesarias una purificación de la misma pasándolo a través de una columna de gel de sílice y una transesterificación en frío con solución metanólica de hidróxido potásico.

○ Materiales

- Matraces redondos de 250 y 500 ml.
- Vasos de precipitados de 100 ml.
- Columna de gel de sílice para la purificación de la muestra.
- Columna cromatográfica de vidrio, de 21 mm de diámetro interior y 450 mm de longitud, con grifo y cono (hembra) normalizado en el extremo superior.

- Embudos de decantación de 250 ml con cono (macho) normalizado en el extremo inferior, para conexión con la columna.
- Varilla de vidrio de 600 mm.
- Embudo de vidrio.
- Matraces aforados de 20 y 50 ml.
- Evaporador de rotación.
- Cromatógrafo de líquidos Waters Alliance HPLC (Figura 32) con las siguientes características:
 - o Control termostático de la temperatura de la columna.
 - o Integración completa con Empower Software, de Waters Cromatografía S.A.
 - o Administración automática de muestras con inyección de 20 μ l y ciclo de lavado de agujas.
 - o Gestión de eluyentes con suministro constante.
 - o Columna analítica SunFire Prep Silica Column, 5 μ m de diámetro de partícula de sílice, 4,6 mm de diámetro interior y 250 mm de longitud.
 - o Detector de índice de refracción (RI) 2414, de Waters.
- Disolvente de elución para la purificación del aceite por cromatografía en columna: mezcla de éter de petróleo/éter etílico 87:13 (v/v).
- Gel de sílice Merck 7734, con contenido de agua normalizado al 5% (p/p).
- Lana de vidrio.
- Disolvente de elución para HPLC: acetonitrilo + acetona (50:50).
- Disolvente de solubilización: acetona.



Figura 32. Cromatógrafo de líquidos Waters Alliance HPLC con detector de índice de refracción (RI) 2414, de Waters, con el que se realiza la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del ECN42 real.

o Método

1. Preparación de la muestra

- La muestra debe ser purificada haciéndola pasar por columna de gel de sílice, utilizando como disolvente de elución hexano/éter etílico (87:13).
- Para la preparación de la columna cromatográfica: Llenar la columna de 21 mm de diámetro interior y 450 mm de longitud con 30 ml de disolvente de elución (éter de petróleo/éter etílico 87:13), introducir un poco la lana de vidrio, empujándola hasta el fondo con la varilla de vidrio. Preparar una suspensión en vaso de precipitados de 25 g de gel de sílice en 80 ml de la mezcla de elución y transferir a la columna con un embudo. Lavar el vaso con la mezcla de elución y pasarlo todo a la columna. Abrir el grifo de la columna y dejar que salga disolvente hasta que el nivel se sitúe 1 cm por encima del gel de sílice.
- Para la cromatografía en columna: Pesar $2,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ con precisión de 0,001 g de aceite previamente filtrado y homogeneizado en matraz aforado de 50 ml, disolver en 20 ml de disolvente de elución y enrasar con éste. Introducir 20 ml de la solución en la columna preparada en el punto anterior, abrir el grifo y hacer eluir el disolvente hasta el gel de sílice. Eluir con 150 ml de disolvente de elución, regulando el flujo de disolvente a 2 ml/minuto. Recoger el eluido en matraz de 250 ml tarado y eliminar el solvente en el rotavapor. Pesar el residuo que se utilizará para el análisis por HPLC. Debe recuperarse un 90% de la muestra.

2. Análisis por HPLC

- a. Pesar $0,5 \pm 0,001$ g de la muestra en matraz aforado de 10 ml y enrasar con disolvente de solubilización (acetona).
 - b. Instalar el sistema cromatográfico, cargar las soluciones a analizar en viales identificados des inyector automático de muestras y bombear el disolvente de elución a 1,5 ml/minuto para purgar todo el sistema.
 - c. Esperar a que se obtenga una línea de base estable.
 - d. Inyectar 20 μ l de la muestra preparada anteriormente.
 - e. El software Empower nos da un informe con el cromatograma y el porcentaje del área de cada triglicérido.
- 3. Cálculo de la composición de triglicéridos (% moles) a partir de los datos de GLC de ácidos grasos (% superficie)**
- a. Determinación de la composición de los ácidos grasos: Es el análisis realizado en el punto anterior (4.2.10.) mediante cromatografía de gases.
 - b. Ácidos grasos considerados para el cálculo: Los glicéridos se agrupan en función de su número equivalente de carbonos (ECN), teniendo en cuenta las equivalencias siguientes entre ECN y ácidos grasos (Tabla 16). Sólo se consideran los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono porque son los importantes en el aceite de oliva:

Tabla 16. Equivalencias entre ECN y ácidos grasos considerados para el cálculo

Ácido graso	Abreviatura	Peso molecular (PM)	ECN
Ácido palmítico	P	256,4	16
Ácido palmitoleico	Po	254,4	14
Ácido esteárico	S	284,5	18
Ácido oleico	O	282,5	16
Ácido linoleico	L	280,4	14
Ácido linolénico	Ln	278,4	12

- c. Transformación del % de superficie en moles para todos los ácidos grasos
 - moles P = $\frac{\% \text{ sup. P}}{\text{PM (P)}}$
 - moles O = $\frac{\% \text{ sup. O}}{\text{PM (O)}}$
 - moles S = $\frac{\% \text{ sup. S}}{\text{PM (S)}}$
 - moles L = $\frac{\% \text{ sup. L}}{\text{PM (L)}}$
 - moles Po = $\frac{\% \text{ sup. Po}}{\text{PM (Po)}}$
 - moles Ln = $\frac{\% \text{ sup. Ln}}{\text{PM (Ln)}}$
- d. Normalización al 100 % de los ácidos grasos:
 - % moles P (1,2,3) = $\frac{\text{moles P} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$
 - % moles S (1,2,3) = $\frac{\text{moles S} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$
 - % moles Po (1,2,3) = $\frac{\text{moles Po} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$

- % moles O (1,2,3) = $\frac{\text{moles P} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$
- % moles L (1,2,3) = $\frac{\text{moles P} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$
- % moles Ln (1,2,3) = $\frac{\text{moles P} \times 100}{\text{moles (P+S+Po+O+L+Ln)}}$

El resultado proporciona el porcentaje de cada ácido graso en % de moles en todas las posiciones (1, 2 y 3) de los triglicéridos. Las sumas de porcentaje de saturados (palmítico y esteárico), % AGS, y de insaturados (palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico), % AGI se calcula sumando el porcentaje de los moles de los ácidos grasos que componen el grupo.

- e. Cálculo de la composición de los ácidos grasos en las posiciones 2 y 1-3 de los TG:

En primer lugar los ácidos grasos saturados en posición 2:

- % moles P (2) = % moles P (1,2,3) × 0,06
- % moles S (2) = % moles S (1,2,3) × 0,06

Ácidos grasos insaturados en la posición 2:

- % moles Po (2) = $\frac{\% \text{ moles Po (1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} \times [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}]$
- % moles O (2) = $\frac{\% \text{ moles O (1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} \times [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}]$
- % moles L (2) = $\frac{\% \text{ moles L (1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} \times [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}]$
- % moles Ln (2) = $\frac{\% \text{ moles Ln (1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} \times [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}]$

Ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos:

- % moles P (1,3) = $\frac{\% \text{ moles P (1,2,3)} - \% \text{ moles P(2)}}{2} + \% \text{ moles P (1,2,3)}$
- % moles S (1,3) = $\frac{\% \text{ moles S (1,2,3)} - \% \text{ moles S (2)}}{2} + \% \text{ moles S (1,2,3)}$
- % moles Po (1,3) = $\frac{\% \text{ moles Po (1,2,3)} - \% \text{ moles Po (2)}}{2} + \% \text{ moles Po (1,2,3)}$
- % moles O (1,3) = $\frac{\% \text{ moles O (1,2,3)} - \% \text{ moles O (2)}}{2} + \% \text{ moles O (1,2,3)}$
- % moles L (1,3) = $\frac{\% \text{ moles L (1,2,3)} - \% \text{ moles L (2)}}{2} + \% \text{ moles L (1,2,3)}$
- % moles Ln (1,3) = $\frac{\% \text{ moles Ln (1,2,3)} - \% \text{ moles Ln (2)}}{2} + \% \text{ moles Ln (1,2,3)}$

- f. Cálculos de los triglicéridos:

Triglicérido con un ácido graso, por ejemplo LLL (Trilinoleína):

$$\bullet \text{ \% moles AAA} = \frac{\text{\% moles A (1,3)} \times \text{\% moles A (2)} \times \text{\% moles A (1,3)}}{10000}$$

Triglicéridos con dos ácidos grasos, AAB, como PoPoL y PoLL:

$$\bullet \text{ \% moles AAB} = \frac{\text{\% moles A (1,3)} \times \text{\% moles A (2)} \times \text{\% moles B (1,3)} \times 2}{10000}$$

$$\bullet \text{ \% moles ABA} = \frac{\text{\% moles A (1,3)} \times \text{\% moles B (2)} \times \text{\% moles A (1,3)}}{10000}$$

Triglicérido con tres ácidos grasos diferentes, ABC:

$$\bullet \text{ \% moles ABC} = \frac{\text{\% moles A (1,3)} \times \text{\% moles B (2)} \times \text{\% moles C (1,3)} \times 2}{10000}$$

g. Triglicéridos con ECN42: Los triglicéridos, por orden previsto de elución de HPLC son los siguientes:

- LLL
- PoLL e isómero de posición LPoL
- OLLn e isómeros de posición OLnL y LnOL
- PoPoL e isómero de posición PoLPo
- PoOLn e isómeros de posición OPoLn y OLnPo
- PLLn e isómeros de posición LLnP y LnPL
- PoPoPo
- SLnLn e isómero de posición LnSLn
- PPOln e isómeros de posición PLnPo y PoPLn

Los triglicéridos con ECN42 se obtienen mediante la suma de los nueve triglicéridos, incluidos los isómeros de posición.

Para evitar todos los cálculos en cada uno de los aceites, el Consejo Oleícola internacional facilita una hoja de cálculo para introducir los ácidos grasos que se consideran y obtener el dato teórico de la ECN42 directamente (Figura 33).

Calculation of theoretical triglyceride composition (1,3-R-2-R) V3								
Fill in the yellow fields!								
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4	MW	
Area % (GLC)	P	S	Po	O	L	Ln	Sum	
Input FA-Composition	14,7	2,1	1,4	70,2	9,8	0,5	98,8	
Corr. FA-Composition	16,2	2,1	1,5	69,9	9,8	0,5	100,0	
Theoretical Compositon of Triglycerides with ECN42:							LLL	0,09222
							PoLL	0,04284
							PoPoL	0,00663
							PoPoPo	0,00034
							OLnL	0,21551
							PoOLn	0,03337
							PLnL	0,05543
							PPoLn	0,00858
							SLnLn	0,00020
							Theoretical value ECN42:	0,4551
							IPLC value ECN42:	0,3100
							Difference ECN42:	0,1451

Legend:	
Palmitic acid	P
Stearic acid	S
Palmitoleic acid	Po
Oleic acid	O
Linoleic acid	L
Linolenic acid	Ln

Figura 33. Tabla de cálculo del ECN42 teórico y de la diferencia de éste con el real. Fuente: Consejo oleícola internacional

4.2.11. Composición y contenido en esteroles y eritrodiol+uvaol

En el método se describe cómo se han analizado las muestras para la obtención del contenido de esteroles en las materias grasas, expresado como contenido de cada uno de los esteroles analizados y como contenido total de esteroles. También obtendremos datos sobre el eritrodiol, que es el conjunto de los dioles eritrodiol y uvaol.

Los análisis se llevan a cabo, primero en cromatografía de capa fina y después en cromatografía de gases en columna capilar.

o **Materiales**

- Matraz de 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- Embudos de separación de 500 ml.
- Matraces de 250 ml.
- Equipo completo de cromatografía en capa fina, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm.
- Lámpara ultravioleta de una longitud de onda de 254 nm.
- Microjeringa de 100 µl.
- Embudo cilíndrico filtrante con filtro poroso de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura con un dispositivo adecuado para la filtración en vacío.
- Matraz cónico para vacío de 50 ml, con junta acoplable al embudo filtrante.

- Probeta de 10 ml de fondo cónico con tapón hermético.
- Cromatógrafo de gases HP 6890N (Figura 34), provisto de un sistema de división de flujo, con las siguientes características:
 - o Recinto termostático para la columna, provisto de programador de temperatura con precisión de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - o Inyector con elemento vaporizador de vidrio tratado con persilano.
 - o Detector de ionización de llama (FID).
 - o Registro de datos digitales.
 - o Columna capilar de sílice fundida, de 30 m de longitud y de 0,25 mm de diámetro interior, recubierta interiormente de 0,25 μm de espesor de SE-54, la fase estacionaria.
 - o Inyector automático de líquidos Agilent 7683 ALS, con jeringa de 10 μl para 2 μl de muestra.
- Hidróxido potásico, solución etanólica 2N aproximadamente: disolver, enfriando al mismo tiempo, 130 g de hidróxido potásico (valoración mínima del 85%) en 200 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol. Conservar en oscuro.
- Éter etílico.
- Sulfato sódico anhidro.
- Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice, sin indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor (comerciales).
- Hidróxido potásico, solución etanólica 0,2N: disolver 13 g de hidróxido potásico en 20 ml de agua destilada y completar hasta un litro con etanol.
- Benceno (cromatografía).
- Acetona (cromatografía).
- Hexano (cromatografía).
- Éter etílico (cromatografía).
- Cloroformo.
- Solución patrón para cromatografía en capa fina: colesterol solución al 2 % en cloroformo.
- Solución de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2 % en etanol con unas gotas de solución alcohólica 2N de hidróxido potásico.
- Piridina anhidra (cromatografía).
- Hexametildisiazano.
- Trimetilclorosilano.
- Solución problema de trimetilsililésteres de los esteroides: preparar en el momento de uso a partir de esteroides puros o de mezclas de esteroides obtenidos de aceites que los contengan.
- α -colestanol, disolución al 0,2 % (m/V) en cloroformo (patrón interno).
- Solución patrón de eritrodiole al 0,5% en cloroformo.
- Hidrógeno como gas portador.

- Hidrógeno puro como gas auxiliar.
- Aire puro (gas comprimido a alta presión) como gas auxiliar.



Figura 34. Cromatógrafo de gases con el horno abierto utilizado para la determinación del estigmastadieno, la composición de los esteroides y la cuantificación de los esteroides totales y el eritrodol + uvaol.

o *Método*

Este método consta de dos partes, una donde sólo se analiza la composición de los esteroides sin cuantificarlos y la segunda, donde se utiliza un patrón (α -colestanol) para cuantificar la suma de los esteroides totales y además sacar el eritrodol + uvaol.

1. Preparación del insaponificable:

- a. Pesar en matraz de 250 ml, con precisión, 5 g de muestra seca y filtrada.
- b. Añadir 50 ml de solución etanólica de hidróxido potásico 2N, adaptar el refrigerante de reflujo y calentar en baño María con ligera ebullición agitando hasta que se produzca la saponificación (la solución se vuelve límpida). Calentar 20 minutos más y añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante. Separar el refrigerante y enfriar el matraz a 30°C aproximadamente.
- c. Trasvasar cuantitativamente el contenido del matraz a un embudo de separación de 500 ml, mediante varios lavados con un total aproximado de 50 ml de agua destilada. Agregar 80 ml aproximadamente de éter etílico, agitar enérgicamente durante 30 segundos y dejar reposar hasta la separación de fases. Separar la fase acuosa inferior pasándola a un segundo

embudo de separación. Efectuar otras dos extracciones de la fase acuosa por el mismo procedimiento utilizando de 60 a 70 ml de éter etílico.

- d. Reunir las fracciones etéreas en un mismo embudo de separación y lavarlas con agua destilada hasta que el agua de lavado presente reacción neutra.
- e. Una vez eliminada el agua de lavado, secar con sulfato sódico anhidro y filtrar sobre sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml previamente pesado, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico.
- f. Destilar el éter hasta que quede poco y después, secar con un vacío ligero o una corriente de nitrógeno, completando el secado en estufa a 100°C durante 15 minutos. Dejar enfriar en un desecador y pesar.

2. Separación de la fracción de esteroides:

- a. Las placas básicas se sumergen con gel de sílice en la solución etanólica 0,2N de hidróxido potásico durante 10 segundos, se dejan secar en campana durante dos horas y después, se introducen a estufa a 100°C durante una hora. Conservarlas en desecador hasta el uso.
- b. Se introduce en la cubeta de desarrollo de las placas una mezcla de benceno-acetona 95:5 (v/v) hasta una altura de 1 cm aproximadamente. A continuación, se cierra la cubeta con su correspondiente tapa dejando pasar media hora como mínimo para alcanzar el equilibrio líquido-vapor. La mezcla de desarrollo se cambia en cada prueba.
- c. Preparar una solución del insaponificable preparado en el punto anterior, en cloroformo al 5 % y, con la microjeringa de 100 µl, depositar 0,3 ml de dicha solución en una placa cromatográfica a unos 2 cm de uno de los bordes formando una línea fina y uniforme. Después se ponen a la altura de la línea de aplicación de 2 a 3 µl de la solución de referencia de esteroides para identificar la banda de esteroides una vez efectuado el desarrollo.
- d. Se introduce la placa preparada en la cubeta de desarrollo manteniendo la temperatura entre los 15 y los 20°C. Una vez dentro la placa, se tapa la cubeta dejando que tenga lugar la elución hasta que el frente del disolvente se sitúe a 1 cm aproximadamente del borde superior de la placa. Sacar la placa de la cubeta y evaporar el disolvente en corriente de aire caliente.
- e. Pulverizar la placa con la solución de 2,7-diclorofluoresceína de forma uniforme. Si se examina la placa con la luz UV se puede identificar la banda de esteroides mediante comparación con el patrón. Marcar con lápiz negro los límites.
- f. Después, se rasca con espátula metálica el gel de sílice contenido en el área delimitada y se introduce en el embudo filtrante. Añadir a este embudo 10 ml de cloroformo caliente, mezclar con la espátula metálica y filtrar en vacío, recogiendo el filtrado en el matraz cónico acoplado al embudo.

- g. A continuación hay que lavar el residuo en el embudo tres veces con éter etílico, recogiendo el filtrado en el mismo matraz cónico. Después se evapora el filtrado hasta obtener de 4 a 5 ml y éste se trasvasa a un tubo de ensayo de 10 ml previamente pesado. Evaporar hasta sequedad con calentamiento y corriente ligera de nitrógeno. Después se recoge con acetona y se vuelve a secar completamente. Introducir en una estufa a 105°C durante 10 minutos, dejar enfriar en desecador y pesar. El residuo que queda en el tubo de ensayo está formado por la fracción de esteroides.

3. Preparación de los trimetilsililésteres:

- Se añaden 50 µg por mg de esteroides de reactivo de silanización (mezcla de piridina-hexametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 v/v/v, comercial) al tubo que contiene los esteroides, evitando toda absorción de humedad.
- Tapar el tubo y agitar cuidadosamente sin invertir hasta la completa disolución de los esteroides. Se deja reposar 15 minutos, como mínimo, a temperatura ambiente y se centrifuga durante algunos minutos. La solución límpida queda lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

4. Cromatografía de gases:

- Colocar la columna capilar en el cromatógrafo uniendo uno de los extremos de la columna al inyector y el otro al detector. Efectuar los controles generales para el correcto funcionamiento de la cromatografía (estanqueidad de los circuitos, eficacia del detector, eficacia del sistema de división de flujo y del programa de registro).
- Las condiciones de trabajo óptimas para la cromatografía son las siguientes:
 - Temperatura del inyector: 300°C.
 - Temperatura del detector: 300°C.
 - Temperatura de la columna: 265°C.
 - Gas portador: hidrógeno regulado a velocidad de 3,7 ml/min.
 - Relación de Split de 1/50.
 - Cantidad de solución inyectada: 2 µl.
- Para la realización de la cromatografía se carga la solución de esteroides preparada anteriormente en la bandeja del ALS (inyector automático de líquidos) anotando el vial de cada muestra (se realizan las 6 variedades simultáneamente).
- El registro de los datos se lleva a cabo con el software Chemstation Agilent, del que se obtienen los datos de la concentración de cada esteroide.
- El porcentaje de cada uno de los esteroides simples se obtiene del informe del programa informático.

5. Determinación de los esteroides totales y del contenido en eritrodio y uvaol:

- Primero se introduce en el matraz de 250 ml 10 mg de α -colestanol al 0,2 %.

- b. Evaporar en corriente de nitrógeno hasta sequedad y pesar en el mismo matraz, con precisión, 5 g de muestra seca y filtrada.
- c. Se procede con el método anterior hasta la preparación del insaponificable, que tiene lugar la separación del eritrodiol y los esteroides, donde el procedimiento es igual al anterior excepto en que la solución del insaponificable al 5% en cloroformo se aplica con la microjeringa a 1,5 cm del borde inferior de la placa y que como referencia, en un extremo de la placa se ponen algunos microlitros de las soluciones de colesterol y eritrodiol.
- d. Después de sacar la placa de la cubeta de desarrollo y de examinar la placa en el ultravioleta, habiendo seguido con el procedimiento igual que en el punto anterior, hay que identificar las bandas de los esteroides y del eritrodiol mediante comparación de referencias. A continuación, se extraen con una espátula metálica y se sigue con el procedimiento igual que antes realizando la cromatografía de gases en las mismas condiciones.
- e. El informe elaborado por el programa informático nos da las concentraciones de los esteroides, de nuevo, y del eritrodiol + uvaol.
- f. Para la determinación cuantitativa de los esteroides totales es necesario el patrón añadido α -colestanol:

$$\text{Esterol } x = \frac{A_x \times m_s \times 100}{A_s \times m}$$

A_x = área del pico del esteroil x

A_s = área del pico del α -colestanol

m_s = peso del α -colestanol añadido, en miligramos

m = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos

- g. Para la determinación cuantitativa del eritrodiol:

$$\text{Eritrodiol } \% = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

A_1 = área del pico del eritrodiol

A_2 = área del pico del uvaol

$\sum A_{\text{esteroides}}$ = suma de las áreas de los esteroides presentes

4.3. Análisis sensorial

La cata la ha llevado a cabo el Panel de catadores de aceite de oliva virgen de la Comunidad Foral de Navarra. Es un panel de cata acreditado por el ENAC y compuesto por 16 personas que han evaluado las seis variantes de aceite. La cata ha tenido lugar en la sala de cata de la sede del EVENA, en Olite.

El análisis sensorial realizado consiste en que cada integrante del panel debe oler y degustar el aceite sometido a valoración. Después hay que rellenar la ficha de cata oficial (Figura 35), que consiste en escalas de 10 cm a valorar en cada atributo, negativo o positivo. En caso de percepción del frutado verde o maduro se indica en la casilla.

Después se recogen las fichas de cata por parte del jefe del panel y éste las valora mediante un programa informático para obtener las medianas de frutados y defectos y para valorar con ligero, medio o alto a los atributos frutado, amargo y picante.

Una vez valorada la ficha oficial, se comienza un análisis descriptivo de cada uno de los aceites con las notas olfativas (césped cortado, hoja verde, plátano verde, almendra, etc.) que encuentren los catadores.

Ficha de cata del aceite de oliva virgen

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS

Atrojado/borras	_____ →
Mohoso — húmedo-terroso	_____ →
Avinado — avinagrado Ácido — agrio	_____ →
Metálico	_____ →
Rancio	_____ →
Otros (especifíquense)	_____ →

INTENSIDAD DE LAS PERCEPCIONES DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS

Frutado	_____ →
Verde <input type="checkbox"/> Maduro <input type="checkbox"/>	
Amargo	_____ →
Picante	_____ →

Nombre del catador:

Código de la muestra:

Fecha:

Observaciones:

Figura 35. Ficha de cata oficial del Reglamento (CE) 640/2008 que modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites y sobre sus métodos de análisis

4.4. Método de análisis estadístico

Se han realizado análisis estadísticos de los resultados con el software Statgraphics Centurión XV versión 15.2.14 para Windows de la empresa informática Statpoint Technologies, Inc.

Se ha realizado un análisis de la varianza (ANOVA) simple, donde se relaciona una variable cuantitativa y otra nominal. Se puede comparar dos o más medias de muestras de poblaciones. Las variables cuantitativas estudiadas han sido la acidez, el índice de peróxidos, pruebas espectrofotométricas en el ultravioleta, humedad y materias volátiles, impurezas insolubles en éter de petróleo, composición en ácidos grasos y composición en esteroides. La variable nominal ha sido la variedad de aceituna de los aceites de oliva virgen extra de Artajo.

Se realiza el ANOVA con un nivel de significación del 5% ($p \leq 0,05$) para determinar diferencias significativas entre las variedades, en los parámetros estudiados.

Las diferencias mínimas entre las medias se han establecido mediante intervalos LSD de Fisher y el contraste múltiple de rangos se ha utilizado para comprobar que entre niveles de un factor existen dichas diferencias con un nivel de confianza del 95%.

5. Resultados y discusión

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización de los aceites según análisis químico

- 5.1.1. Acidez
- 5.1.2. Índice de peróxidos
- 5.1.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK)
- 5.1.4. Humedad y materias volátiles
- 5.1.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo
- 5.1.6. Contenido de ceras mediante cromatografía de gases
- 5.1.7. Determinación de estigmastadienos
- 5.1.8. Monopalmitato de 2-glicerilo
- 5.1.9. Composición de ácidos grasos
- 5.1.10. Contenido de triglicéridos con ECN 42 (Diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC)
- 5.1.11. Composición de esteroides

5.2. Caracterización de los aceites según análisis sensorial

5.1. Caracterización de los aceites según análisis químicos

Se realizaron los siguientes análisis químicos con la finalidad de caracterizar cada uno de los aceites vírgenes extra monovarietales y para compararlos entre sí.

5.1.1. Acidez

El análisis de la acidez libre va dirigido a caracterizar el proceso de elaboración, y más concretamente antes de la extracción, mientras se almacenan las aceitunas recolectadas. Para analizar este parámetro las condiciones entre ensayos no variaron y al tratarse de una valoración era muy importante determinar el final de la misma en el mismo tono de viraje del indicador.

De los aceites monovarietales estudiados se han obtenido los siguientes valores de acidez libre:

Tabla 1. Media y desviación estándar resultante de los análisis de la acidez expresada en porcentaje en ácido oleico

Variedad	Acidez (% de ácido oleico)
Arbequina convencional	0,151 ± 0,009 c
Manzanilla Cacereña	0,171 ± 0,001 d
Koroneiki	0,175 ± 0,008 d
Arbequina ecológico	0,115 ± 0,006 a
Arróniz	0,133 ± 0,006 b
Arbosana	0,122 ± 0,003 a

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Para observar los resultados de forma visual, en la siguiente gráfica se resumen los valores de la tabla anterior:

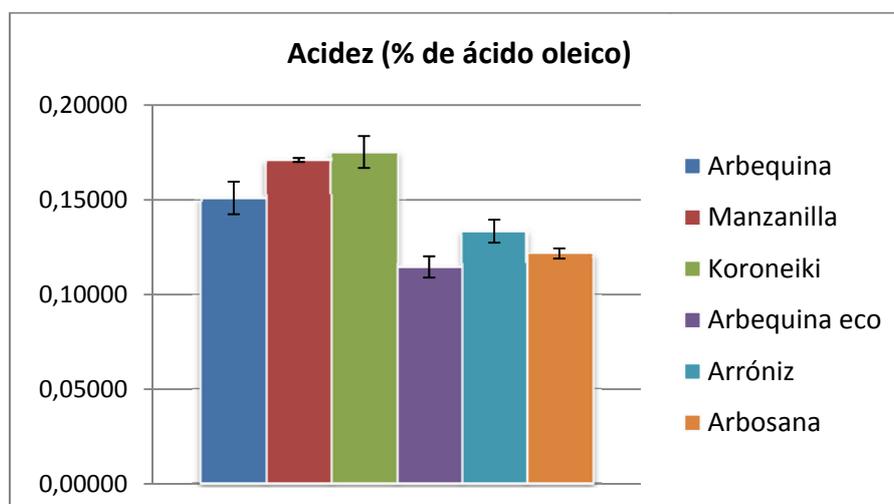


Figura 1. Valores medios de acidez expresada en porcentaje de ácido oleico para cada variedad de aceite

El resultado general de los análisis de la acidez es positivo, con unos datos bajos de todos los aceites, con un valor medio de 0,145 % en ácido oleico, si atendemos al límite que establece la legislación para los aceites de oliva virgen extra (0,8 % en ácido oleico).

Realizando una comparativa, con análisis estadístico de los datos, entre los aceites monovarietales se observa que el que tiene la acidez más alta es el de la variedad Koroneiki, con valores sin diferencias significativas con el aceite obtenido de la variedad Manzanilla cacereña.

El Artajo Arbequina convencional, sin régimen ecológico, es el siguiente con el valor más alto (0,151 %). Los aceites de Arbequina ecológica y de Arbosana no presentan tampoco diferencias significativas entre ellos, aunque éste último tenga un valor ligeramente superior. El aceite elaborado a partir de aceitunas ecológicas es el que tiene el valor más bajo de acidez.

5.1.2. Índice de peróxidos

En el ensayo de peróxidos se pretendía medir el nivel de deterioro oxidativo de los aceites, que afecta principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados que forman los glicéridos.

En la Figura 36 se observa que la principal diferencia la marca el aceite obtenido de la variedad Arbosana, con el valor más alto. Las causas pueden ser numerosas, pero se puede relacionar este dato con la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, ya que las condiciones de elaboración y almacenamiento son las mismas para todos los tipos de aceite.

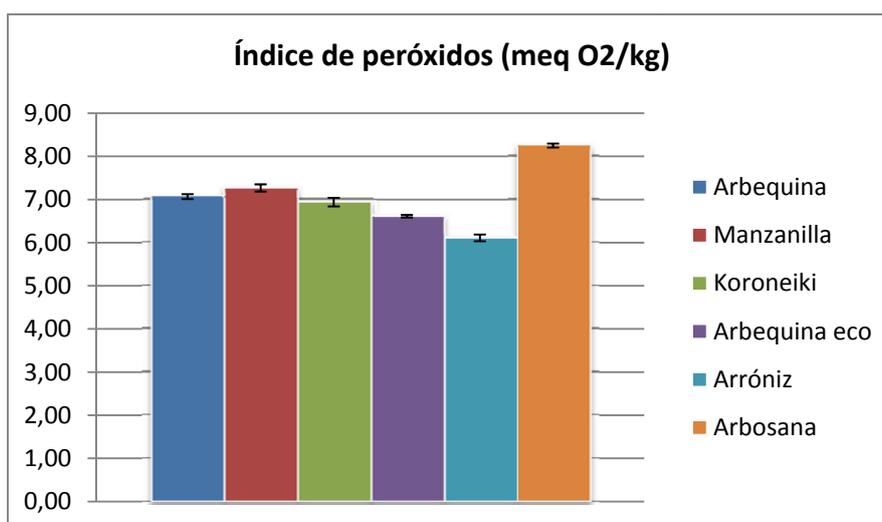


Figura 36. Valores medios de índice de peróxidos expresado en miliequivalentes de oxígeno por kilo de aceite

Los datos de la tabla 17 han sido estudiados estadísticamente y el análisis determina que las diferencias son significativas ($P < 0,05$) en todos los casos.

Tabla 17. Media y desviación estándar resultante de los análisis del índice de peróxidos expresados en miliequivalentes de oxígeno por kilo de muestra

Variedad	Índice de peróxidos (meqO ₂ /kg)
Arbequina convencional	7,07 ± 0,06 d
Manzanilla Cacereña	7,27 ± 0,08 e
Koroneiki	7,94 ± 0,10 c
Arbequina ecológico	6,61 ± 0,03 b
Arróniz	6,11 ± 0,08 a
Arbosana	8,25 ± 0,05 f

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Son valores del índice de peróxidos realmente bajos, con una media de 7,21 miliequivalentes de oxígeno por cada kilogramo de muestra, teniendo en cuenta que el límite establecido para que sea un aceite de oliva virgen extra es de 20 meq O₂/kg.

El dato más bajo corresponde a el aceite elaborado con Arróniz, pero cabe destacar que el arbequina ecológico es el siguiente dato más bajo, dando los mejores valores de estabilidad.

5.1.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK) ζ

El ensayo de la prueba espectrofotométrica es necesario para completar los datos que obtenemos con el índice de peróxidos en cuanto a la oxidación. Sin esta prueba los datos anteriores podrían llevar a confusión porque un aceite en avanzado estado de rancidez oxidativa da valores bajos de peróxidos, porque éstos son inestables y forman carbonilos.

Tabla 18. Media y desviación estándar resultante de los análisis espectrofotométricos

Variedad	K_{232}	K_{270}	ΔK
Arbequina convencional	2,16 ± 0,01 e	0,112 ± 0,005 a	0,0034 ± 0,0002 c
Manzanilla Cacereña	1,83 ± 0,02 b	0,109 ± 0,003 a	0,0026 ± 0,0002 a
Koroneiki	1,95 ± 0,02 d	0,140 ± 0,002 c	0,0037 ± 0,0002 c
Arbequina ecológico	1,91 ± 0,02 c	0,122 ± 0,003 b	0,0032 ± 0,0002 bc
Arróniz	1,82 ± 0,02 b	0,110 ± 0,004 a	0,0028 ± 0,0002 ab
Arbosana	1,74 ± 0,02 a	0,113 ± 0,007 a	0,0025 ± 0,0002 a

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Los resultados obtenidos (Tabla 18) muestran que la oxidación se encuentra en su fase inicial, porque la K_{232} , que está relacionada con los peróxidos presentes, tiene una media de 1,90 y la K_{270} , que es la que muestra si los hidroperóxidos han formado diacetonas y cetonas alfa-insaturadas, tiene valores medios de 0,118 cuando el límite del virgen extra está en 0,22.

El aumento del coeficiente de extinción específica (ΔK) muestra la aparición de hidróxidos y carbonilos, y en el caso de todos los aceites estudiados es muy bajo en comparación con el límite (0,01).

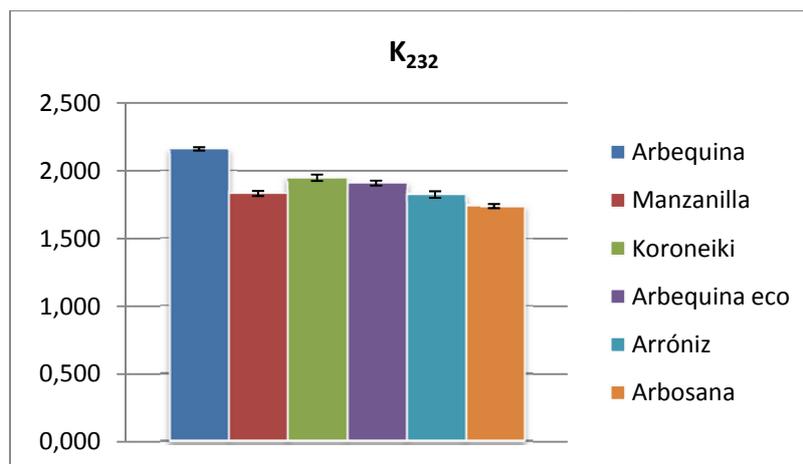


Figura 37. Valores medios de K_{232}

De la gráfica anterior se deduce que el parámetro K_{232} , no da valores proporcionales a los del índice de peróxidos, a pesar de que los dos parámetros estén relacionados con el mismo factor, que es el contenido en hidroperóxidos.

Los mayores valores de K_{232} los hemos obtenido del análisis del aceite obtenido de la Arbequina convencional, seguido de la Koroneiki. El valor más bajo corresponde a la variedad Arbosana, hecho que contrasta con que su índice de peróxidos sea el más bajo. Estadísticamente todos presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) excepto las los aceites elaborados con las variedades Manzanilla cacereña y Arróniz.

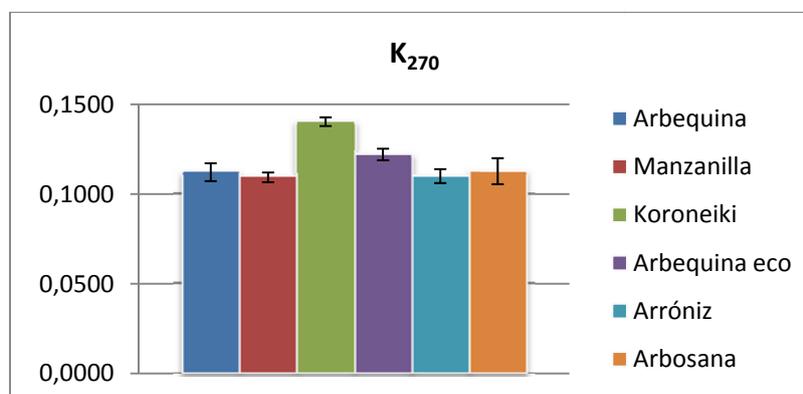


Figura 38. Valores medios del K_{270}

En la gráfica del coeficiente de extinción específica a longitud de onda 270 nm se observa que destacan por la parte superior los aceites elaborados con las variedades Koroneiki y Arbequina ecológica, pero el resto no presentan diferencias significativas entre ellos según el análisis estadístico de los datos.

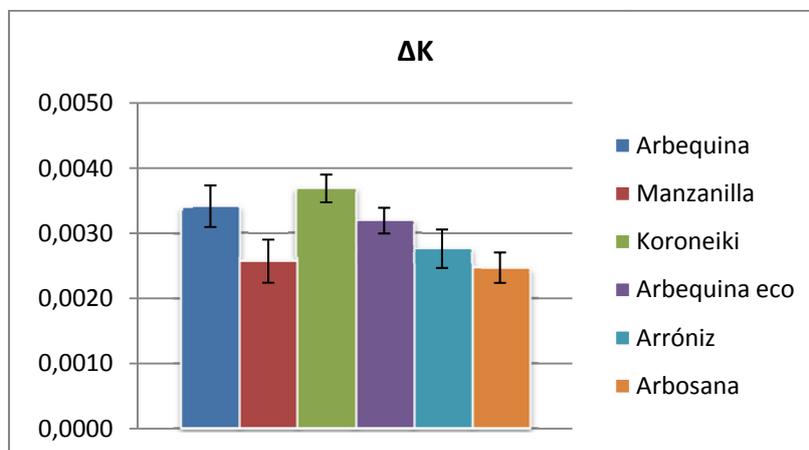


Figura 39. Valores medios de ΔK para todas las variedades

Los valores que representa la figura anterior muestran una proporcionalidad entre el parámetro K_{270} y la ΔK . Éste hecho es lógico porque para el cálculo de la segunda se utiliza el dato del K_{270} . Las diferencias son un poco más marcadas entre las variedades.

5.1.4. Humedad y materias volátiles

La humedad y materias volátiles presentes en el aceite son factores que vienen dados por el proceso de elaboración. El análisis es simple y se lleva a cabo en estufa a 105°C como se indica anteriormente.

Tabla 19. Media y desviación estándar de la humedad y materias volátiles (% en peso)

Variedad	Humedad y materias volátiles (%)
Arbequina convencional	0,069 ± 0,009 a
Manzanilla Cacereña	0,097 ± 0,002 b
Koroneiki	0,095 ± 0,005 b
Arbequina ecológico	0,067 ± 0,002 a
Arróniz	0,067 ± 0,004 a
Arbosana	0,065 ± 0,003 a

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Los valores obtenidos son bajos en comparación con el valor que marcan las exigencias del aceite de oliva virgen extra, que es un 0,2 %. Aun así, esto indica que la eliminación del agua en el proceso no es total o que hay incorporación en la fase de

almacenamiento. El agua aumenta la oxidación del aceite y por eso hay que tener especial cuidado en mantener los aceites en condiciones de mínima humedad.

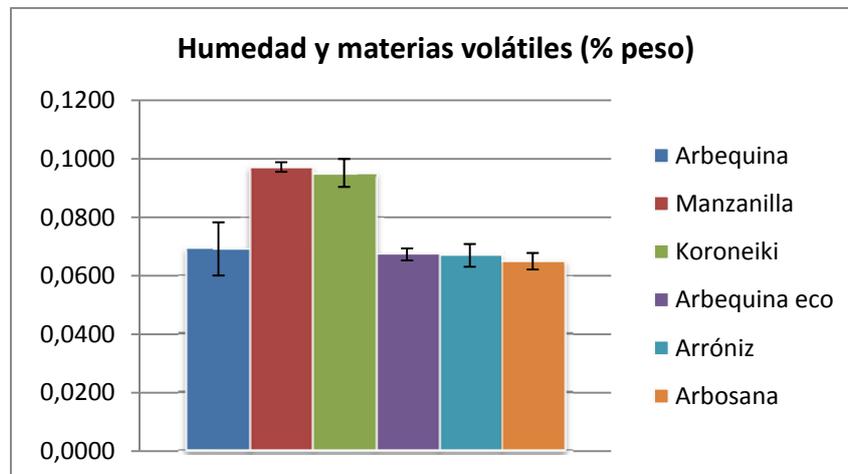


Figura 40. Valores medios de humedad para todas las variedades

Se han analizado estadísticamente los datos y los resultados se observan claramente en la figura 40, ya que los monovarietales de Manzanilla y Koroneiki tienen valores sin diferencias significativas entre ellos pero mayores que los del resto. Todos los demás entre sí tampoco muestran diferencias significativas. Los resultados de esta prueba nos muestran que hay alguna diferencia en el proceso o en el almacenamiento.

5.1.5. Impurezas insolubles en éter de petróleo

Este parámetro indica posibles alteraciones sufridas en el proceso que han incorporado tierra, sustancias minerales, resinas, ácidos grasos oxidados, etc.

Todos estas sustancias suponen un peligro para la estabilidad del aceite y el límite para vírgenes extra es de 0,1%. Esto supone que algunos de los aceites analizados, especialmente los de Arbequina y el Koroneiki, se encuentran rozando ese límite. Estos tres no muestran entre sí diferencias significativas, así como los otros tres que tienen valores de impurezas inferiores tampoco muestran entre sí diferencias significativas.

De los resultados obtenidos se deduce que como el aceite no está filtrado hay impurezas propias del proceso que no se eliminan después, excepto con la decantación. El tiempo que el aceite permanezca en los decantadores estabilizándose será importante para reducir este valor de las impurezas a valores más bajos.

Tabla 20. Media y desviación estándar de los resultados de impurezas insolubles en éter de petróleo expresados en porcentaje (P/P)

Variedad	Impurezas insolubles en éter de petróleo (%)
Arbequina convencional	0,093 ± 0,015 b
Manzanilla Cacereña	0,068 ± 0,013 a
Koroneiki	0,098 ± 0,017 b
Arbequina ecológico	0,099 ± 0,008 b
Arróniz	0,047 ± 0,015 a
Arbosana	0,052 ± 0,016 a

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

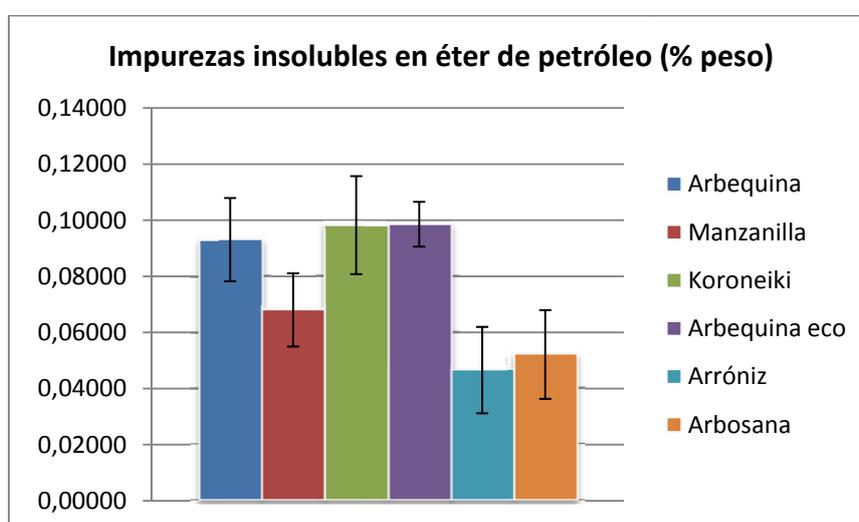


Figura 41. Comparación de las impurezas insolubles en éter de petróleo en los aceites monovarietales expresado en porcentaje en peso de la muestra

5.1.6. Contenido de ceras mediante cromatografía de gases

El parámetro del contenido en ceras se utiliza principalmente para diferenciar a los aceites de oliva vírgenes de las mezclas o de los refinados, así que se llevó a cabo un primer análisis y como los resultados estaban muy por debajo del límite del virgen extra 250 mg/kg (ppm) pues no había necesidad de proseguir con el análisis, ya que no caracterizaba las variedades.

Tabla 21. Contenido en ceras totales expresado en % (P/P)

Variedad	Ceras totales (ng/μl, ppm)
Arbequina convencional	112,90
Manzanilla Cacereña	72,91
Koroneiki	107,45
Arbequina ecológico	106,73
Arróniz	60,82

Arbosana

53,78

De forma gráfica, las ceras obtenidas en el primer análisis se resumen así:

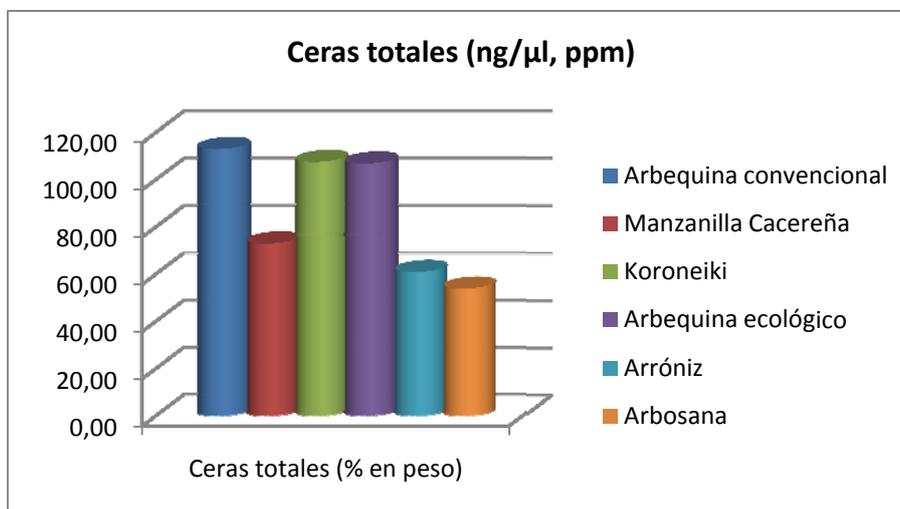


Figura 42. Resultados del contenido en ceras totales en ng/μl

5.1.7. Determinación de estigmastadieno

Los resultados del estigmastadieno no es necesario comentarlos, puesto que han sido nulos en todos los análisis realizados y no se aprecian ni siquiera trazas en los cromatogramas, lo que indica que no hay presencia de aceite refinado y todos son aceites de oliva vírgenes extra puros.

5.1.8. Monopalmitato de 2-glicerilo

El monopalmitato de 2-glicerilo es un parámetro de estudio reciente, que se incluyó al reglamento en 2007 y también se ha realizado un único análisis que comprueba la pureza del aceite de oliva virgen extra porque no caracteriza a las variedades estudiadas.

Tabla 22. Contenido en monopalmitato expresado en %

Variedad	Monopalmitato de 2-glicerilo
Arbequina convencional	0,733
Manzanilla Cacereña	0,445
Koroneiki	0,558
Arbequina ecológico	0,727
Arróniz	0,470
Arbosana	0,539

Los valores más altos corresponden a la Arbequina convencional y a la misma variedad en cultivo ecológico y los más bajos a la Manzanilla cacereña y a la Arróniz. En cualquier caso el límite para los vírgenes extra es 0,9 % y todos están por debajo.

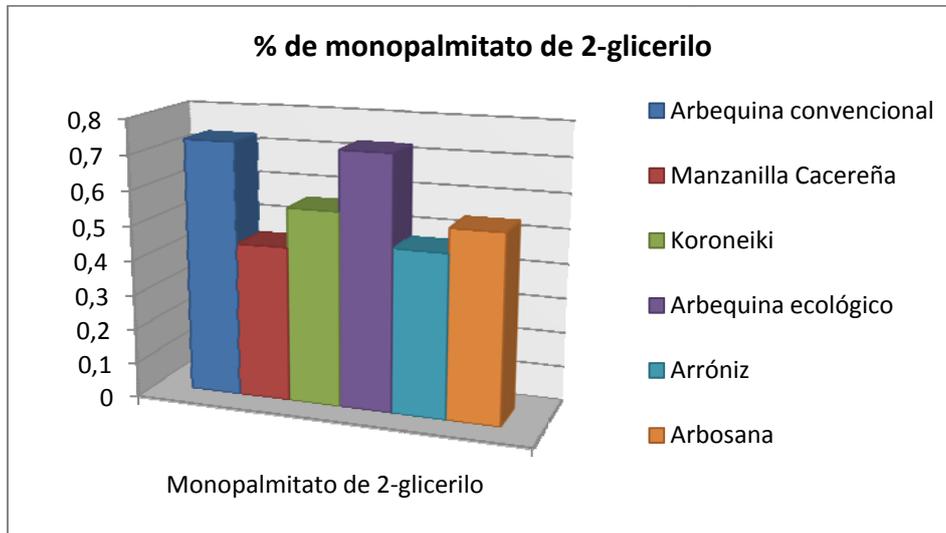


Figura 43. Resultados de la prueba del monopalmitato de 2-glicerilo expresado en %

5.1.9. Composición de ácidos grasos

Este parámetro es uno en los que la variedad muestra una clara influencia, así que el análisis de estos datos es el factor principal a analizar y a estudiar para caracterizar los aceites de oliva vírgenes extra monovarietales.

Los ácidos grasos son los componentes fundamentales y mayoritarios de un aceite y se encuentran formando ésteres con la glicerina (glicéridos y fosfátidos).

El análisis se ha llevado a cabo por cromatografía de gases en columna capilar y todos los aceites se han analizado tres veces cada uno para estudiarlos estadísticamente. Antes de la cromatografía es necesario formar ésteres metílicos para una identificación más fácil.

Tabla 23. Media y desviación estándar de la composición de ácidos grasos expresados en porcentaje del total de ácidos grasos

	Arbequina (% del total de ácidos grasos)	Manzanilla (% del total de ácidos grasos)	Koroneiki (% del total de ácidos grasos)	Arbequina Eco. (% del total de ácidos grasos)	Arróniz (% del total de ácidos grasos)	Arbosana (% del total de ácidos grasos)
Mirístico	0,016 ± 0,002a		0,023 ± 0,001b		0,017 ± 0,002a	
Palmítico	14,743 ± 0,289c	13,475 ± 0,155b	12,425 ± 0,273a	14,553 ± 0,067c	12,298 ± 0,052a	13,165 ± 0,047b
Palmitoleico	1,378 ± 0,029d	1,362 ± 0,043d	0,987 ± 0,064b	1,167 ± 0,024c	0,845 ± 0,057a	1,147 ± 0,024c
Margárico	0,137 ± 0,012cd	0,056 ± 0,007a	0,088 ± 0,016b	0,120 ± 0,015c	0,154 ± 0,026d	0,142 ± 0,006cd
Margaroleico	0,235 ± 0,016c	0,127 ± 0,009a	0,159 ± 0,022b	0,250 ± 0,011cd	0,247 ± 0,020c	0,278 ± 0,016d
Esteárico	2,101 ± 0,069b	1,772 ± 0,029a	2,367 ± 0,090cd	2,066 ± 0,071b	2,408 ± 0,013d	2,277 ± 0,023c
Elaídico		0,036 ± 0,001				
Oleico	70,186 ± 0,168a	76,463 ± 0,140f	74,289 ± 0,252d	71,146 ± 0,087b	72,415 ± 0,031c	74,749 ± 0,038e
C18:2 TC	0,018 ± 0,004c	0,024 ± 0,003a	0,033 ± 0,001b			
C18:2 CT	0,015 ± 0,003a		0,026 ± 0,003b		0,016 ± 0,001a	0,038 ± 0,009c
Linoleico	9,808 ± 0,134e	5,14 ± 0,019a	7,986 ± 0,139b	9,408 ± 0,160d	10,260 ± 0,052f	6,726 ± 0,032b
Linolénico	0,534 ± 0,012ab	0,714 ± 0,070e	0,676 ± 0,047de	0,487 ± 0,016a	0,578 ± 0,015bc	0,632 ± 0,010cd
Araquídico	0,375 ± 0,052ab	0,351 ± 0,006a	0,442 ± 0,007c	0,383 ± 0,023ab	0,360 ± 0,019a	0,412 ± 0,013bc
Gadoleico	0,286 ± 0,039ab	0,334 ± 0,009b	0,303 ± 0,046ab	0,289 ± 0,007ab	0,262 ± 0,015a	0,250 ± 0,041a
Behenico	0,119 ± 0,034abc	0,099 ± 0,004a	0,139 ± 0,008c	0,101 ± 0,014ab	0,089 ± 0,006a	0,131 ± 0,022bc
Lignocérico	0,050 ± 0,006ab	0,047 ± 0,008ab	0,056 ± 0,003b	0,040 ± 0,007a	0,049 ± 0,017ab	0,053 ± 0,005ab

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Los ácidos grasos que se han utilizado para caracterizar los aceites de oliva vírgenes extras son:

- Ácido palmítico (C16:0)
- Ácido palmitoleico (C16:1)
- Ácido esteárico (C18:0)
- Ácido oleico (C18:1)
- Ácido linoleico (C18:2)
- Ácido linolénico (C18:3)

Se estudian cada uno de estos seis ácidos grasos porque son los más mayoritarios y los más relevantes a la hora de diferenciar y caracterizar las variedades.

Los resultados obtenidos del porcentaje del ácido palmítico no presentan grandes variaciones y la media de todos es de un 13,488%, pero analizando estadísticamente los datos, los dos aceites elaborados con Arbequina no presentan diferencias significativas, al igual que entre sí tampoco hay diferencias entre la Manzanilla y la Arbosana ni entre la Koroneiki y la Arróniz. Esto se observa con claridad en la gráfica siguiente:

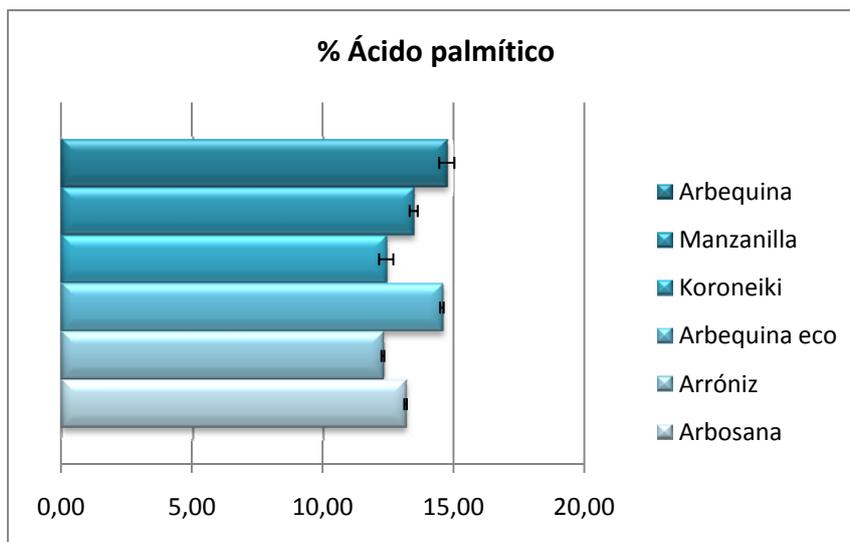


Figura 44. Media del porcentaje de ácido palmítico en las variedades estudiadas

Los valores más altos de palmítico, que es un ácido graso saturado los presentan las Arbequinas, seguido por Manzanilla y Arróniz y después por Koroneiki y Arbosana. Los ácidos grasos saturados proporcionan más estabilidad, pero también son menos saludables que los insaturados.

Analizamos ahora el ácido palmitoleico, de 16 carbonos y con un doble enlace. Éste ácido graso no es un componente muy abundante en el aceite de oliva, pero tiene importancia porque es insaturado.

Los resultados obtenidos comprenden valores desde el 0,845% del aceite elaborado con Arróniz hasta el 1,378% del aceite elaborado con Arbequina convencional. En este caso los dos aceites obtenidos de la Arbequina muestran una diferencia importante entre ellos.

En los datos no se presentan diferencias significativas entre la Arbequina convencional y la Manzanilla ni entre la Arbequina ecológica con la Arbosana.

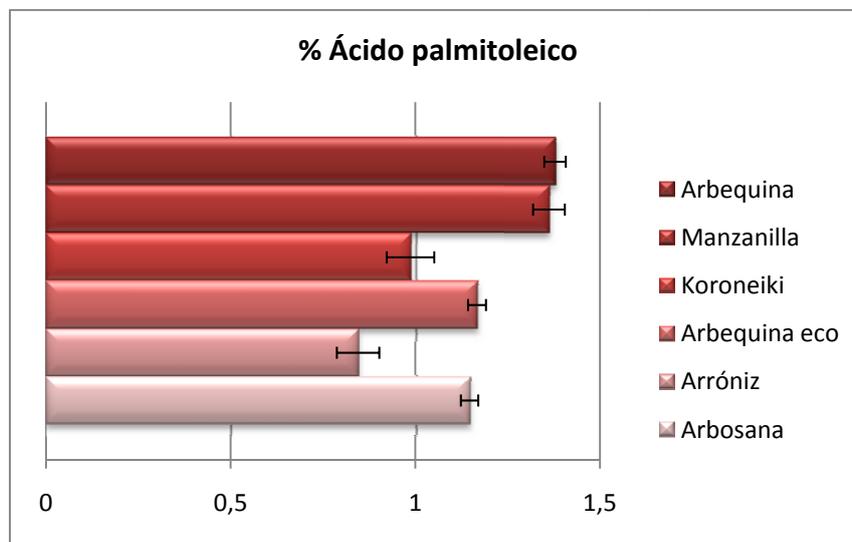


Figura 45. Media del porcentaje de ácido palmitoleico en las variedades estudiadas

En relación con el ácido esteárico cabe decir que es un ácido graso saturado de con 18 átomos de carbono del que se ha obtenido un resultado medio de 2,165%. En este caso, si comparamos las variedades de las que se han obtenido los aceites entre sí se vuelve a observar que no hay diferencias significativas entre los Arbequinas. Todos los demás presentan diferencias significativas entre sí excepto el aceite obtenido de la variedad Koroneiki, que se encuentra entre la Arroniz (el valor más alto) y la Arbosana. La Manzanilla da el valor más pequeño.

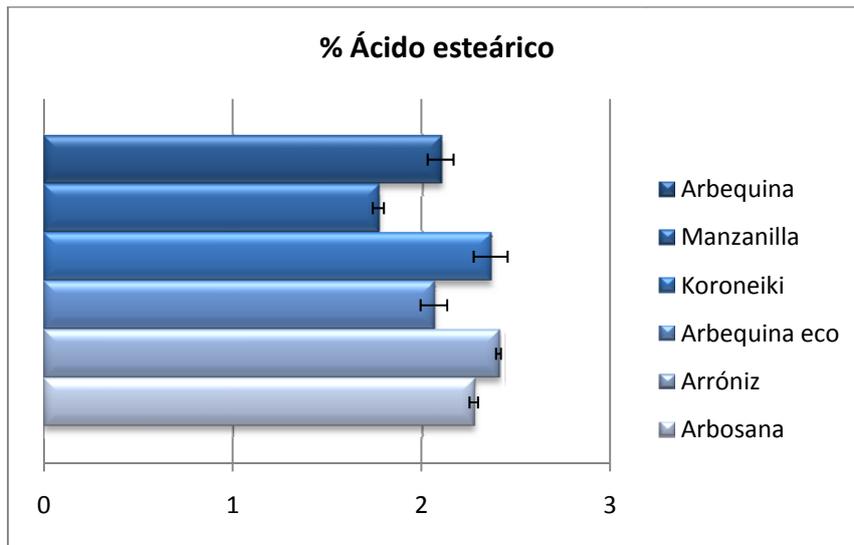


Figura 46. Media del porcentaje de ácido oleico en las variedades estudiadas

El principal componente de los ácidos grasos del aceite de oliva virgen es el ácido oleico. Se trata de un ácido graso monoinsaturado que no es tan inestable a la oxidación como los poliinsaturados, pero es más saludable que los saturados. También es muy característico de cada variedad y está muy estudiado por diversos autores.

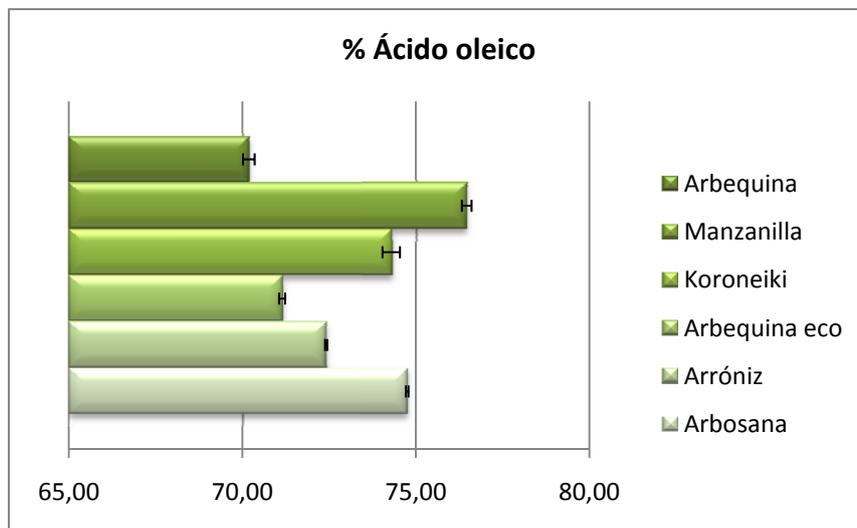


Figura 47. Media del porcentaje de ácido oleico en las variedades estudiadas

El ácido oleico, como se observa, es muy variable en los diferentes cultivares, siendo el valor más bajo un 70,186% en la Arbequina convencional y llegando hasta valores del 76,463% en aceites a partir de la variedad Manzanilla cacereña. Se puede observar en la gráfica cómo los dos aceites obtenidos de la variedad Arbequina son los que tienen menor contenido en ácido oleico, aunque tienen diferencias significativas según los análisis estadísticos. Debido a la variabilidad de éste factor, en el análisis estadístico todas presentan diferencias significativas entre sí.

El siguiente dato a evaluar es la composición en ácido linoleico, un ácido grasos poliinsaturado esencial sensible a oxidaciones que presenta grandes variaciones entre unas variedades y otras, pues el porcentaje de este ácido graso en Arróniz (10,260%) es prácticamente el doble que el porcentaje de linoleico en Manzanilla cacereña (5,140%).

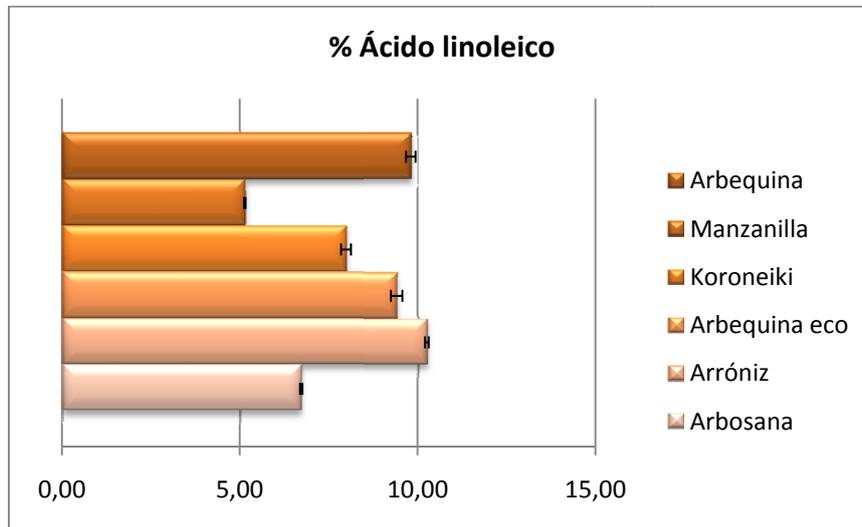


Figura 48. Media del porcentaje de ácido linoleico en las variedades estudiadas

La variabilidad en este parámetro se muestra en que todos los aceites se diferencian significativamente entre sí, aunque los aceites de Arbequina se muestran de nuevo en valores cercanos. Además hay una relación inversa entre el ácido oleico y el linoleico en la mayoría de las variedades.

El ácido linolénico está en una proporción muy pequeña, pero dado que es un ácido graso esencial en la alimentación es importante cuantificarlo.

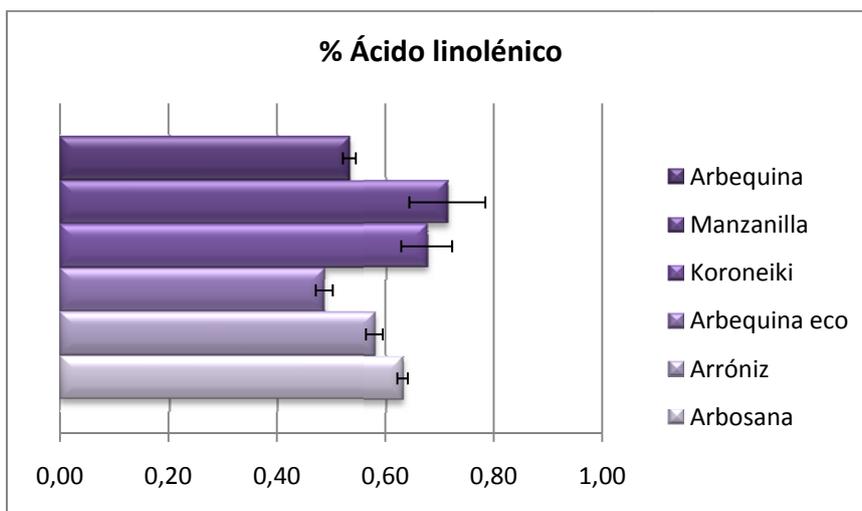


Figura 49. Media del porcentaje de ácido linolénico en las variedades estudiadas

Gráficamente se observa que el valor más alto corresponde a la Manzanilla (0,714%) y después se sitúa la Koroneiki (0,676%), que no presenta diferencias significativas ni con la anterior ni con la Arbosana (0,632%), aunque la primera y la tercera sí que presentan diferencias entre sí. Esto mismo ocurre con varios de los valores, que se pueden observar en la tabla resumen anterior, ya que las letras diferentes muestran diferencias significativas. Además vemos como de nuevo los aceites provenientes de la Arbequina no muestran diferencias significativas entre sí.

Si clasificamos los ácidos grasos a partir de los resultados obtenidos atendiendo a las insaturaciones llegamos a lo siguiente:

Tabla 24. Comparación de las variedades en el grado de saturación

	Arbequina convencional (%)	Manzanilla cacereña (%)	Koroneiki (%)	Arbequina ecológica (%)	Arróniz (%)	Arbosana (%)
AGS	17,826	16,169	15,843	17,551	15,637	16,430
AGI	82,174	83,831	84,157	82,449	84,363	83,570

AGS = Porcentaje de ácidos grasos saturados

AGI = Porcentaje de ácidos grasos insaturados

La variedad con más ácidos grasos saturados es la arbequina en sus dos variantes y eso tiene relación con que el principal ácido grasos monoinsaturado (ácido oleico) esté en menor proporción en esta variedad.

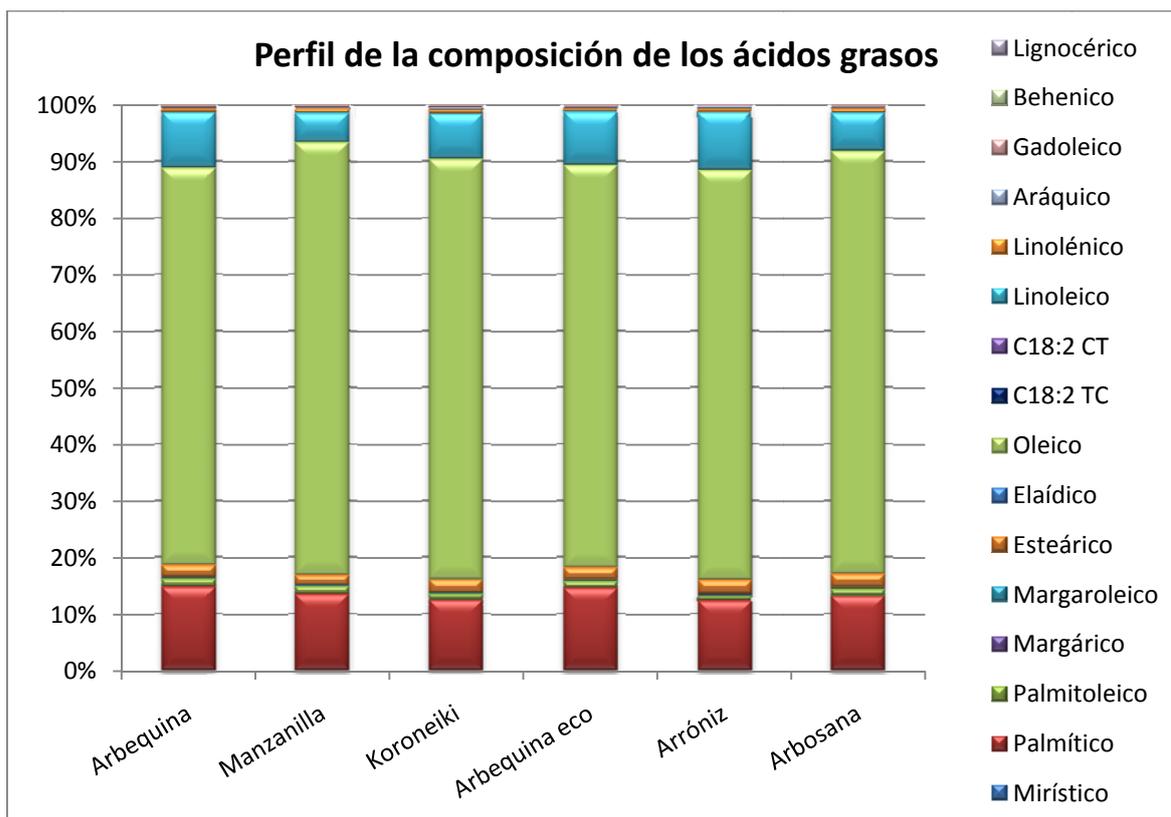


Figura 50. Perfil resumen de la composición de los ácidos grasos en cada aceite monovarietal

5.1.10. Contenido de triglicéridos con ECN 42 (Diferencia entre el contenido teórico y los datos obtenidos por HPLC)

Los triglicéridos con número equivalente de carbonos 42 calculados teóricamente a partir de la composición en ácidos grasos deberían parecerse en los aceites de oliva vírgenes, dentro de unos límites a los que obtenemos a partir de HPLC de la suma de los porcentajes de los triglicéridos LLL, OLnL + PoLL y PLnL, que conforman el ECN42 real.

El límite de la diferencia se establece en 0,2 % para aceptar al aceite como virgen extra así que si nos fijamos en la tabla

Tabla 25. Valores del ECN42 teórico y real y la diferencia entre ambos

Variedad	ECN42 teórico (%)	ECN42 HPLC (%)	Diferencia ECN42 (%)
Arbequina convencional	0,455	0,310	0,145
Manzanilla Cacereña	0,289	0,190	0,099
Koroneiki	0,401	0,260	0,141
Arbequina ecológico	0,391	0,240	0,151
Arróniz	0,477	0,340	0,137
Arbosana	0,323	0,170	0,153

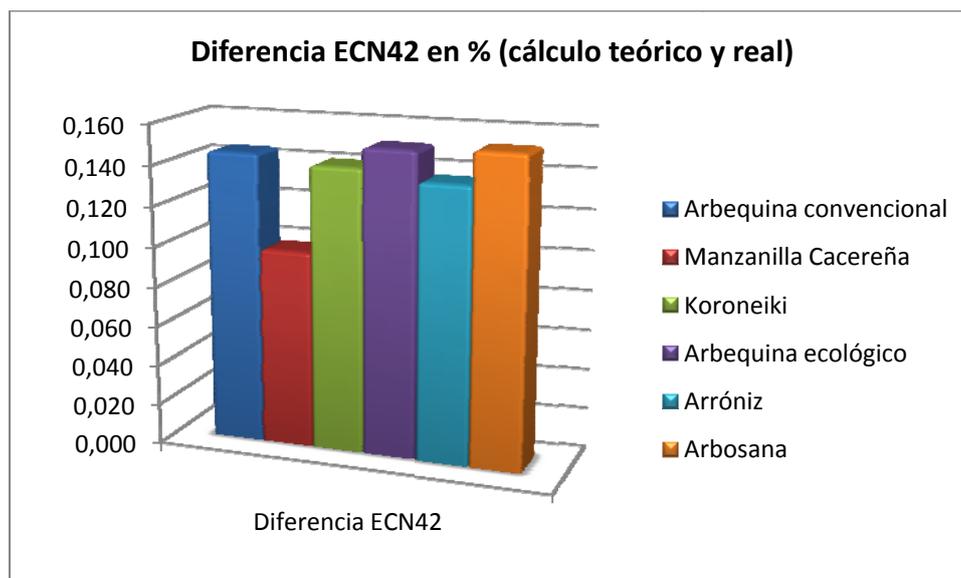


Figura 51. Diferencia gráfica entre el ECN42 teórico y el ECN42 real calculado mediante HPLC

La diferencia entre el ECN42 real y el ECN42 teórico no caracteriza muy bien a las variedades, así que no utilizaremos este parámetro para establecer diferencias entre ellas.

5.1.11. Composición de esteroides y eritrodiol + uvaol

Este parámetro es importante, al igual que el de la composición en ácidos grasos, a la hora de caracterizar un aceite de oliva virgen a través de la variedad, aunque también se determina para la identificación de aceites adulterados con otros de calidad menos apreciada.

Se han realizado dos análisis diferentes, uno para estudiar en profundidad el perfil de la composición en esteroides de cada aceite monovarietal y otro para conocer el número total de esteroides y el contenido en eritrodiol + uvaol (Tabla x). Éste último sólo se ha analizado de forma simple, pues el interesante para caracterizar variedades es el primero.

Tabla 26. Resumen de los datos obtenidos en un único análisis de cuantificación de los esteroides totales y del eritrodiol + uvaol

Varietal	Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol + uvaol (% en peso)
Arbequina convencional	1329,612	2,553
Manzanilla Cacereña	1148,427	1,055
Koroneiki	1253,490	2,555
Arbequina ecológica	1255,390	3,019
Arróniz	1200,683	2,359
Arbosana	1689,162	2,401

En la tabla anterior se muestran los resultados del análisis simple realizado para comprobar que la suma de todos los esteroides superan los 1000 mg/kg, límite marcado por las exigencias de la clasificación para virgen extra. Como se supera en todos los casos el análisis estadístico de los esteroides se centra en su perfil, en la composición de cada esteroide con respecto al total de esteroides.

En la tabla 27 están resumidos todos los resultados obtenidos del análisis de la composición en esteroides.

Tabla 27. Media y desviación típica de la composición de esteroides expresados en porcentaje del total de esteroides

	Arbequina (% del total de esteroides)	Manzanilla (% del total de esteroides)	Koroneiki (% del total de esteroides)	Arbequina eco. (% del total de esteroides)	Arróniz (% del total de esteroides)	Arbosana (% del total de esteroides)
Colesterol	0,237 ± 0,011d	0,115 ± 0,014a	0,197 ± 0,012c	0,153 ± 0,006b	0,159 ± 0,011b	0,186 ± 0,012c
24-metilcolesterol	0,342 ± 0,027b	0,266 ± 0,027a	0,371 ± 0,015bc	0,396 ± 0,014c	0,263 ± 0,011a	0,279 ± 0,020a
Campesterol	3,351 ± 0,008d	2,401 ± 0,026a	3,353 ± 0,017d	3,212 ± 0,023c	2,608 ± 0,047b	3,230 ± 0,022c
Campestanol	0,563 ± 0,014c	0,502 ± 0,016b	0,491 ± 0,013b	0,582 ± 0,008c	0,475 ± 0,015b	0,386 ± 0,023a
Δ⁷-estigmasterol	0,671 ± 0,017c	0,484 ± 0,011a	0,492 ± 0,010a	0,674 ± 0,019c	0,711 ± 0,016d	0,572 ± 0,024b
Δ⁷-campesterol	0,126 ± 0,005cd	0,107 ± 0,012ab	0,127 ± 0,011cd	0,139 ± 0,004d	0,091 ± 0,014a	0,118 ± 0,012bc
Δ^{5,23}-estigmastadienol			0,054 ± 0,005			
Clerosterol	0,889 ± 0,017bc	1,064 ± 0,056d	0,87 ± 0,015b	0,918 ± 0,007c	0,882 ± 0,010bc	0,785 ± 0,010a
β-sitosterol	74,791 ± 0,258b	79,055 ± 0,141d	78,819 ± 0,077d	73,749 ± 0,110a	79,959 ± 0,323e	76,598 ± 0,318c
Sitostanol	0,663 ± 0,020d	0,385 ± 0,039a	0,56 ± 0,017c	0,62 ± 0,021d	0,461 ± 0,025b	0,544 ± 0,018c
Δ⁵-avenasterol	16,662 ± 0,261d	14,089 ± 0,101b	12,942 ± 0,023a	17,96 ± 0,134e	12,855 ± 0,238a	16,018 ± 0,284c
Δ^{5,24}-estigmastadienol	0,923 ± 0,031d	0,817 ± 0,015c	0,701 ± 0,025b	0,934 ± 0,015d	0,636 ± 0,007a	0,655 ± 0,019a
Δ⁷-estigmastenol	0,111 ± 0,018b	0,117 ± 0,018b	0,275 ± 0,008d	0,134 ± 0,012bc	0,148 ± 0,009c	0,073 ± 0,010a
Δ⁷-avenasterol	0,669 ± 0,023c	0,599 ± 0,017b	0,747 ± 0,017d	0,529 ± 0,034a	0,752 ± 0,015d	0,569 ± 0,029ab
BETASITOSTEROL APARENTE (*)	93,929 ± 0,043a	95,409 ± 0,020e	93,946 ± 0,033a	94,181 ± 0,036b	94,793 ± 0,072d	94,599 ± 0,031c

Para cada carácter analizado valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)

(*) El betasitosterol aparente es la suma de $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ^5 -avenasterol y $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol.

Se ha analizado la composición en esteroides de todos que forman este grupo y que se han nombrado ya previamente, pero todos los resultados más relevantes para la caracterización del aceite son el contenido en Campesterol, β -sitosterol y Δ^5 -avenasterol porque son los componentes mayoritarios en todos los aceites de oliva vírgenes.

También han sido procesados los datos con el programa estadístico y con las letras que siguen a cada valor con la desviación estándar sabemos qué aceites tienen diferencias significativas en lo que respecta a cada uno de los esteroides.

La siguiente gráfica (Figura 52) nos sirve para ver las diferencias entre aceites en el contenido de campesterol. Los valores más altos corresponden a los aceites elaborados con variedad Arbequina convencional y con variedad Koroneiki, además éstos no presentan diferencias significativas entre ellos. Con valores ligeramente inferiores pero significativamente diferentes a los anteriores están los aceites de Arbequina ecológica y Arbosana, que entre ellos no presentan apenas diferencias. Los resultados del porcentaje de campesterol en Manzanilla Cacereña y en Arróniz presentan diferencias entre sí y con todos los demás. El primero es el que tiene el porcentaje más bajo.

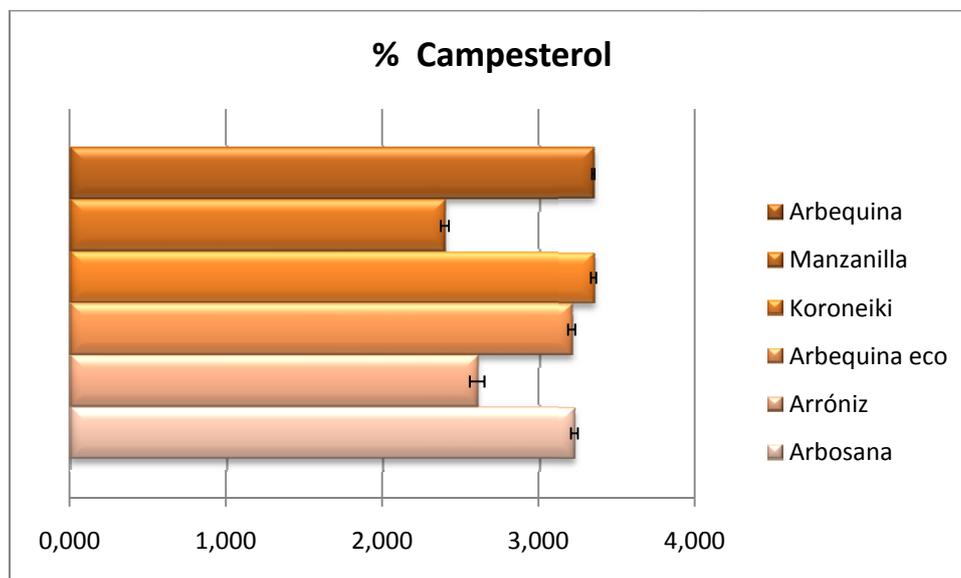


Figura 52. Media del porcentaje de campesterol en las variedades estudiadas

El campesterol está relacionado con la regulación del colesterol LDL en el organismo, hecho que se está estudiando para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas, y además tiene una fuerte componente varietal. Por esto es tan importante analizarlo.

El siguiente esteroide analizado es el β -sitosterol. También es otro fitosteroide que regula el colesterol LDL y de los esteroides del aceite de oliva es el más abundante. Los

datos obtenidos de los diferentes informes y cromatogramas determinan el porcentaje de β -sitosterol desde el 73,749% del aceite de Arbequina ecológica hasta el 79,959% de la variedad Arróniz.

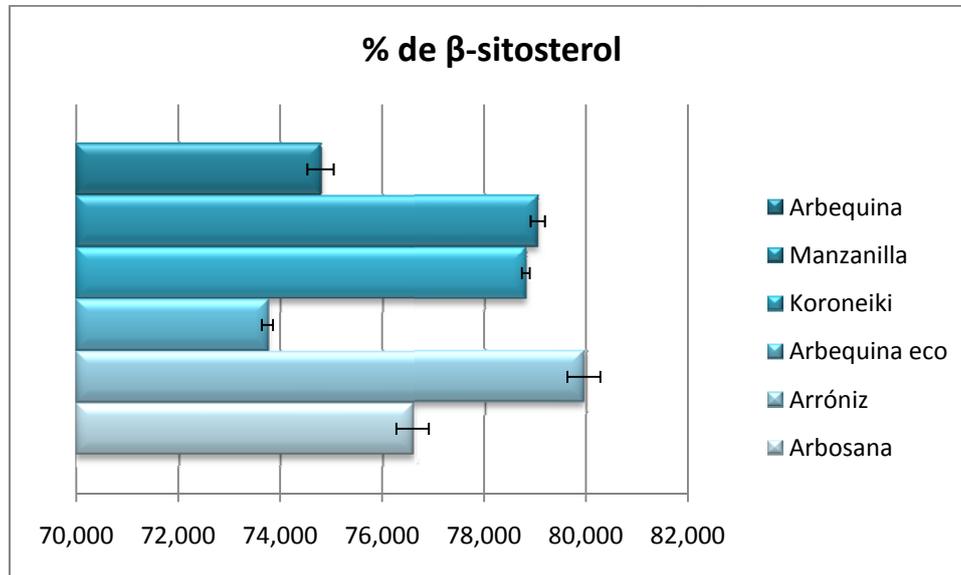


Figura 53. Media del porcentaje de β -sitosterol en las variedades estudiadas

Las diferencias en el contenido de β -sitosterol entre los aceites estudiados son notables y caracterizan a cada variedad con un perfil determinado de esteroides. Se puede observar en la gráfica anterior (Figura 53) cómo los dos aceites de la misma variedad, como son los elaborados con Arbequina, aunque en el análisis estadístico muestran diferencias significativas, tienen los valores más bajos de β -sitosterol y gráficamente se ve cómo los demás tienen valores más distantes.

También destaca en análisis estadístico del β -sitosterol que los aceites elaborados con Manzanilla y con Koroneiki no muestran diferencias significativas entre ellas y todas las demás sí que se diferencian entre sí significativamente. El aceite elaborado con Arróniz tiene el valor más alto de este componente, con un $79,959 \pm 0,323\%$.

El segundo esteroide más mayoritario en el aceite es el Δ^5 -avenasterol, ya que los resultados obtenidos van desde el $12,855 \pm 0,238\%$ de la variedad Arróniz hasta el $17,96 \pm 0,134\%$ de la variedad Arbequina ecológica.

De nuevo, los esteroides quedan claramente marcados por la variedad utilizada en el aceite, pues los dos elaborados con Arbequina, aunque con diferencias significativas, son los que más destacan entre los demás.

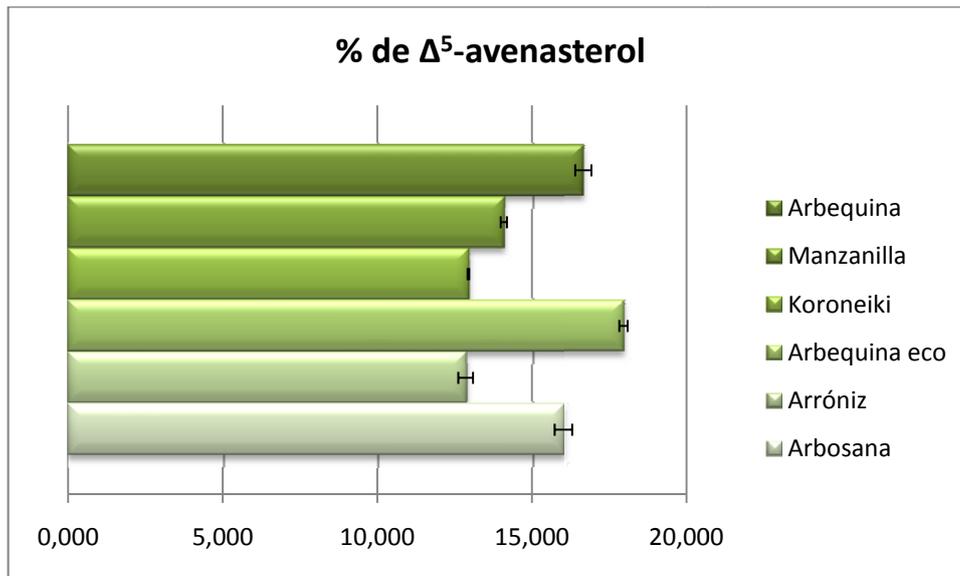


Figura 54. Media del porcentaje de Δ^5 -avenasterol en las variedades estudiadas

En cuanto al análisis estadístico de los datos, los aceites obtenidos de las variedades Koroneiki y Arróniz son los únicos que no presentan diferencias significativas entre sí.

Se observa, por tanto, una clara influencia de la variedad en el perfil de esteroides del aceite, porque aparte de los tres fitosteroides comentados, también hay una relación importante entre la composición de los dos aceites que provienen de la misma variedad, pues no muestran diferencias significativas en siete de los esteroides analizados (Campestanol, Δ^7 -estigmasterol, Δ^7 -campesterol, Clerosterol, Sitostanol, $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol y Δ^7 -estigmastenol).

También se podría decir que los perfiles de los aceites obtenidos de Manzanilla Cacereña y Arróniz se asemejan ligeramente.

5.1. Caracterización de los aceites según análisis sensorial

Los aceites se cataron según la ficha de cata oficial y se procesaron tal y como indica el reglamento mencionado anteriormente.

Los resultados numéricos se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Resultados del panel de cata según la ficha oficial del Reglamento (CE) Nº 640/2008

		Arbequina convencional	Manzanilla cacereña	Koroneiki	Arbequina ecológico	Arróniz	Arbosana
Resultado	Mediana del frutado	5,6	4,5	4,6	5,6	4,7	5,0
	Mediana del amargo	3,5	1,9	2,7	6,6	3,8	1,6
	Mediana del picante	4,0	2,5	2,7	3,3	3,8	2,4
	Mediana del defecto más intenso	0	0	0	0	0	0
Etiquetado facultativo	Frutado	Verde medio	Maduro medio	Maduro medio	Verde medio	Maduro medio	Maduro medio
	Amargo	Medio	Ligero	Ligero	Medio	Medio	Ligero
	Picante	Medio	Ligero	Ligero	Medio	Medio	Ligero

Es destacable de estos resultados que los aceites de Arbequina sean los más frutados, ya que son los que se recogen con un índice de madurez más bajo y eso puede influir en ese parámetro.

En el panel se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo para obtener los matices o notas olfato-gustativas y están ordenadas por orden de mayor a menor número de veces que aparecían en las fichas de cata descriptiva de los panelistas:

- **Arbequina Convencional:** Tomate, hierbas, especias, hoja, menta, plátano verde, manzana.
- **Manzanilla cacereña:** Hierba, romero, tomillo, plátano, café.
- **Koroneiki:** Café, regaliz, anís, verdura, plátano.
- **Arbequina ecológico:** Hierba verde, hoja verde, laurel, pimienta, plátano, alcachofa.
- **Arróniz:** Fresa, tomate maduro, macedonia, café, hierba, nuez verde, espárrago.
- **Arbosana:** Plátano verde, hierba, especias, canela, alcachofa.

Hay que destacar que estos análisis descriptivos son totalmente subjetivos y que son matices que pertenecen a opiniones del panel de cata.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

- Estudiando todos los parámetros analizados, los factores que más caracterizan a los aceites según la variedad son la composición en ácidos grasos y la composición en esteroides.
- Los demás parámetros sólo determinan la pureza de un virgen extra porque no hay similitudes ni diferencias claras que sigan un patrón.
- Atendiendo a éstos parámetros se observa que los Aceites elaborados con Arbequina (tanto el ecológico como el convencional) tienen perfiles muy parecidos, pero en otros en los que influyen otros factores externos a la genética tienen diferencias.
- Se han encontrado parámetros ligeramente relacionados entre sí, como el dato de la K_{232} con resultado obtenido del contenido en ácido linoleico. Aunque no se pueda encontrar una correlación clara sí que se ve en las gráficas que siguen una proporcionalidad. Puede deberse a que la oxidación afecta a los que más contenido en poliinsaturados tienen.
- La conservación de los aceites está relacionada con los parámetros de acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{270} y ΔK . El que presenta los índices conjuntos más bajos de esos cuatro parámetros es el aceite de Arróniz, que está descrito por los autores como una variedad estable.
- Atendiendo a los perfiles de ácidos grasos los aceites monovarietales que más se parecen entre sí, después de los Arbequinas entre ellos, son el Koroneiki y el Arbosana, puesto que no presentan diferencias significativas en siete de los ácidos grasos estudiados
- Los aceites que más se parecen, excluyendo el Arbequina, en cuanto a la composición de esteroides, son de nuevo el Koroneiki y el Arbosana, porque no presentan diferencias significativas en tres de los fitosteroides. Aunque eso no sea mucha similitud, en la composición de los demás esteroides no varían apenas.
- Si la variedad influye en los dos parámetros anteriores se podría decir que las variedades de aceitunas Koroneiki y Arbosana se parecen entre sí en el aspecto químico.

- No se han encontrado relaciones entre los análisis químicos con los valores de cata para atribuirlos a uno u otro factor.
- A nivel nutritivo, los aceites más saludables son los que presentan el mayor número de ácidos grasos insaturados. Éstos son el aceite elaborado a partir de aceitunas Arróniz y Koroneiki.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

- ALBA MENDOZA, J., HIDALGO CASADO, F., RUIZ GÓMEZ, M. A., MARTÍNEZ ROMÁN, F., MOYANO PÉREZ, M. J., CERT VENTULÁ, A., PÉREZ-CAMINO, M. C., Y RUIZ MÉNDEZ, M. V. (1996). “Características de los aceites de oliva de primera y segunda centrifugación”. *Grasas y aceites*, 47, pp. 163-181.

- ALBA, J. (2008). “Elaboración de aceite de oliva virgen”. En: BARRANCO, D., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, D. Y RALLO, L. *El cultivo del olivo*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, 6ª ed. pp. 534-569.

- APARICIO, R. Y HARWOOD, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. 1ª ed. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 614 p. I.S.B.N.: 84-89922-41-1 (A. Madrid Vicente, Ediciones), 84-8476-038-3 (Ediciones Mundi-Prensa)

- APARICIO, R., MORALES, M. T. Y ALONSO, V. (1997). “Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes and consumers’ attitudes”. *J Agric Food Chem*, 45, pp. 1.076-1.083.

- BARRANCO, D. (2008). “Variedades y patrones”. En: BARRANCO, D., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, D. Y RALLO, L. *El cultivo del olivo*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, 6ª ed. pp. 61-89.

- BRADLEY, D. G. Y MIN, D. B. (1992), “Singlet oxygen oxidation of foods”. *Crit rev Food Sci Nutr*, 31, pp. 211-236.

- CIVANTOS, L. *Obtención del aceite de oliva virgen*. 3ª Edición. Madrid: Editorial Agrícola Española, S. A., 2008. 260 p. I.S.B.N.: 978-84-85441-93-8.

- Comisión del Codex Alimentarius (1993). *Grasas y aceites y productos derivados*, vol. 8. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Roma.
- DOLADO, CH. "Aceite de Navarra. Un producto con sello propio y una nueva Denominación". *Navarra agraria*. (Julio-Agosto 2007)
- GRACIANI, E. (2006). *Los aceites y grasas: composición y propiedades*. 1ª ed. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, 2006. I.S.B.N.: 84-87440-36-3 (A. Madrid Vicente, Ediciones), 84-8476-272-6 (Ediciones Mundi-Prensa).
- LIZAR, B., GARNICA, J. J., SÁEZ, R., AMÉZQUETA, J. Y CARRO, F. J. "Arróniz. El olivo del norte". *Navarra Agraria* (Mayo-Junio, 2007)
- LIZAR, B., SANTOS, A., ESLAVA, V. Y ARMESTO, A. P. "Variedades de olivo en Navarra". *Navarra Agraria*. (Marzo-Abril 2008).
- PAGANUZZI, V. (1987). "Utilidad de la determinación de esteroides y eritrodioles para individualizar el origen de los aceites de oliva vírgenes por métodos quimiométricos". *Olivae*, 16, pp. 19-22.
- RAMÍREZ-TORTOSA, M. C., GRANADOS, S. Y QUILES, J. L. (2006). "Chemical composition, types and characteristics of olive oil". En: QUILES, J. L., RAMÍREZ-
- Reglamento (CEE) nº 2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991
- Reglamento (CE) nº 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008.

- Reglamento (CE) nº 702/2007 de la Comisión de 21 de junio de 2007.

- Reglamento (CE) nº 796/2002 de la Comisión de 6 de mayo de 2002.

- Reglamento (CE) nº 1513/2001 del Consejo de 23 de julio de 2001.

- Resolución del 22 de mayo de 2008 de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la denominación de origen protegida “Aceite de Navarra”.

- SANCHEZ, J. et al. “CONTENIDO EN ESTEROLES DE SIETE VARIEDADES DE ACEITUNA PRODUCIDAS EN LA REGIÓN EXTREMEÑA”. *Foro de la Tecnología Oleícola y la Calidad*

- SANTOS, A., LIZAR, B. Y GARNICA, J. J. “Guía práctica para las nuevas plantaciones de olivo”. *Navarra agraria*. (Noviembre-Diciembre 2008)

- TORTOSA, M. C. Y YACOOB, P. *Olive oil & health*. Oxfordshire: CABI Publishing, 1ª ed. pp. 45-61.

- TSIMIDOU, M., PAPADOPOULOS, G. Y BOSKOU, D. (1992). “Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed phase HPLC with emphasis on UV detection”. *Food Chem.*, 44, pp. 53-60.

7. Anexos

Tabla 1. Hoja de cálculo utilizada para la acidez libre

	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso de Aceite (g)	15,735	15,600	12,472	12,354	15,976	15,554	12,442	12,369	15,650	12,252	12,186	15,670	13,907	13,090	15,964	12,209	12,172	15,822
Volumen gastado (ml)	4,880	4,380	3,520	4,100	5,260	5,100	4,360	4,250	5,000	2,600	2,650	3,650	3,400	3,500	4,150	2,850	2,800	3,800
N (KOH)	0,018			0,018			0,018			0,018			0,018			0,018		
Resultado replica	0,161	0,146	0,146	0,172	0,171	0,170	0,182	0,178	0,166	0,110	0,113	0,121	0,127	0,139	0,135	0,121	0,119	0,125
Acidez (% ac. Oléico)	0,151			0,171			0,175			0,115			0,133			0,122		

Tabla 2. Hoja de cálculo utilizada para los índices de peróxidos

	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso de Aceite (g)	3,311	3,356	4,082	3,247	3,259	2,983	3,370	3,368	2,493	3,344	3,468	3,546	3,381	3,306	2,800	3,354	3,442	2,960
Volumen gastado (ml)	2,350	2,350	2,900	2,350	2,400	2,150	2,350	2,300	1,750	2,200	2,300	2,350	2,050	2,050	1,700	2,750	2,850	2,450
N (Na₂S₂O₃)	0,010			0,010			0,010			0,010			0,010			0,010		
Resultado replica	7,098	7,002	7,104	7,237	7,364	7,208	6,973	6,829	7,020	6,579	6,632	6,627	6,063	6,201	6,071	8,199	8,280	8,277
Ind. Peróxidos (meqO₂/Kg)	7,068			7,270			6,941			6,613			6,112			8,252		

Tabla 3. Hoja de cálculo para la K232

	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso aceite (mg)	47,000	49,000	45,000	46,000	48,000	48,000	45,000	45,000	49,000	47,000	50,000	46,000	47,000	46,000	48,000	49,000	44,000	52,000
Volumen matraz (ml)	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
Absorbancia	1,013	1,055	0,979	0,849	0,869	0,883	0,870	0,871	0,968	0,901	0,944	0,884	0,870	0,836	0,866	0,847	0,773	0,901
Resultado replica	2,155	2,153	2,176	1,846	1,810	1,840	1,933	1,936	1,976	1,917	1,888	1,922	1,851	1,817	1,804	1,729	1,757	1,733
K 232	2,16			1,83			1,95			1,91			1,82			1,74		

Tabla 4. Hoja de cálculo para la K270

	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso aceite (mg)	421,000	410,000	447,000	438,000	424,000	453,000	431,000	435,000	487,000	449,000	484,000	475,000	443,000	433,000	435,000	457,000	600,000	471,000
Volumen matraz (ml)	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000
Absorbancia	0,196	0,175	0,203	0,197	0,183	0,195	0,245	0,246	0,268	0,225	0,230	0,232	0,202	0,184	0,191	0,208	0,252	0,225
Resultado replica	0,116	0,107	0,114	0,112	0,108	0,108	0,142	0,141	0,138	0,125	0,119	0,122	0,114	0,106	0,110	0,114	0,105	0,119
K 270	0,112			0,109			0,140			0,122			0,110			0,113		

Tabla 5. Hoja de cálculo para la ΔK

	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Abs266	0,204	0,182	0,213	0,213	0,198	0,209	0,261	0,260	0,288	0,231	0,239	0,240	0,207	0,193	0,197	0,222	0,268	0,236
K266	0,121	0,111	0,119	0,122	0,117	0,115	0,151	0,149	0,148	0,129	0,123	0,126	0,117	0,111	0,113	0,121	0,112	0,125
Abs270	0,196	0,175	0,203	0,197	0,183	0,195	0,245	0,246	0,268	0,225	0,230	0,232	0,202	0,184	0,191	0,208	0,252	0,225
K270	0,116	0,107	0,114	0,112	0,108	0,108	0,142	0,141	0,138	0,125	0,119	0,122	0,114	0,106	0,110	0,114	0,105	0,119
Abs274	0,200	0,178	0,206	0,191	0,177	0,189	0,242	0,244	0,263	0,230	0,233	0,237	0,208	0,184	0,194	0,204	0,247	0,223
K274	0,119	0,109	0,115	0,109	0,104	0,104	0,140	0,140	0,135	0,128	0,120	0,125	0,117	0,106	0,111	0,112	0,103	0,118
Resultado replica	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002
ΔK	0,003			0,003			0,004			0,003			0,003			0,002		

Tabla 6. Hoja de cálculo para la humedad y los compuestos volátiles

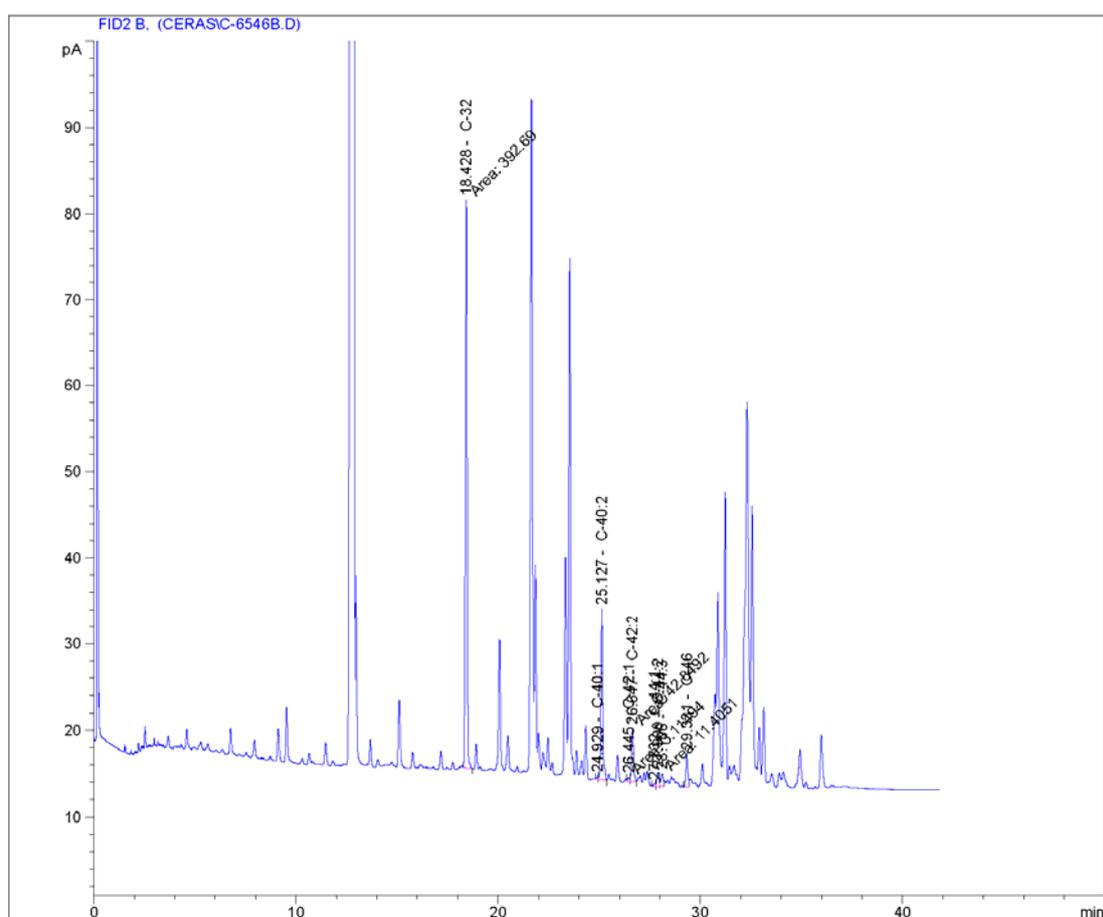
	Arbequina			Manzanilla C.			Koroneiki			Arbequina Ecol.			Arróniz			Arbosana		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Peso crisol	23,233	24,113	59,642	20,844	45,358	56,433	46,311	54,701	58,712	59,666	57,070	56,284	55,081	56,377	59,473	56,236	48,056	56,846
Peso crisol+ muestra hum	47,059	44,140	79,891	44,495	65,588	77,353	67,462	74,909	79,366	80,329	77,028	76,527	77,795	77,086	80,122	81,191	68,778	77,383
Peso crisol+ muestra seca	47,045	44,125	79,876	44,472	65,568	77,333	67,443	74,889	79,346	80,315	77,015	76,513	77,779	77,073	80,108	81,175	68,765	77,369
Resultado replica	0,059	0,075	0,074	0,097	0,099	0,096	0,090	0,099	0,097	0,068	0,065	0,069	0,070	0,063	0,068	0,064	0,063	0,068
Humedad (%)	0,069			0,097			0,095			0,067			0,067			0,065		

Resultados cromatográficos de las ceras:

1. Arbequina convencional

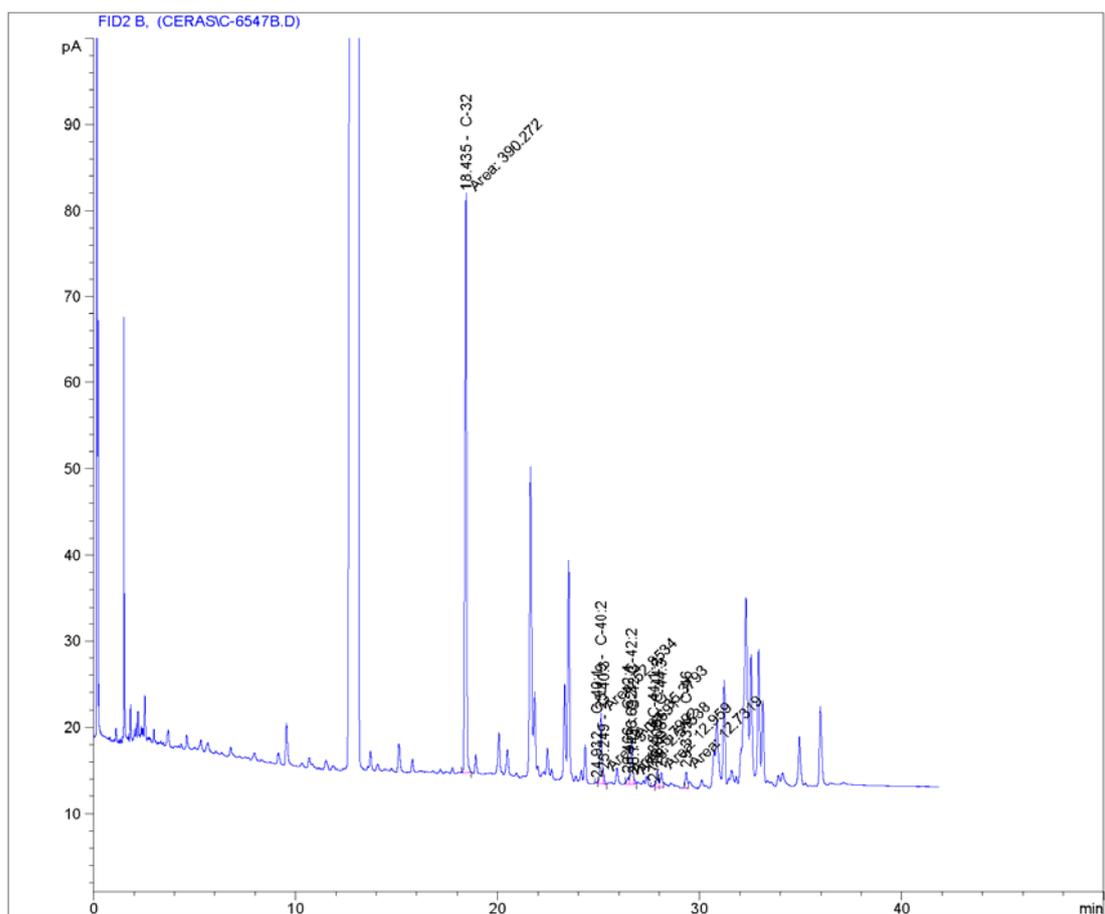
Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
18,428	MM I	392,69037	1,00000	199,240000		C-32
24,949	BV	1,53699	1,00000	0,779826	2	C-40:1
25,127	VP	125,70803	1,00000	63,780700	2	C-40:2
25,230					2	C-40:3
26,445	FM	3,11494	1,00000	1,580430	2	C-42:1
26,647	FM	42,84924	1,00000	21,740490	2	C-42:2
26,790					2	C-42:3
27,732	VV	1,63741	1,00000	0,830774	2	C-44:1
27,900	VV	10,86743	1,00000	5,513830	2	C-44:2
28,106	MF	11,40512	1,00000	5,786630	2	C-44:3
29,331	VV	25,39655	1,00000	12,885490	2	C-46
Totals without ISTD(s):		222,51571		112,898170		

:



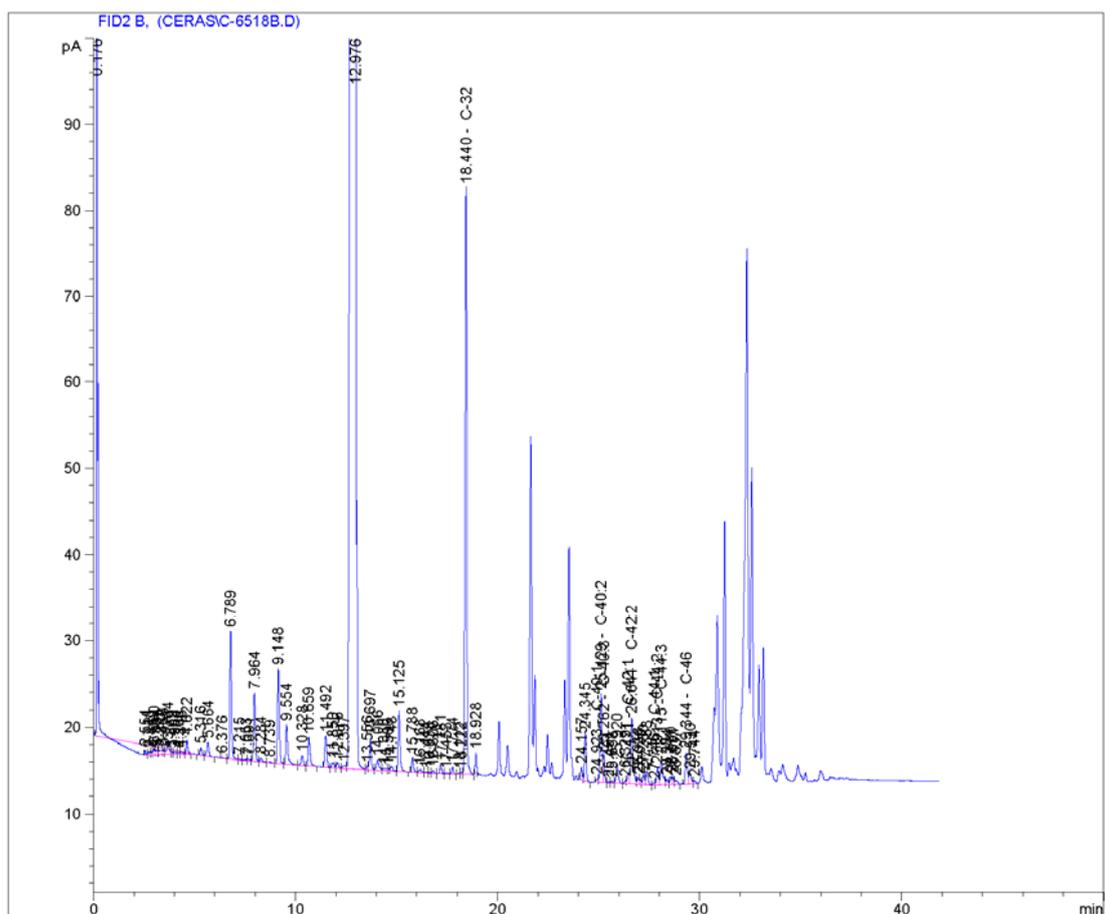
2. Manzanilla cacereña

Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
18,435	MM	390,27246	1,00000	198,760000		C-32
24,932	BV	1,10806	1,00000	0,564318	2	C-40:1
25,119	MF	52,85343	1,00000	26,917470	2	C-40:2
25,249	FM	5,06691	1,00000	2,580500	2	C-40:3
26,466	MF	5,79920	1,00000	2,953440	2	C-42:1
26,632	MF	35,37931	1,00000	18,018160	2	C-42:2
26,741	FM	2,51538	1,00000	1,281040	2	C-42:3
27,732	VV	1,38190	1,00000	0,703780	2	C-44:1
27,905	VV	13,37425	1,00000	6,811310	2	C-44:2
28,106	MF	12,95899	1,00000	6,599820	2	C-44:3
29,335	MF	12,73194	1,00000	6,484190	2	C-46
Totals without ISTD(s):		143,16937		72,914028		



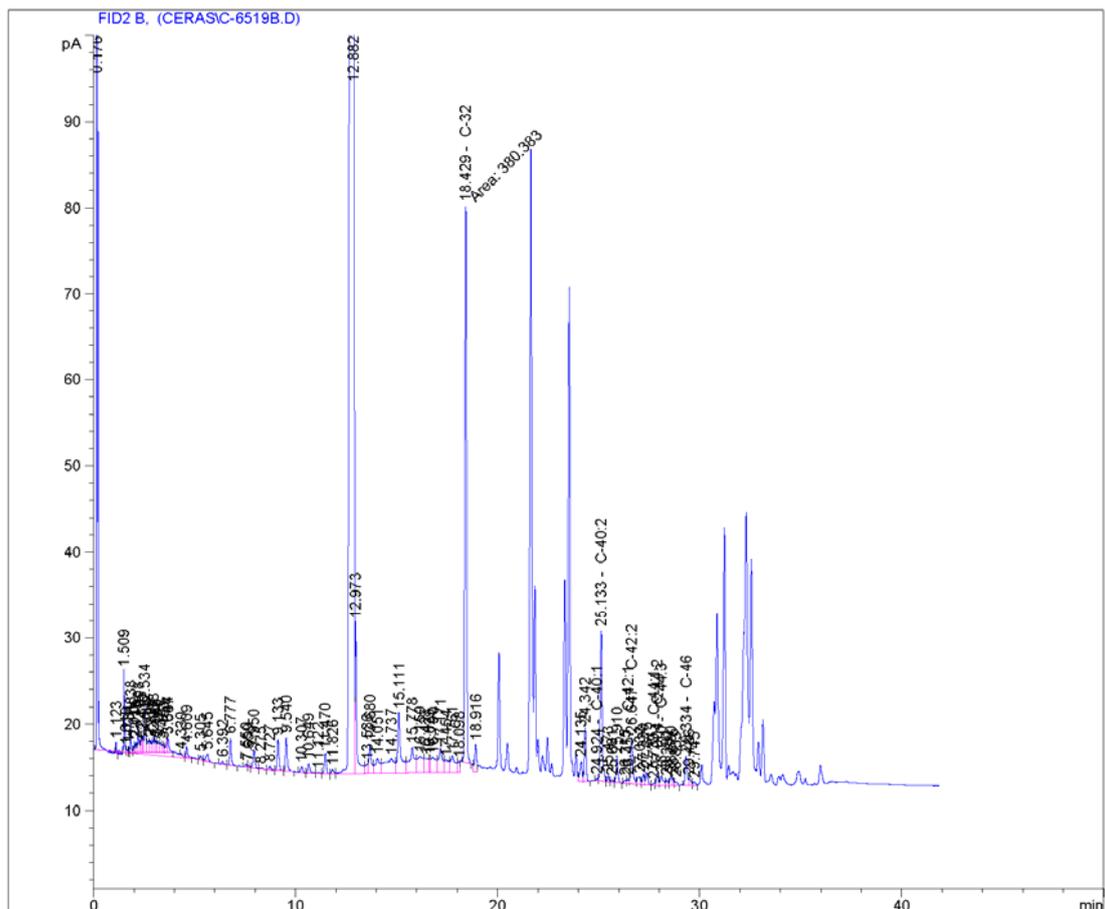
3. Koroneiki

Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
18,440	VP	409,18097	1,00000	197,860000		C-32
24,923	BV	2,36684	1,00000	1,144490	2	C-40:1
25,129	VV	68,81599	1,00000	33,276070	2	C-40:2
25,262	VP	17,53514	1,00000	8,479140	2	C-40:3
26,471	VV	8,78659	1,00000	4,248770	2	C-42:1
26,641	VV	57,81303	1,00000	27,955570	2	C-42:2
26,790					2	C-42:3
27,746	VV	1,43755	1,00000	0,695127	2	C-44:1
27,913	VV	14,05558	1,00000	6,796600	2	C-44:2
28,115	VV	26,10656	1,00000	12,623860	2	C-44:3
29,344	VV	25,28861	1,00000	12,228340	2	C-46
Totals without ISTD(s):		222,20589		107,447967		



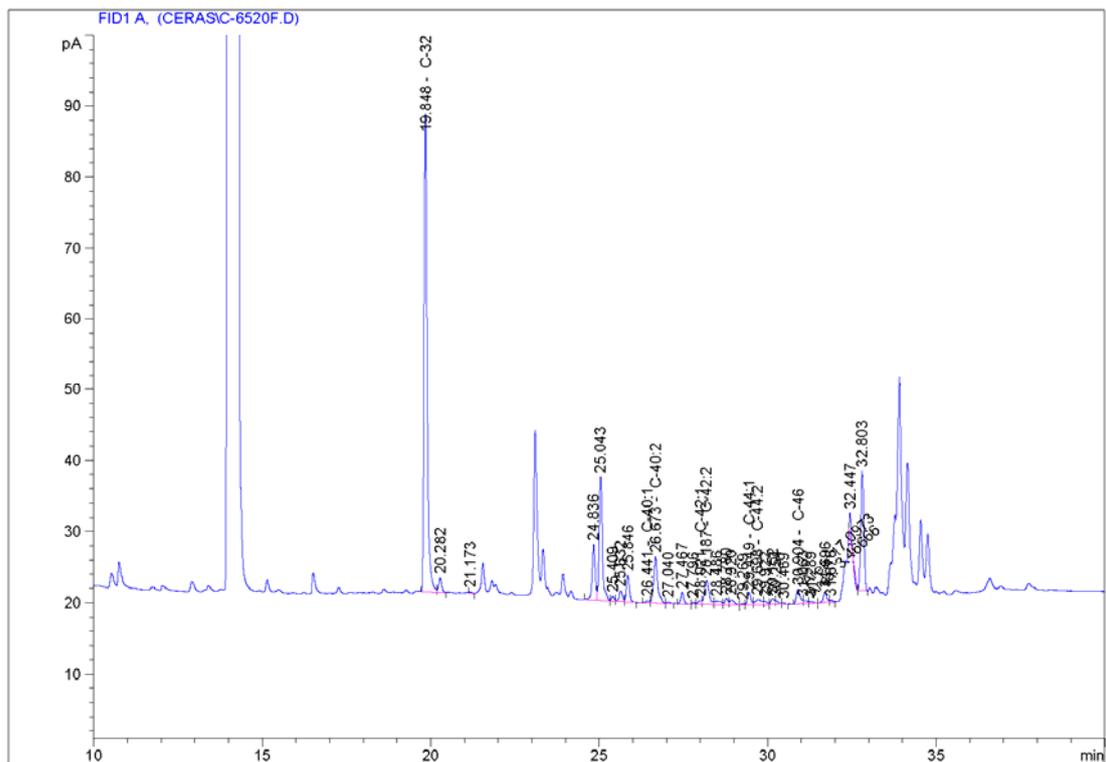
4. Arbequina ecológica

Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
18,429	MM	380,38330	1,00000	198,260000		C-32
24,924	PV	1,31515	1,00000	0,685469	2	C-40:1
25,133	VP	113,06666	1,00000	58,931600	2	C-40:2
25,230					2	C-40:3
26,457	VV	3,33116	1,00000	1,736240	2	C-42:1
26,647	VV	40,28068	1,00000	20,994740	2	C-42:2
26,790					2	C-42:3
27,739	VV	1,73141	1,00000	0,902430	2	C-44:1
27,904	VV	9,82436	1,00000	5,120560	2	C-44:2
28,110	VV	11,44283	1,00000	5,964130	2	C-44:3
29,334	VV	23,78904	1,00000	12,399110	2	C-46
Totals without ISTD(s):		204,78129		106,734279		



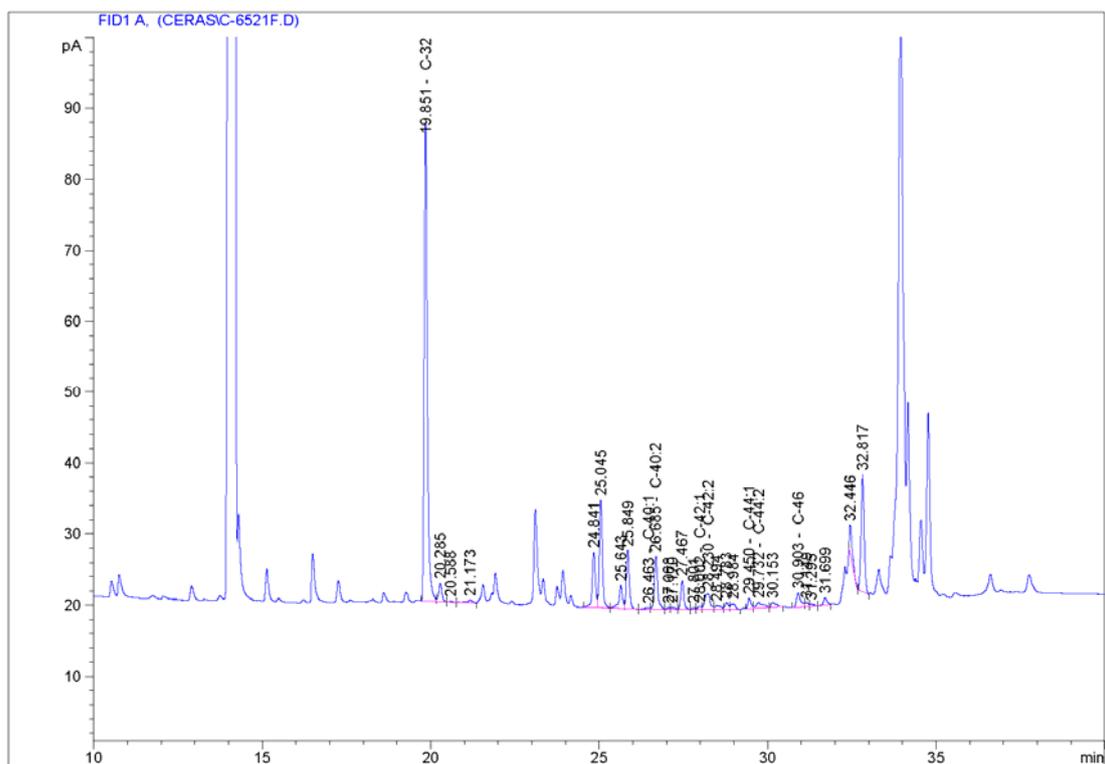
5. Arróniz

Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
19,848	VV +I	427,12881	1,00000	198,730000		C-32
26,441	BV	2,52470	1,00000	1,174670	2	C-40:1
26,673	VV	53,00409	1,00000	24,661180	2	C-40:2
26,803					2	C-40:3
28,021	VV	4,35948	1,00000	2,028330	2	C-42:1
28,187	VV	32,09958	1,00000	14,934960	2	C-42:2
28,360					2	C-42:3
29,449	VV	11,73078	1,00000	5,457970	2	C-44:1
29,698	VV	9,90922	1,00000	4,610460	2	C-44:2
29,837					2	C-44:3
30,904	MF	17,09733	1,00000	7,954860	2	C-46
Totals without ISTD(s):		130,72518		60,822430		



6. Arbosana

Retention time [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Group	Name
19,851	VV+I	431,77795	1,00000	197,670000		C-32
26,463	BV	2,08001	1,00000	0,952238	2	C-40:1
26,685	VV	50,01006	1,00000	22,894840	2	C-40:2
26,808					2	C-40:3
28,002	VV	2,84394	1,00000	1,301970	2	C-42:1
28,230	VV	24,51096	1,00000	11,221230	2	C-42:2
28,365					2	C-42:3
29,450	VV	9,35109	1,00000	4,280970	2	C-44:1
29,732	VV	11,46844	1,00000	5,250310	2	C-44:2
29,842					2	C-44:3
30,903	VV	17,21466	1,00000	7,880950	2	C-46
Totals without ISTD(s):		117,47916		53,782508		



Resultados cromatográficos de los ácidos grasos:

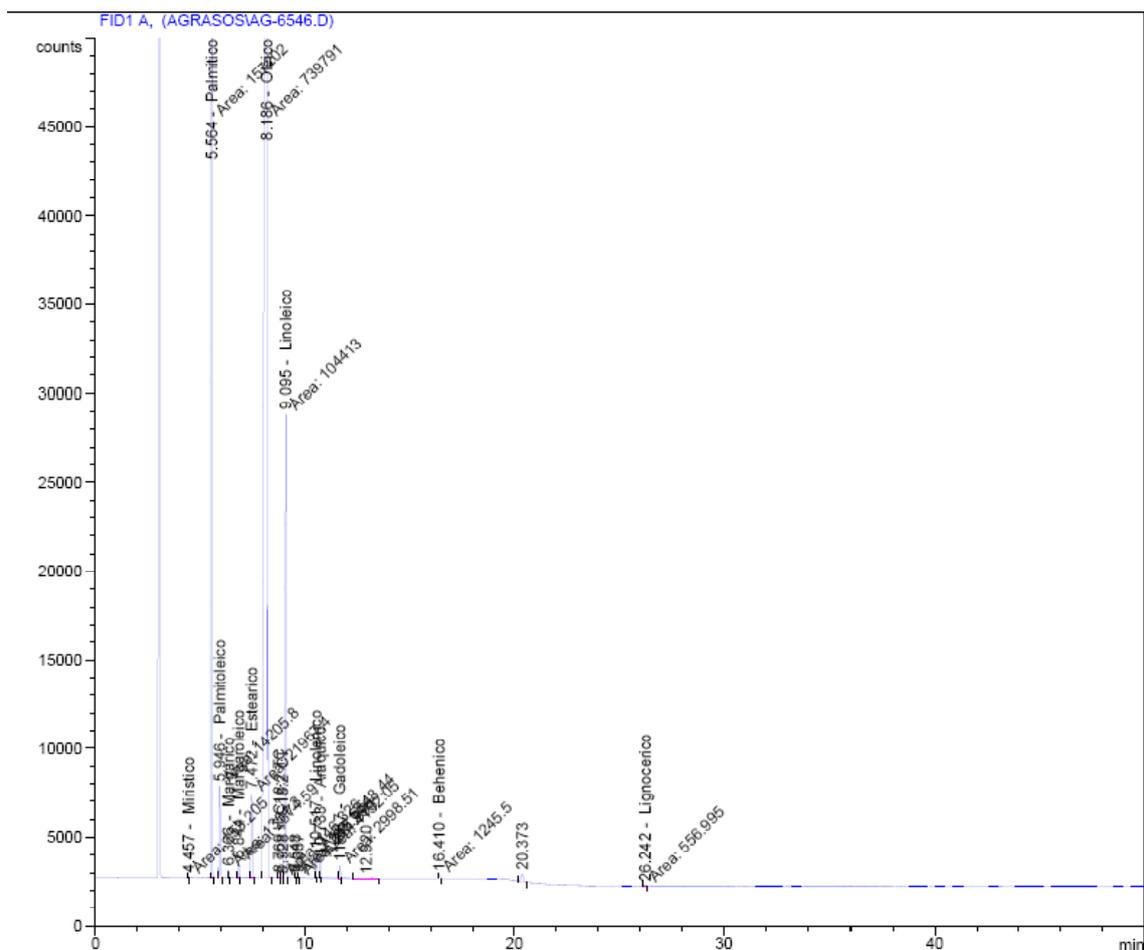
1. Arbequina convencional

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,457	MM	153,2054	1	0,0145		Mirístico
5,564	FM	157202	1	14,878769		Palmitico
5,946	MM	14205,8	1	1,344537		Palmitoleico
6,366	MF	1351,29773	1	0,127897		Margárico
6,844	MF	2674,59131	1	0,253143		Margaroleico
7,472	MF	21967,4	1	2,079161		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,186	MM	739791	1	70,019327	1	Oleico
8,769	BP	146,77975	1	0,013892	2	C18:2 TC
8,928	MM	146,32558	1	0,013849	2	C18:2 CT
9,095	MM	104413	1	9,882395	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,517	MF	5548,44482	1	0,525146	3	Linolénico
10,733	MF	4152,05176	1	0,392981		Aráquico
11,667	FM	2998,50732	1	0,283801		Gadoleico
16,41	FM	1245,49573	1	0,117883		Behenico
18,95						Erúcico
26,242	FM	556,9953	1	0,052718		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,462	MM	195,97569	1	0,018548		Mirístico
5,567	FM	157839,82087	1	14,938654		Palmitico
5,948	MM	14731,87116	1	1,394289		Palmitoleico
6,364	MF	1589,98326	1	0,150483		Margárico
6,848	MF	2394,51058	1	0,226627		Margaroleico
7,477	MF	23016,56692	1	2,178389		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,189	MM	741561,03652	1	70,184594	1	Oleico
8,773	BP	229,95551	1	0,021764	2	C18:2 TC
8,931	MM	134,44008	1	0,012724	2	C18:2 CT
9,099	MM	101995,19188	1	9,653273	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,522	MF	5583,79619	1	0,528475	3	Linolénico
10,731	MF	3342,46954	1	0,316346		Aráquico
11,667	FM	2613,34024	1	0,247338		Gadoleico

16,416	FM	905,93851	1	0,085742		Behenico
18,95		0,00000		0		Erúcico
26,248	FM	451,73305	1	0,042754		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,456	MM	151,5541145	1	0,014345		Mirístico
5,561	FM	152254,285	1	14,411273		Palmítico
5,946	MM	14745,33317	1	1,395685		Palmitoleico
6,369	MF	1401,270716	1	0,132634		Margárico
6,848	MF	2380,778323	1	0,225347		Margaroleico
7,477	MF	21623,23817	1	2,046697		Esteárico
7,88		0		0	1	Elaídico
8,188	MM	743301,6394	1	70,355477	1	Oleico
8,772	BP	184,4533486	1	0,017459	2	C18:2 TC
8,932	MM	196,1064812	1	0,018562	2	C18:2 CT
9,101	MM	104460,7838	1	9,887491	2	Linoleico
10		0		0	3	C18:3 TCC
10,15		0		0	3	C18:3 CCT
10,3		0		0	3	C18:3 TCT
10,518	MF	5781,527986	1	0,547237	3	Linolénico
10,733	MF	4380,574218	1	0,414633		Aráquico
11,671	FM	3438,223518	1	0,325437		Gadoleico
16,42	FM	1623,282439	1	0,153648		Behenico
18,95		0		0		Erúcico
26,25	FM	571,2993198	1	0,054075		Lignocérico



2. Manzanilla cacereña:

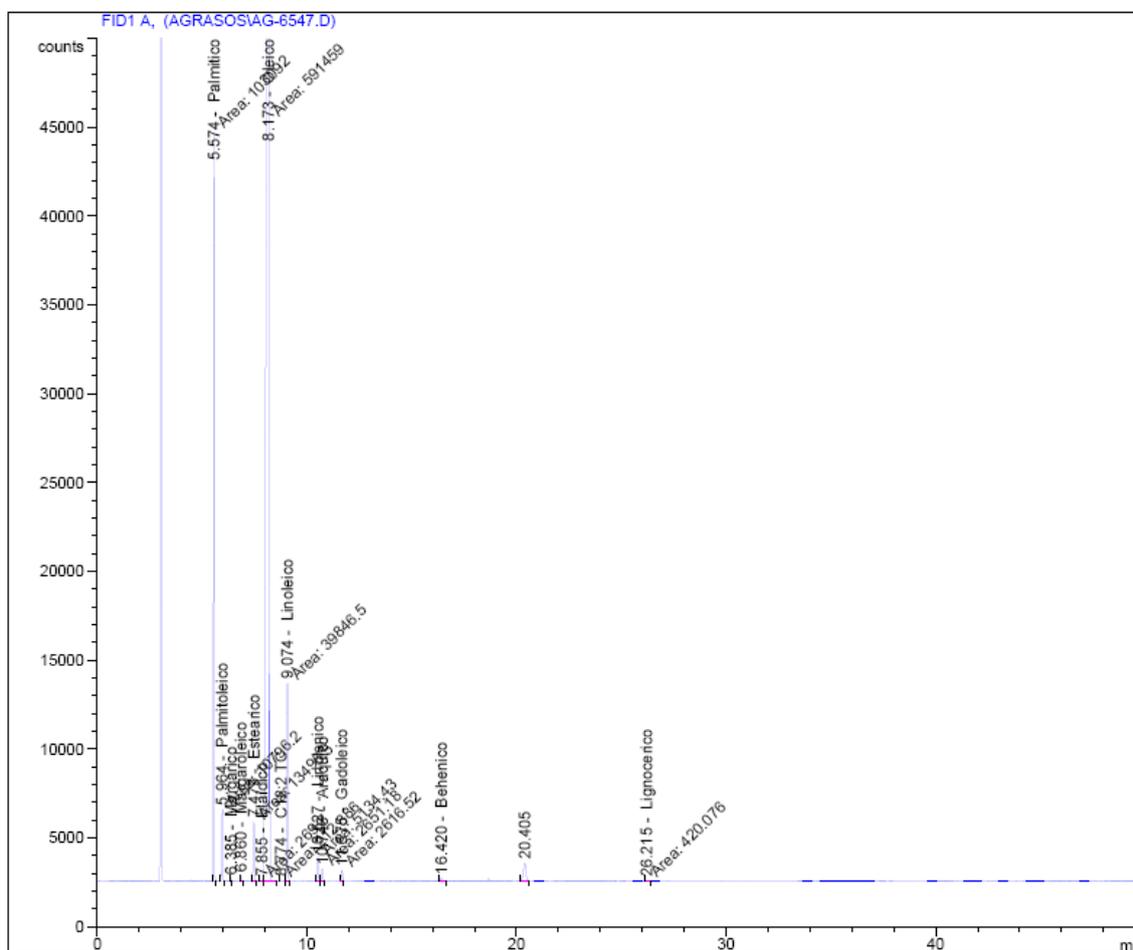
Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,530						Mirístico
5,574	MF	103092	1	13,352613		Palmítico
5,964	MM	10796,2	1	1,398328		Palmitoleico
6,385	BP	373,17999	1	0,048335		Margárico
6,860	BV	912,7652	1	0,118222		Margaroleico
7,479	MF	13496,5	1	1,748081		Esteárico
7,855	MF	269,69989	1	0,034932	1	Elaídico
8,173	FM	591459	1	76,606302	1	Oleico
8,774	MF	212,88571	1	0,027573	2	C18:2 TC
8,860					2	C18:2 CT
9,074	FM	39846,5	1	5,160961	2	Linoleico
10,000					3	C18:3 TCC
10,150					3	C18:3 CCT
10,300					3	C18:3 TCT
10,527	MF	5134,42725	1	0,665016	3	Linolénico
10,746	MF	2651,18481	1	0,343384		Aráquico
11,675	MF	2616,52417	1	0,338895		Gadoleico
16,420	BB	794,85559	1	0,102950		Behenico

18,950						Erúcico
26,215	FM	420,07611	1	0,054409		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,530						Mirístico
5,579	MF	105391,312	1	13,649542		Palmítico
5,966	MM	10150,0798	1	1,314567		Palmitoleico
6,389	BP	484,862629	1	0,062796		Margárico
6,862	BV	1048,41236	1	0,135783		Margaroleico
7,478	MF	13934,1795	1	1,804657		Esteárico
7,855	MF	276,443352	1	0,035803	1	Elaídico
8,175	FM	589342,828	1	76,327541	1	Oleico
8,779	MF	182,568585	1	0,023645	2	C18:2 TC
8,860					2	C18:2 CT
9,080	FM	39568,8087	1	5,124674	2	Linoleico
10,000					3	C18:3 TCC
10,150					3	C18:3 CCT
10,300					3	C18:3 TCT
10,530	MF	5276,95404	1	0,683434	3	Linolénico
10,747	MF	2739,91088	1	0,354854		Aráquico
11,679	MF	2623,04227	1	0,339718		Gadoleico
16,422	BB	747,284219	1	0,096783		Behenico
18,950		0				Erúcico
26,218	FM	356,744188	1	0,046203		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,526						Mirístico
5,569	MF	103624,181	1	13,423468		Palmítico
5,965	MM	10594,132	1	1,372363		Palmitoleico
6,386	BP	441,910111	1	0,057245		Margárico
6,860	BV	984,877873	1	0,127581		Margaroleico
7,482	MF	13604,6711	1	1,762348		Esteárico
7,857	MF	280,901827	1	0,036388	1	Elaídico
8,172	FM	590213,731	1	76,456239	1	Oleico
8,774	MF	159,595591	1	0,020674	2	C18:2 TC
8,860		0			2	C18:2 CT
9,078	FM	39637,4109	1	5,134627	2	Linoleico
10,000		0			3	C18:3 TCC
10,150		0			3	C18:3 CCT
10,300		0			3	C18:3 TCT
10,529	MF	6134,34071	1	0,794642	3	Linolénico
10,749	MF	2735,50425	1	0,354357		Aráquico

11,676	MF	2505,66005	1	0,324583		Gadoleico
16,423	BB	744,496373	1	0,096442		Behenico
18,950		0				Erúcico
26,217	FM	301,39744	1	0,039043		Lignocérico



3. Koroneiki

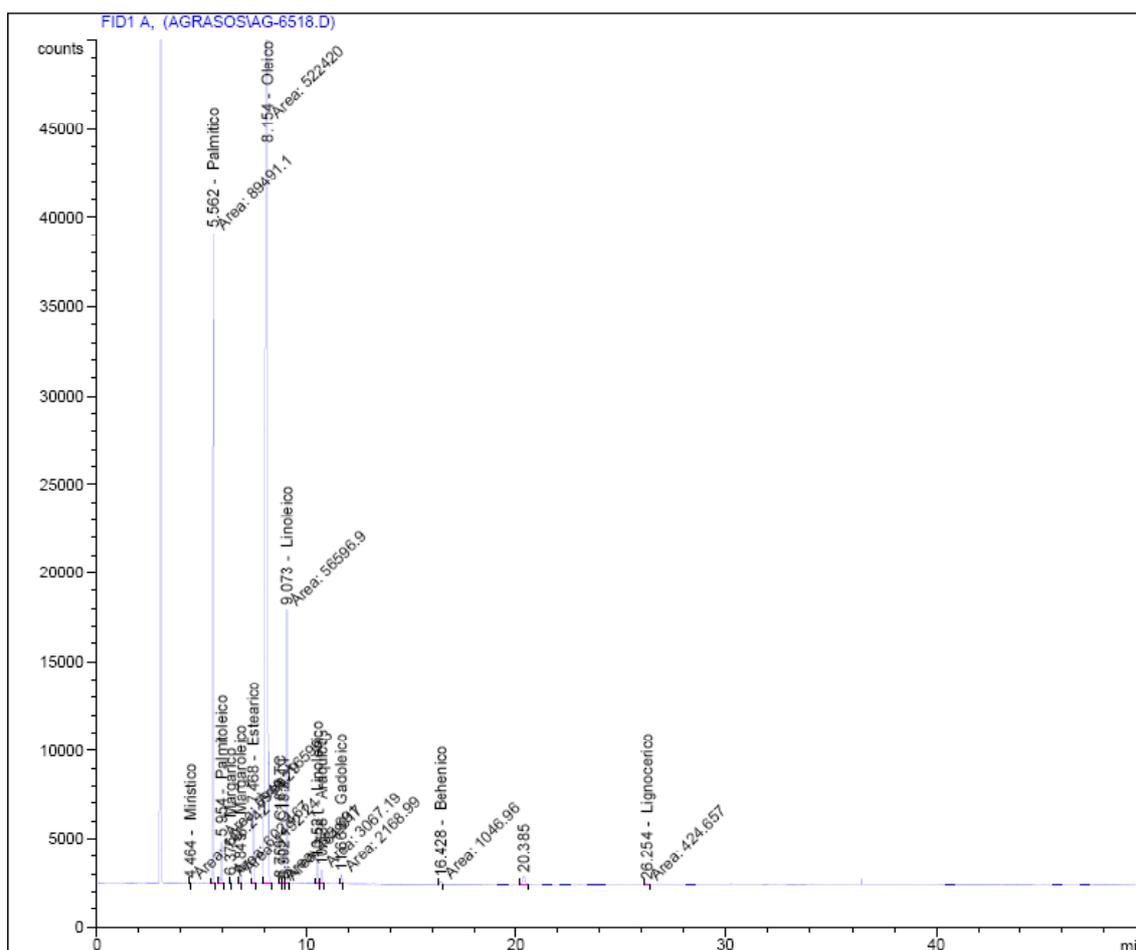
Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,464	MM	148,24182	1,00000	0,020998		Mirístico
5,562	MF	89491,10000	1,00000	12,675963		Palmítico
5,954	MM	6949,28564	1,00000	0,984332		Palmitoleico
6,376	MF	602,46667	1,00000	0,085336		Margárico
6,849	FM	1192,24182	1,00000	0,168875		Margaroleico
7,468	MF	16599,30000	1,00000	2,351206		Estearico
7,880					1	Eláidico
8,154	MM	522420,00000	1,00000	73,998135	1	Oleico
8,759	MF	235,69128	1,00000	0,033384	2	C18:2 TC
8,902	FM	164,01659	1,00000	0,023232	2	C18:2 CT
9,073	FM	56596,90000	1,00000	8,016664	2	Linoleico
10,000					3	C18:3 TCC

10,150					3	C18:3 CCT
10,300					3	C18:3 TCT
10,521	BV	4883,68311	1,00000	0,691749	3	Linolénico
10,738	MF	3067,19312	1,00000	0,434453		Aráquico
11,668	MF	2168,98706	1,00000	0,307226		Gadoleico
16,428	FM	1046,96033	1,00000	0,148297		Behenico
18,950						Erúcico
26,254	FM	424,65744	1,00000	0,060151		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,462	MM	166,06836	1,00000	0,023523		Mirístico
5,561	MF	88002,44540	1,00000	12,465237		Palmítico
5,949	MM	6521,60203	1,00000	0,923762		Palmitoleico
6,371	MF	736,85556	1,00000	0,104373		Margárico
6,850	FM	1232,45558	1,00000	0,174573		Margaroleico
7,469	MF	17391,72004	1,00000	2,463476		Estearico
7,880					1	Eláidico
8,156	MM	525485,60859	1,00000	74,433189	1	Oleico
8,762	MF	244,77134	1,00000	0,034671	2	C18:2 TC
8,906	FM	200,66859	1,00000	0,028424	2	C18:2 CT
9,077	FM	55310,83274	1,00000	7,834585	2	Linoleico
10,000					3	C18:3 TCC
10,150					3	C18:3 CCT
10,300					3	C18:3 TCT
10,522	BV	4401,57059	1,00000	0,623467	3	Linolénico
10,741	MF	3147,15188	1,00000	0,445783		Aráquico
11,667	MF	1805,48781	1,00000	0,255741		Gadoleico
16,429	FM	942,21894	1,00000	0,133462		Behenico
18,950		0,00000				Erúcico
26,256	FM	393,47253	1,00000	0,055734		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,463	MM	165,64084	1,00000	0,023462		Mirístico
5,565	MF	85669,98212	1,00000	12,134623		Palmítico
5,960	MM	7429,67145	1,00000	1,052367		Palmitoleico
6,378	MF	518,58954	1,00000	0,073455		Margárico
6,855	FM	950,82162	1,00000	0,134678		Margaroleico
7,469	MF	16136,83604	1,00000	2,285683		Estearico
7,880					1	Eláidico
8,154	MM	525505,66788	1,00000	74,434627	1	Oleico
8,762	MF	228,27682	1,00000	0,032334	2	C18:2 TC
8,904	FM	181,74461	1,00000	0,025743	2	C18:2 CT

9,077	FM	57241,42678	1,00000	8,107894	2	Linoleico
10,000					3	C18:3 TCC
10,150					3	C18:3 CCT
10,300					3	C18:3 TCT
10,523	BV	5037,02901	1,00000	0,713464	3	Linolénico
10,735	MF	3151,19304	1,00000	0,446347		Aráquico
11,669	MF	2451,48722	1,00000	0,347238		Gadoleico
16,431	FM	950,43332	1,00000	0,134623		Behenico
18,950		0,00000				Erúcico
26,253	FM	377,43971	1,00000	0,053462		Lignocérico



4. Arbequina ecológica

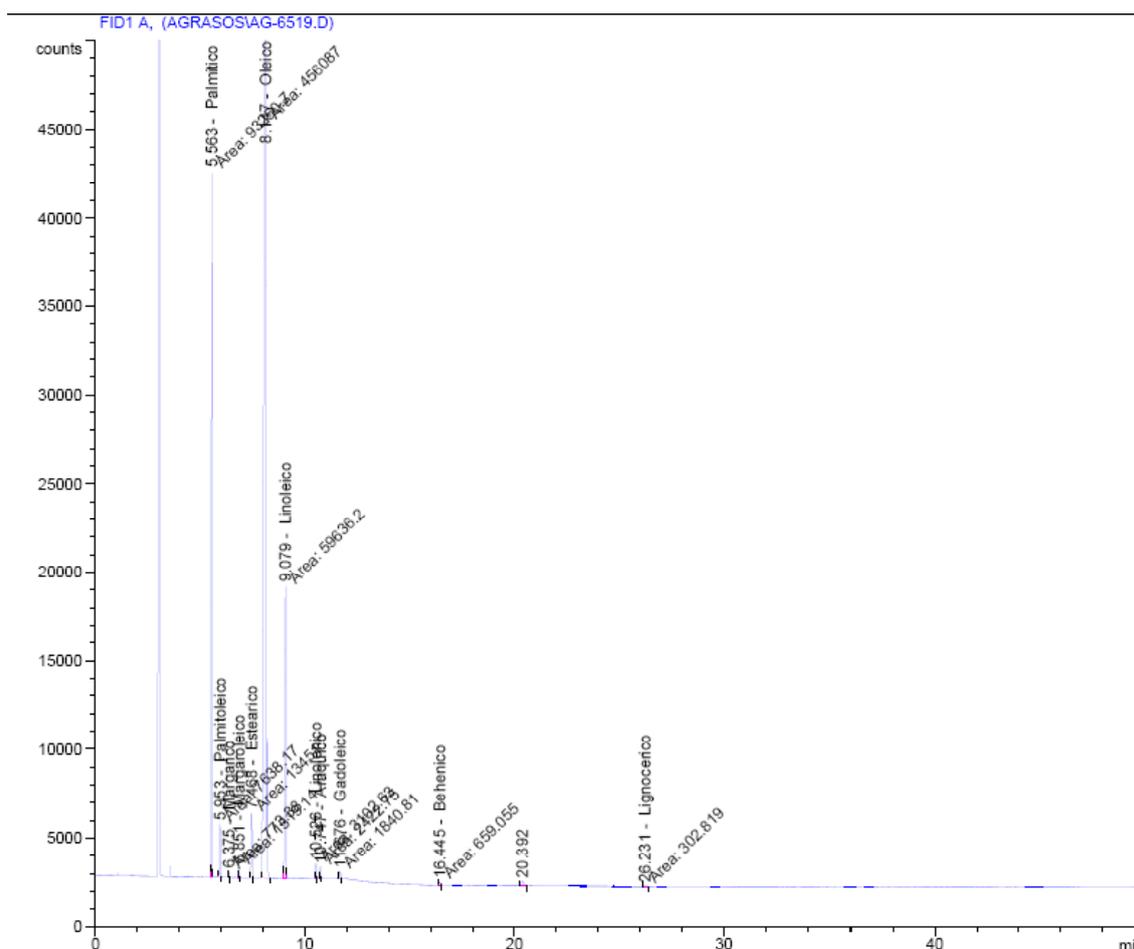
Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,563	MF	93250,7	1	14,554864		Palmítico
5,953	FM	7638,17285	1	1,19219		Palmitoleico
6,375	FM	773,38019	1	0,120712		Margárico
6,851	MF	1519,13611	1	0,237112		Margaroleico
7,468	MF	13451	1	2,099482		Esteárico

7,88					1	Eláidico
8,147	MF	456087	1	71,187566	1	Oleico
8,72					2	C18:2 TC
8,86					2	C18:2 CT
9,079	MF	59636,2	1	9,308201	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,526	FM	3102,63477	1	0,484269	3	Linolénico
10,747	MF	2422,75488	1	0,378151		Aráquico
11,676	MM	1840,81458	1	0,28732		Gadoleico
16,445	FM	659,05518	1	0,102867		Behenico
18,95						Erúcico
26,231	MF	302,81931	1	0,047265		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,565	MF	94722,34257	1	14,618934		Palmítico
5,952	FM	7462,051925	1	1,164858		Palmitoleico
6,371	FM	864,6145267	1	0,13497		Margárico
6,854	MF	1654,970984	1	0,258348		Margaroleico
7,47	MF	12714,59318	1	1,984802		Esteárico
7,88					1	Eláidico
8,15	MF	455116,9887	1	71,045695	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,86		0			2	C18:2 CT
9,076	MF	59727,54845	1	9,323724	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,528	FM	3230,821764	1	0,504345	3	Linolénico
10,751	MF	2328,501665	1	0,363489		Aráquico
11,673	MM	1810,187773	1	0,282578		Gadoleico
16,447	FM	726,450445	1	0,113402		Behenico
18,95		0				Erúcico
26,234	MF	238,4880656	1	0,037229		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,558	MF	91530,35007	1	14,484071		Palmítico
5,951	FM	7327,695438	1	1,143789		Palmitoleico
6,371	FM	670,095299	1	0,104596		Margárico

6,85	MF	1630,764257	1	0,254548		Margaroleico
7,467	MF	13539,92783	1	2,113464		Esteárico
7,88		0			1	Elaídico
8,149	MF	456169,6171	1	71,204077	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,86		0			2	C18:2 CT
9,082	MF	61460,71082	1	9,593478	2	Linoleico
10		0			3	C18:3 TCC
10,15		0			3	C18:3 CCT
10,3		0			3	C18:3 TCT
10,529	FM	3033,411919	1	0,473489	3	Linolénico
10,745	MF	2619,314345	1	0,408852		Aráquico
11,674	MM	1893,918053	1	0,295624		Gadoleico
16,443	FM	552,3436489	1	0,086216		Behénico
18,95		0				Erúcico
26,235	MF	222,8312239	1	0,034782		Lignocérico



5. Arróniz

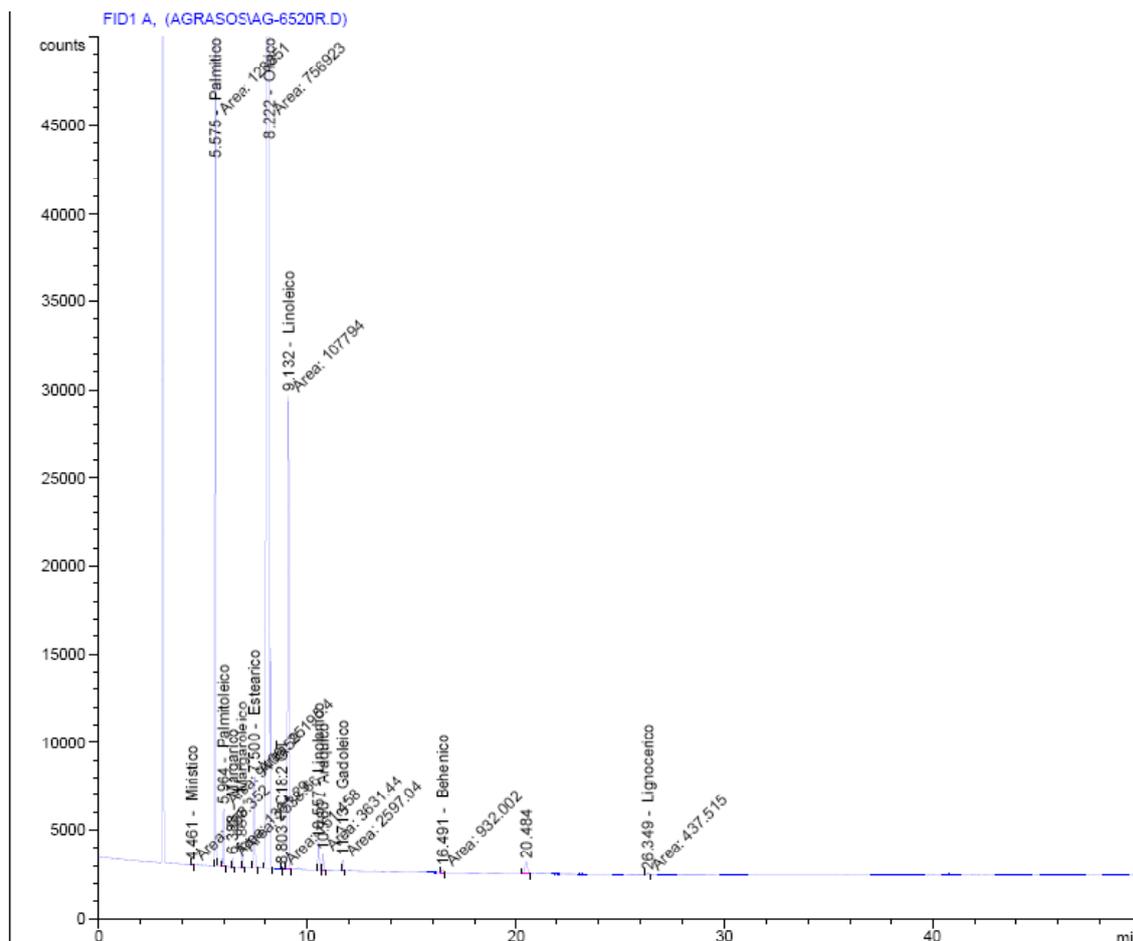
Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
----------------	------	------	----------	--------	-------	------

4,461	MM	158,35201	1	0,015146		Mirístico
5,575	MF	128351	1	12,276154		Palmítico
5,964	MM	9409,58594	1	0,899981		Palmitoleico
6,388	MF	1361,2948	1	0,130201		Margárico
6,866	FM	2538,66284	1	0,242811		Margaroleico
7,5	FM	25195,4	1	2,409817		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,222	MF	756923	1	72,395936	1	Oleico
8,72					2	C18:2 TC
8,803	MF	151,45753	1	0,014486	2	C18:2 CT
9,132	FM	107794	1	10,309933	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,557	BV	6051,80273	1	0,578825	3	Linolénico
10,78	MF	3631,43726	1	0,347329		Aráquico
11,713	MF	2597,03662	1	0,248394		Gadoleico
16,491	FM	932,00159	1	0,089141		Behenico
18,95						Erúcico
26,349	FM	437,51468	1	0,041846		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,464	MM	191,7943649	1	0,018346		Mirístico
5,574	MF	129184,9731	1	12,357128		Palmítico
5,968	MM	8209,856791	1	0,78531		Palmitoleico
6,387	MF	1906,715744	1	0,182386		Margárico
6,868	FM	2808,377162	1	0,268634		Margaroleico
7,501	FM	25303,70467	1	2,420414		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,224	MF	757415,6533	1	72,450239	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,81	MF	172,2030295	1	0,016472	2	C18:2 CT
9,134	FM	106690,7851	1	10,205457	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,558	BV	5904,487689	1	0,564791	3	Linolénico
10,783	MF	3667,625535	1	0,350825		Aráquico
11,716	MF	2721,481122	1	0,260322		Gadoleico
16,495	FM	872,5253182	1	0,083461		Behenico
18,95		0				Erúcico
26,354	FM	378,6020345	1	0,036215		Lignocérico

1045428,785

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,462	MM	169,3919979	1	0,016204		Mirístico
5,581	MF	128154,5906	1	12,259239		Palmítico
5,967	MM	8878,214705	1	0,849288		Palmitoleico
6,39	MF	1570,315252	1	0,150216		Margárico
6,867	FM	2407,636917	1	0,230314		Margaroleico
7,503	FM	25032,43458	1	2,394597		Esteárico
7,88		0			1	Elaídico
8,224	MF	756821,1696	1	72,397341	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,806	MF	181,6123907	1	0,017373	2	C18:2 CT
9,135	FM	107316,9496	1	10,265915	2	Linoleico
10		0			3	C18:3 TCC
10,15		0			3	C18:3 CCT
10,3		0			3	C18:3 TCT
10,556	BV	6225,615885	1	0,595541	3	Linolénico
10,78	MF	3997,448347	1	0,382395		Aráquico
11,715	MF	2909,781117	1	0,278349		Gadoleico
16,497	FM	991,3362472	1	0,094831		Behenico
18,95		0				Erúcico
26,352	FM	715,0027449	1	0,068397		Lignocérico



6. Arbosana

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,58	FM	82275,5	1	13,125692		Palmítico
5,972	MM	7146,79297	1	1,140153		Palmitoleico
6,393	FM	858,88678	1	0,137021		Margárico
6,869	FM	1737,52393	1	0,277193		Margaroleico
7,485	FM	14111,7	1	2,251293		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,168	FM	468475	1	74,737421	1	Oleico
8,72					2	C18:2 TC
8,927	FM	193,9984	1	0,030949	2	C18:2 CT
9,087	MF	42224,2	1	6,73618	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,544	FM	3965,53809	1	0,632636	3	Linoléxico
10,76	MF	2634,99316	1	0,42037		Aráquico
11,694	FM	1860,57788	1	0,296824		Gadoleico
16,442	FM	974,33514	1	0,155439		Behenico

18,95						Erúcico
26,284	FM	368,74963	1	0,058828		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,584	FM	82442,6532	1	13,152192		Palmítico
5,973	MM	7352,10742	1	1,172892		Palmitoleico
6,396	FM	931,5470102	1	0,148611		Margárico
6,866	FM	1647,374734	1	0,262808		Margaroleico
7,483	FM	14337,38424	1	2,287263		Esteárico
7,88					1	Elaídico
8,175	FM	468821,3188	1	74,791722	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,926	FM	302,8181259	1	0,048309	2	C18:2 CT
9,092	MF	41937,33611	1	6,690322	2	Linoleico
10					3	C18:3 TCC
10,15					3	C18:3 CCT
10,3					3	C18:3 TCT
10,547	FM	4017,177774	1	0,640866	3	Linolénico
10,762	MF	2619,221021	1	0,417848		Aráquico
11,699	FM	1415,338911	1	0,225791		Gadoleico
16,445	FM	699,7493849	1	0,111632		Behenico
18,95		0				Erúcico
26,289	FM	311,8132202	1	0,049744		Lignocérico

Retention time	Type	Area	Amt/Area	Norm %	Group	Name
4,53						Mirístico
5,585	FM	82842,67174	1	13,216398		Palmítico
5,976	MM	7064,851746	1	1,127099		Palmitoleico
6,395	FM	872,6049275	1	0,139212		Margárico
6,871	FM	1847,424955	1	0,294731		Margaroleico
7,485	FM	14371,50454	1	2,292774		Esteárico
7,88		0			1	Elaídico
8,167	FM	468341,435	1	74,717373	1	Oleico
8,72		0			2	C18:2 TC
8,929	FM	223,9492921	1	0,035728	2	C18:2 CT
9,093	MF	42327,75133	1	6,752805	2	Linoleico
10		0			3	C18:3 TCC
10,15		0			3	C18:3 CCT
10,3		0			3	C18:3 TCT
10,546	FM	3896,835524	1	0,621686	3	Linolénico
10,762	MF	2491,79316	1	0,397531		Aráquico

11,694	FM	1421,678095	1	0,226809		Gadoleico
16,445	FM	792,3409697	1	0,126407		Behenico
18,95		0				Erúxico
26,287	FM	322,4787066	1	0,051447		Lignocérico

