

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***"CLASIFICACIÓN DE ACEITES DE OLIVA MONOVARIETALES
DE ORIGEN CHILENO Y ESPAÑOL MEDIANTE TÉCNICAS
QUIMIOMETRICAS"***

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR AL GRADO
DE MAGÍSTER EN QUÍMICA**

BETSABET ABISAG SEPULVEDA CORTES

Director de Tesis: Dr. Edwar Fuentes

Dr. Pablo Richter

Santiago-CHILE

Junio 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

BETSABET ABISAG SEPÚLVEDA CORTÉS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes.

Dr. Pablo Richter D.

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Loreto Ascar (Presidente)

Mcs. Inés Ahumada

Dr. Waldo Quiroz



At mi familia

AGRADECIMIENTOS



INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	5
INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN	10
1.- INTRODUCCIÓN	12
1.1. SITUACIÓN ACTUAL EN CHILE.....	12
1.2. ORIGEN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA	16
1.3. ÁCIDOS GRASOS EN EL ACEITE DE OLIVA	18
1.4. COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA.....	20
1.5. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMÉTRICA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO	22
1.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS.	23
1.6.1. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS).....	24
1.6.2. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA, LINEAL DISCRIMINAT ANALYSIS).	25
1.6.3. MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA, SOFT INDEPENDENT MODELING OF CLASS ANALOGY).	25
1.6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA, PARTIAL LEAST SQUARES - DISCRIMINAT ANALYSIS).....	26
1.6.5. VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS Y SELECCIÓN DEL NÚMERO DE FACTORES.	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GENERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.- HIPÓTESIS	29
4. MATERIALES Y REACTIVOS.....	30
4.1. MATERIALES.	30
4.2. REACTIVOS.....	30
4.3. EQUIPAMIENTO.....	31

4.4. OTROS.....	31
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
5.1.- OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA "ACEITE DE OLIVA VIRGEN".....	32
5.2.- PARÁMETROS DE CALIDAD (ACIDEZ, PERÓXIDOS, K_{232} Y K_{270}).....	33
5.3.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	33
5.4.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	33
5.5.- CROMATOGRAFÍA DE GASES, PARA DETERMINACIÓN DE: ÁCIDOS GRASOS (GC-FID) Y COMPUESTOS VOLÁTILES (GC-MS-HS-SPME).....	34
5.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS.....	35
5.6.1. ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA) Y ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA).....	35
5.6.2. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA), MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA) Y ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA).....	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1. COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE OLIVA.....	36
6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE ACEITES DE OLIVA.....	45
6.3. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS).....	53
6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA, LINEAL DISCRIMINAT ANALYSIS).....	58
6.5. MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA, SOFT INDEPENDENT MODELING OF CLASS ANALOGY).....	61
6.6. ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA, PARTIAL LEAST SQUARES - DISCRIMINAT ANALYSIS).....	63
7. CONCLUSIÓN.....	68
8. BIBLIOGRAFIA.....	70
9. ANEXO 1: TABLA DE RESULTADOS DE INDICE DE ACIDEZ, PERÓXIDOS Y K_{232} Y K_{270}	77
10. ANEXO 2: TABLA DE VALORES DE CRITERIOS DE CALIDAD ESTABLECIDOS EN EL REGLAMENTO (CE N° 2568/91).....	79

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	
PRODUCCIÓN MUNDIAL ACEITE DE OLIVA 2004-2010 EN MILES DE TONELADAS.....	13
TABLA 2.	
SUPERFICIE DE SIEMBRA DE OLIVOS Y DESTINO DE SU PRODUCCIÓN PARA EL AÑO 2007.....	14
TABLA 3.	
COMPUESTOS VOLÁTILES DE ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN EXTRAÍDOS POR HS-SPME.....	21
TABLA 4.	
ORIGEN DE LOS ACEITES DE OLIVA ANALIZADOS CAMPAÑA.....	32
TABLA 5.	
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN, VARIEDADES ARBEQUINA, PICUAL, ARBOSANA Y FRANTOIO, EXPRESADO COMO % DE ÉSTERES METÁLICOS.....	38
TABLA 6.	
PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN CHILENOS Y ESPAÑOLES PARA LAS VARIEDADES ARBEQUINA Y PICUAL, EXPRESADO COMO % DE ÉSTERES METÁLICOS.....	41
TABLA 7.	
PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN PARA LA CAMPAÑA 2011-2012 Y 2012-2013 PARA LAS VARIEDADES ARBEQUINA, ARBOSANA Y FRANTOIO DE ORIGEN CHILENO, EXPRESADO COMO % DE ÉSTERES METÁLICOS.....	43
TABLA 8.	
ÍNDICE DE ÁCIDOS GRASOS, EXPRESADA EN % DE ÉSTERES METÁLICOS.....	44
TABLA 9.	
CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN, VARIEDADES ARBEQUINA, PICUAL, ARBOSANA Y FRANTOIO, EXPRESADO COMO μ GDE ESTÁNDAR INTERNO (4 METIL 2 PENTANOL) POR KG DE ACEITE.....	48
TABLA 10.	
COMPUESTOS VOLÁTILES EN ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN CHILENOS Y ESPAÑOLES PARA LAS VARIEDADES ARBEQUINA Y PICUAL, EXPRESADO COMO μ GDE ESTÁNDAR INTERNO (4 METIL 2 PENTANOL) POR KG DE ACEITE..	51
TABLA 11.	
COMPUESTOS VOLÁTILES EN ACEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEN PARA LA CAMPAÑA 2011-2012 Y 2012-2013 PARA LAS VARIEDADES ARBEQUINA, ARBOSANA Y FRANTOIO DE ORIGEN CHILENO, EXPRESADO COMO μ GDE ESTÁNDAR INTERNO (4 METIL 2 PENTANOL) POR KG DE ACEITE.....	52
TABLA 12.	
CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS POR EL PAÍS DE ORIGEN CON EL MODELO LDA.....	59
TABLA 13.	
CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS POR AÑO DE CAMPAÑA CON EL MODELO LDA.....	60
TABLA 14.	
CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS DEL MODELO DE PREDICCIÓN.....	61

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	
A. FRUTOS DE LA VARIEDAD ARBEQUINA. B. PERFIL SENSORIAL MEDIO DE LOS ACEITES MONOVARIETALES DE LA VARIEDAD ARBEQUINA.....	15
FIGURA 2.	
A. FRUTOS DE LA VARIEDAD PICUAL. B. PERFIL SENSORIAL MEDIO DE LOS ACEITES MONOVARIETALES DE LA VARIEDAD PICUAL.....	15
FIGURA 3.	
RUTA LIPOXIGENASA. FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN ACEITE DE OLIVA	17
FIGURA 4.	
PROCESAMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS.....	22
FIGURA 5.	
EJEMPLO DE UN GRÁFICO DE COOMAN; LAS LÍNEAS ROJAS INDICAN LAS DISTANCIAS CRÍTICAS.....	26
FIGURA 6.	
ESQUEMATIZACIÓN DE METODOLOGÍA ANÁLITICA PARA LA DETRMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS-HS-SPME.....	34
FIGURA 7.	
CROMATÓGRAMA ESTÁNDAR ÁCIDOS GRASOS FAME MIX 37. ÁCIDO PALMÍTICO (C16:0), ÁCIDO PALMITOLEICO (C16:1), ÁCIDO HEPTADECANOICO (C17:0) Y HEPTADECENOICO (C17:1), ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0), ÁCIDO OLEICO (C18:1), ÁCIDO LINOLEICO (C18:2), ÁCIDO LINOLÉNICO (C18:3), ÁCIDO ARAQUÍDICO (C20:0), ÁCIDO EICOSENOICO(C20:1), ÁCIDO HENEICOSENOICO(C21:0), ÁCIDO BEHÉNICO (C22:0) Y ÁCIDO LIGNOCERICO (C24:0).....	37
FIGURA 8.	
CROMATÓGRAMA ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN, ÁCIDO PALMÍTICO (C16:0), ÁCIDO PALMITOLEICO (C16:1), ÁCIDO HEPTADECANOICO (C17:0) Y HEPTADECENOICO (C17:1), ÁCIDO ESTEÁRICO (C18:0), ÁCIDO OLEICO (C18:1), ÁCIDO LINOLEICO (C18:2), ÁCIDO LINOLÉNICO (C18:3), ÁCIDO ARAQUÍDICO (C20:0), ÁCIDO EICOSENOICO (C20:1), ÁCIDO HENEICOSENOICO (C21:0), ÁCIDO BEHÉNICO (C22:0) Y ÁCIDO LIGNOCERICO (C24:0).....	37
FIGURA 9.	
GRAFICOS DEL TEST DE INTERVALOS MÚLTIPLES DE FISHER PARA LOS CONTENIDOS DE LOS PRINCIPALES ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE OLIVA DE LAS CUATRO VARIEDADES ANALIZADAS. A.- ÁCIDO PALMÍTICO B.- ÁCIDO OLEICO C.- ÁCIDO LINOLEICO D.- ÁCIDO LINOLENICO.....	40
FIGURA 10.	
CROMATÓGRAMA COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS, VARIEDAD ARBEQUINA.....	46

FIGURA 11.	
CROMATÓGRAMA COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS, VARIEDAD FRANTOIO.....	46
FIGURA 12.	
CROMATÓGRAMA COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS, VARIEDAD PICUAL.....	47
FIGURA 13.	
CROMATÓGRAMA COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS, VARIEDAD ARBOSANA.....	47
FIGURA 14.	
GRÁFICO 2D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PCA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	54
FIGURA 15.	
GRÁFICO 3D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PCA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	55
FIGURA 16.	
GRÁFICO 2D DE CARGAS (LOADINS) DEL PCA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	56
FIGURA 17.	
GRÁFICO 2D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PCA PARA PAÍS DE ORIGEN DEL ACEITE.....	57
FIGURA 18.	
GRÁFICO 2D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PCA PARA AÑO DE COSECHA DEL ACEITE.....	57
FIGURA 19.	
GRÁFICO DE ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL PARA VARIEDAD DE LA ACEITUNA.....	58
FIGURA 20.	
MODELO SIMCA, DIAGRAMA DE COOMANS: DISTANCIAS DE LAS MUESTRAS DE FRANTOIO, PICUAL Y ARBOSANA....	62
FIGURA 21.	
MODELO SIMCA, DIAGRAMA DE COOMANS: DISTANCIAS DE LAS MUESTRAS DE FRANTOIO, PICUAL Y ARBEQUINA....	63
FIGURA 22.	
GRÁFICO DE REGRESIÓN PLS-DA DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES.....	64
FIGURA 23.	
GRÁFICO 2D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PLS-DA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	65
FIGURA 24.	
GRÁFICO 3D DE PUNTUACIONES (SCORES) DEL PLS-DA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	66
FIGURA 25.	
GRÁFICO 2D DE CARGAS (LOADINGS) DEL PCA PARA LAS CUATRO VARIEDADES.....	66

RESUMEN

El Aceite o "jugo de la oliva" proviene de los frutos del olivo, *Olea Europea L.*, ha estado presente en la historia del hombre desde las antiguas civilizaciones, ocupando un lugar relevante. Se ha utilizado tanto como alimento básico, medicina, fuente de energía y en ceremonias religiosas. Es difícil determinar donde apareció el olivo, pero se cree que fue a orillas del Mediterráneo, entre Siria y Grecia, hace más de 6.000 años.

El desarrollo de la producción del Aceite de Oliva en el mundo ha venido evolucionando de acuerdo al desempeño de la industria en los últimos años, dado el gran aumento de la demanda tanto nacional como internacional, lo que ha incentivado a realizar importantes inversiones en el nivel productivo, impulsándose así, a alcanzar mayores volúmenes de producción presentándose un buen momento de desarrollo y expansión en Chile.

Indudablemente, factores como la variedad, estado de maduración de las aceitunas, condiciones climáticas y edafológicas, así como la irrigación o fertilización que soporta el olivo, junto con el sistema de recolección de los frutos (manual o mecánica), afectan a la calidad de las aceitunas y, por tanto, al aceite. Sin embargo, no sólo es necesario partir de unas aceitunas enteras, sanas y maduras, los procedimientos aplicados durante todo el proceso de extracción también influyen perentoriamente en la calidad del producto final, la cual se ha centrado en la búsqueda de alimentos sofisticados, generando diversos estudios científicos dirigidos a dilucidar la biosíntesis del aroma y los factores que tienen relación con la formación de los compuestos volátiles, de los cuales depende en gran medida la aceptación o el rechazo del producto por parte del consumidor, siendo uno de sus más importantes factores de calidad.

El objetivo general del presente estudio, fue caracterizar aceites nacionales de las variedades arbequina, arbosana, frantoio y picual y españoles de la variedad arbequina y picual, en base a su perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos, y establecer una clasificación a través de diferentes herramientas quimiométricas destinadas al reconocimiento de patrones.

Se analizaron 57 muestras de aceite de oliva de origen nacional (III a VII región) de las variedades: arbequina, arbosana, frantoio y picual y 16 muestras provenientes de España (Valencia) de las variedades arbequina y picual.

La metodología utilizada para estudiar la composición de los ácidos grasos de las muestras analizadas fue la técnica de trans-esterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico y cromatografía de gases con detector de ionización de llama y la caracterización de los compuestos volátiles consideró la técnica de Microextracción en Fase sólida (SPME) para la adsorción de los compuestos volátiles en el aceite previo a la determinación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

A partir de los datos obtenidos de las 73 muestras (nacionales y españolas) se realizó: test de análisis de varianzas (ANOVA) en donde las diferencias fueron consideradas significativas para un $p < 0,05$ (5% de significancia, 95% nivel de confianza), test de intervalos múltiples de Fisher (mínima diferencia significativa “Least significant difference” LSD) con un 95% de nivel de confianza, análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminante lineal (LDA), modelado blando independiente de analogías de clases (SIMCA) y análisis de discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), considerándose como factores de variación: variedad de aceituna (arbequina, picual, arbosana y frantoio), país de origen del aceite (Chile v/s España) y año de cosecha para la variedad arbequina y arbosana (campana 2012 v/s 2013).

En la aplicación del PCA se observaron cuatro grupos perfectamente separados para el factor de variación variedad de aceituna, dos grupos en país de origen del aceite y dos grupos en año de cosecha, lo cual fue muy conveniente para la clasificación. La aplicación de las técnicas de clasificación LDA, SIMCA y PLS-DA permitieron disponer adecuadamente las muestras para los factores de variación y agruparlos entre ellos.

1.- INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es un alimento que pertenece a la denominada “dieta mediterránea” que cada vez ha ido adquiriendo mayor importancia entre los consumidores debido a sus propiedades sensoriales y valor nutricional, caracterizado por la presencia de ácidos grasos insaturados como ácido oleico y ácido linoléico, además de numerosos compuestos volátiles que están directamente relacionados con el aroma, de los que depende en gran medida la aceptación o el rechazo del producto por parte del consumidor, siendo uno de sus más importantes factores de calidad.

Actualmente, es fundamental conocer los aspectos relacionados con el aroma de los alimentos, entre éstos el aceite de oliva, con el fin de garantizar una calidad óptima y poder desarrollar en el futuro productos aún mejores, adecuados a los gustos de los consumidores que privilegian las propiedades organolépticas. Por este motivo, el análisis de la composición aromática de los alimentos constituye uno de los principales retos de la industria e investigación alimentaria, en consecuencia, si en un futuro se quiere mejorar la calidad organoléptica de los alimentos y que satisfagan las demandas de los consumidores, es ineludible realizar estudios en profundidad sobre el aroma.

La importancia del aroma de este alimento en particular, es motivado por el escenario del mercado internacional del aceite de oliva, el cual presenta una condición creciente en la demanda, producto de la tendencia al consumo de productos saludables, y a su vez, centrada en la búsqueda de alimentos sofisticados, lo cual ha generado diversos estudios científicos dirigidos a dilucidar la biosíntesis del aroma y los factores que tienen relación con la formación de los compuestos volátiles. Estos estudios se han llevado a cabo tanto desde el punto de vista analítico [1] como bioquímico [2,3,4,5].

1.1. SITUACIÓN ACTUAL EN CHILE

Chile posee condiciones ideales para la producción de aceite de oliva, lo que ha originado una verdadera revolución de este producto en cuanto a superficie plantada de olivos, volúmenes de producción y exportación a distintos países del mundo, con proyecciones de generación de buenas utilidades durante la próxima década.

La industria olivícola ha implementado, desarrollado e incorporado tecnologías en los procesos de producción e industrialización, haciendo más eficiente el proceso para la

obtención de aceites extra vírgenes de mejor calidad. Por lo tanto, el escenario actual tanto en superficie plantada, producción y nivel de exportación e importación del país, se ve indudablemente potenciado.

Las estadísticas indican que al 2014 se estimó que la producción fue de 15.000 toneladas con un incremento de un 25% respecto al año 2009, además se presume que los aceites de oliva extra vírgenes chilenos de excelente calidad serán capaces de lograr mercados importantes, tanto en Europa, Estados Unidos y Asia, alcanzando cifras de exportación entre 100 y 120 millones de dólares en 2015 [6].

Simultáneamente, la producción del resto del mundo, según el Consejo Oleícola Internacional (COI), ha incrementado su volumen durante los últimos años. Para la temporada 2013-2014 el aumento fue un 30% con respecto a la temporada anterior, alcanzando 3.270.000 toneladas. De la producción mundial, la Unión Europea representa más del 70%, destacándose dentro de ella España con un 44 %, Italia con un 16 % y Grecia 10% [6]. En este contexto, Chile representa el 0,5% de la producción mundial [Tabla 1].

Tabla 1.

Producción mundial aceite de oliva 2007-2014 en miles de toneladas [6].

Temporada	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	%
Mundo	2713	2669	3024	3075	3321	2401	3270	100,0
CE	2118	1939	2245	2209	2395	1461	2476	72,5
España	1236	1030	1396	1392	1615	618	1776	44,3
Italia	510	540	460	440	399	416	461	15,8
Grecia	327	305	320	301	295	358	132	10,0
Túnez	170	160	150	120	182	220	70	5,2
Turquía	72	130	147	160	191	195	190	5,3
Siria	100	130	150	180	198	175	165	5,4
Argentina	27	23	16	20	32	17	30	0,8
Australia	12	15	18	18	15,5	9,5	18	0,5
Chile	6,5	8,5	12	16	21,5	15	15	0,5

Fuente: International Olive Council, November 2014

Como consecuencia del incremento sostenido de la producción de aceite de oliva en Chile, las exportaciones de este producto han aumentado significativamente, siendo reconocida por la calidad de su producción, lo que se demuestra en la gran cantidad de premios que han recibido las diferentes empresas nacionales en reconocidos concursos de Italia, España y Estados Unidos [6].

En cuanto a la producción de aceite de oliva, ésta se distribuye mayoritariamente entre la III y VIII región [Tabla 2], concentrándose mayoritariamente en las regiones de Atacama, Coquimbo, Libertador Bernardo O'Higgins y del Maule.

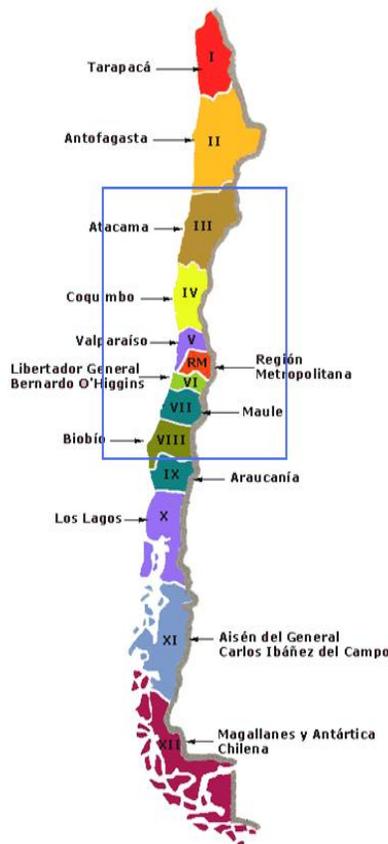


Tabla 2.

Superficie de siembra de olivos y destino de su producción para el año 2007.

Olivos: estimación de la superficie y destino de su producción. 2007									
Región	2007	Destino producción %		Superficie (ha)		Producción (ton)		Total	Total
		aceitunas	aceite	aceitunas	aceite	aceitunas	aceite	olivas	ton aceite
XV	1513	87	13	1316	197	11844	1573	13417	118
I	21	100	0	21	0	63	0	63	0
II	12	100	0	12	0	23	0	23	0
III	3326	50	50	1663	1663	6652	6652	13304	665
IV	2700	2	98	54	2646	324	7938	8262	953
V	1494	55	45	822	672	4109	3026	7135	378
RM	1404	40	60	561	842	1684	5053	6737	632
VI	3200	15	85	480	2720	1200	8160	9360	1020
VII	3496	15	85	524	2972	1311	10400	11711	1300
VIII	813	50	50	406	406	1016	1016	2032	122
IX	74	100	1	74	0	185	1	186	0
XI	0	100	0	0	0	1	0	1	0
Total	18053	714	487	5933	12118	28412	43819	72231	5188

laborado por CHILEOLIVA con información propia, de ODEPA - VII. Censo Nacional Agropecuario, 2007. Estimación preliminar sujeto a revisión.

Existen alrededor de 1300 variedades de olivo en el mundo de las cuales en Chile se cultivan alrededor de unas 12 variedades (Arbequina, Picual, Frantoio, Leccino, Coratina, Arbosana, Koroneiki, Empeltre, Nocellara del Belice, Manzanilla Chilena, Sevillana y Manzanilla de Sevilla), sin embargo, las variedades de mayor producción son Arbequina (representa el 70% del total nacional), Frantoio, Arbosana y Picual por su alto rendimiento y adaptación a diferentes sistemas de cultivo.

Algunas de las características de estas variedades son:

Arbequina es de origen español, posiblemente del pueblo Leridiano de Arbeca. Es un fruto ovalado y pequeño. Su aceite es muy aromático, con ligero sabor a manzana, verde herbáceo, dulce, muy poco amargo y picante, con un suave frutado ligero, lo que ha

permitido una buena aceptación en los mercados poco habituados al consumo de aceite de oliva. Es usado comúnmente como base en todas las mezclas (blend) [7].

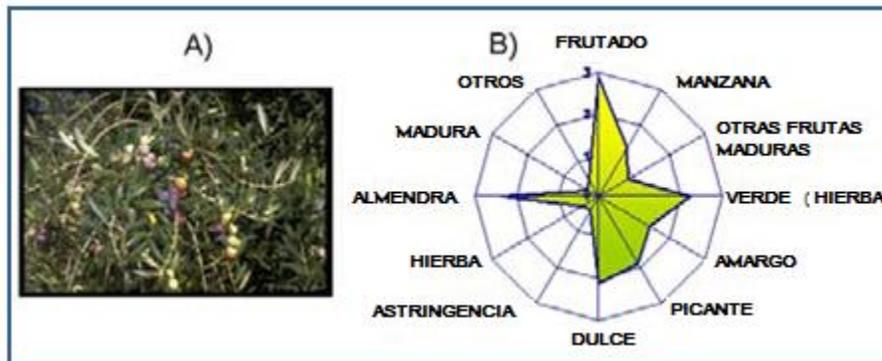


Figura 1. A. Frutos de la variedad Arbequina. B. Perfil sensorial medio de los aceites monovarietales de la variedad Arbequina [7].

Arbosana es una variedad española, procedente de la comarca de “El Arbos” en la provincia de Tarragona. El aceite producido es muy frutado y aromático con particular aroma a plátano. Es estable, amargo y picante ligero [7].

Frantoio es de origen italiano muy común en la zona de la Toscana. Fruto de tamaño mediano. Su aceite es muy estable, pues posee un alto contenido de polifenoles, además tiene excelentes características organolépticas: muy frutal y de tonos verdosos [7].

Picual variedad de origen español. Su aceite es muy estable, frutado, aromático, con atributos positivos de amargo y picante, con aroma en particular a higuera y madera. Representa el 20% del total mundial y el 50% de las plantaciones ibéricas.

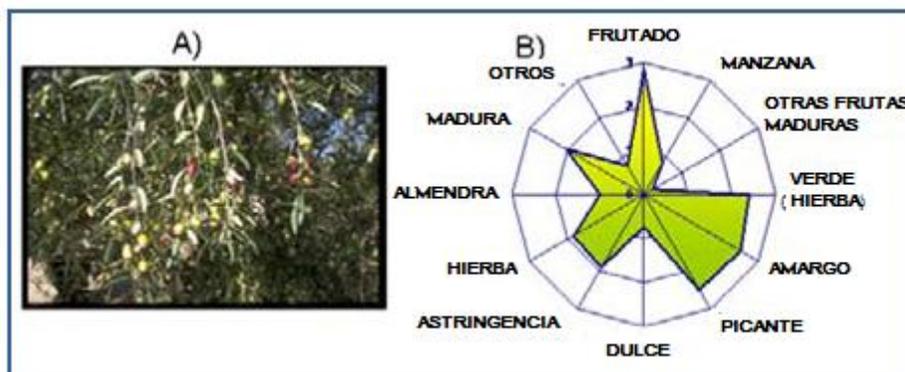


Figura 2. A. Frutos de la variedad Picual. B. Perfil sensorial medio de los aceites monovarietales de la variedad Picual [7].

El mercado chileno está en un momento de desarrollo y expansión. El consumidor está empezando a valorar el aceite de oliva escogiéndolo por encima de otros aceites vegetales debido a sus beneficios para la salud. El consumo per cápita estimado para el año 2013 fue de alrededor de 900 g por persona [8], lo que representa un aumento del 30% con respecto al consumo estimado del año anterior.

La buena imagen del país, el clima y las condiciones fitosanitarias adecuadas para la producción de olivos, la adopción de técnicas de cultivo, tecnologías modernas y el esfuerzo por potenciar la calidad del producto, son razones por las que el aceite chileno puede llegar a ser reconocido por los consumidores internacionalmente [6].

Es así como los expertos españoles, Dres. Javier Sanz Cañada y Alfredo Macías Vázquez [9] afirman que para crecer en el mercado del aceite de oliva se hace necesario un cambio en los modelos de organización colectiva, adquiriendo un método proactivo de comercialización como producto final de calidad y con un grado significativo de diferenciación territorial [10], lo que una diferenciación podría contribuir a ello.

Todos estos antecedentes indicaron la necesidad de realizar la investigación sobre los aceites de oliva en Chile, por lo tanto, es de gran beneficio evaluar la composición aromática de los aceites nacionales, comparándolos con aceites provenientes de España, primer productor en el mundo, obteniendo con ello la diferenciación o similitud de la composición volátil de los aceites de oliva de estudio, la cual en nuestro país recientemente está siendo estudiada.

1.2. ORIGEN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA

La calidad aromática del aceite de oliva es valorada por los consumidores, debido a que otros aceites vegetales (pepita de uva, maravilla, soya, raps, etc.) no poseen esta calidad como consecuencia del proceso de refinación, en contraste con el aceite de oliva que es obtenido por métodos exclusivamente físicos conservando su aroma natural.

Este delicado aroma del aceite de oliva tiene su origen en un gran número de compuestos, sin embargo, sólo una parte de estos volátiles presentan olor y contribuyen al aroma, los compuestos volátiles responsables del olor y sabor (flavor) del aceite de oliva virgen provienen de la aceituna y se liberan a través de rutas bioquímicas y procesos oxidativos, durante la molturación de la aceituna. Se ha demostrado que la vía de la lipoxigenasa promueve la formación de compuestos volátiles de 6 carbonos, y en consecuencia una gran cantidad de compuestos responsables del aroma verde [11].

La ruta de la lipoxigenasa (LOX) [Figura 3] se induce con la rotura de los tejidos, proceso que implican una serie de enzimas que degradan los ácidos poliinsaturados, en el caso del aceite de oliva virgen esta ruta se activa durante la molienda de los frutos y el batido de la pasta. Los volátiles producidos se incorporan posteriormente al aceite confiriéndoles el olor característico.

En consecuencia, el aroma de un determinado aceite depende en gran medida de los niveles de actividad de las enzimas que componen la ruta mencionada, los cuales cambian en función de parámetros como la variedad, estado de maduración de los frutos recolectados [12], las condiciones utilizadas en la extracción del aceites [13, 14] y con las condiciones en que ha sido cultivado (clima, riego, fertilización, etc.).

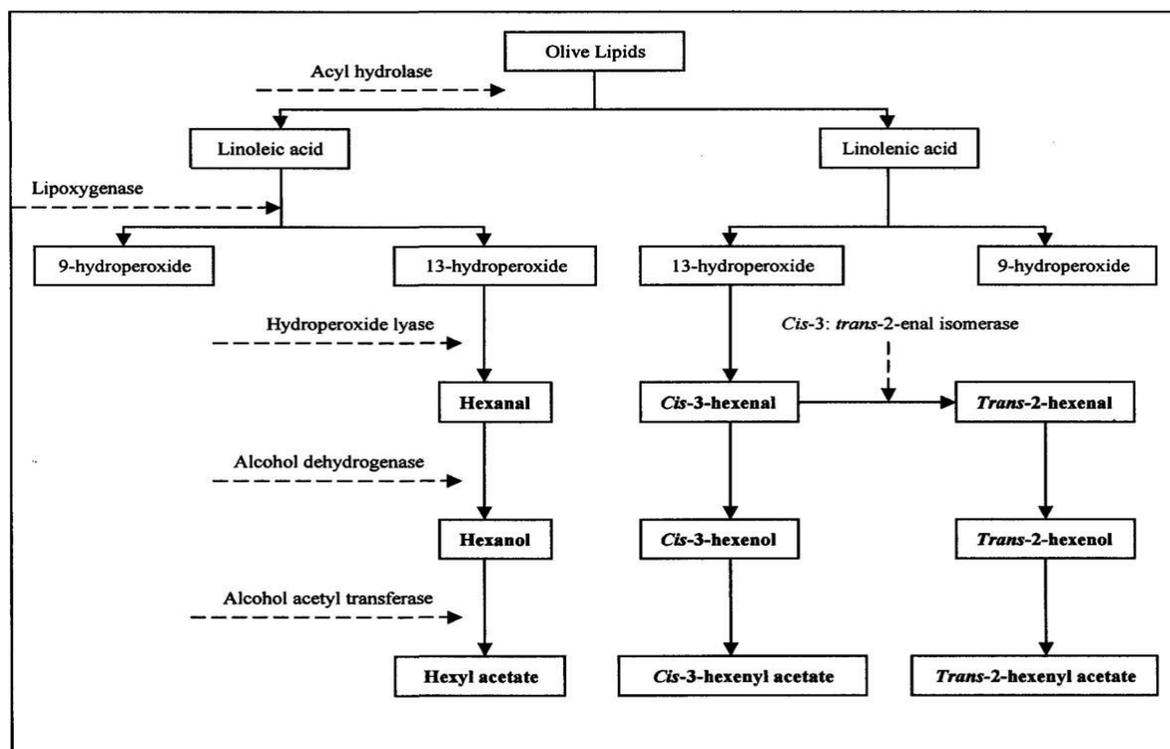


Figura 3. Ruta Lipoxigenasa. Formación de compuestos volátiles en aceite de oliva.

La figura 3 muestra el principal camino en la separación enzimática del ácido linoleico y linolénico, los que dan lugar a aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono (C6) y ésteres correspondientes. Estos compuestos C6 son sintetizados a través de la ruta de la LOX a partir de ácidos grasos poliinsaturados que contienen una estructura Z,Z-1,4-pentadieno. En una primera etapa de la ruta, la LOX da lugar a los derivados 13-hidroperoxidados de los ácidos grasos poliinsaturados que son posteriormente transformados por acción de la hidropéroxido-liasa (HPL) en aldehídos

C₆ aldehydos pueden ser entonces reducidos mediante una actividad alcohol deshidrogenasa (ADH) a sus correspondientes alcoholes C₆ directamente o tras una isomerización catalizada por la Z₃-E₂ enal-isomerasa. Finalmente, mediante una alcohol-aciltransferasa (AAT) estos alcoholes C₆ son convertidos en ésteres [11,15].

La presencia de otros compuestos volátiles de menor importancia pueden proporcionar marcadores útiles de calidad y conducir a una mejor comprensión de la formación o la degradación de los compuestos volátiles más importantes [1]. Por otro lado, cada actividad enzimática está determinada genéticamente por cada cultivar, lo que explicaría la diferencia cuantitativa entre los componentes volátiles de las distintas variedades [16].

De acuerdo, a la importancia de la ruta de la Lipoxigenasa en la formación de los compuestos volátiles, en el presente trabajo, se incorporó el estudio del perfil de ácidos grasos que presentan los aceites con distinto origen varietal y zona, con miras a apreciar la posible incidencia de éstos conjuntamente con la composición volátil del aceite con el fin de determinar, si es posible, funciones de clasificación de los aceites monovarietales.

1.3. ÁCIDOS GRASOS EN EL ACEITE DE OLIVA

El mecanismo de biosíntesis de los ácidos grasos en las plantas se realiza a través de secuencias de complejos procesos bioquímicos, iniciados con la síntesis de la cadena grasa saturada, acetato y CoA. A continuación esta cadena es alargada y desaturada para suministrar los distintos ácidos grasos saturados e insaturados [17]. El destino de estos ácidos es; por un lado para sintetizar lipoproteínas, formación y funcionamiento de membranas biológicas y por otro lado para la síntesis de triglicéridos, acumulados en forma de gotas grasas de reserva en frutos y semillas oleaginosas, representando la gran totalidad de la composición ácida.

En el caso del aceite de oliva el 98% en peso del aceite corresponde a triacilglicerol (fracción saponificable), los cuales tienen las siguientes combinaciones de ácidos grasos:

- OOO: 43,1%
 - OOP, POO, OPO: 23,1%
 - LOO, OOL, OLO: 10,4%
 - LOP, POL, OLP, PLO: 4,5%
 - EOO, OOE: 3,6%
 - POP: 2,9%
- L = ác. linoleico
O = ác. oleico
P = ác. palmítico
E = ác. esteárico

El ácido graso mayoritario (55-83%) es el ácido oleico (18:1n-9). Otros ácidos grasos insaturados destacados son el linoléico (18:2n-6), que puede llegar hasta un 20%, y el α -linolénico (18:3n-3), con un máximo del 1%. El ácido graso saturado más abundante es el palmítico (16:0), con porcentajes entre 7,5-20%.

El perfil de ácidos grasos es un parámetro químico indicativo de la pureza de un aceite, es decir, que no ha sido adicionado con otros aceites, y el contenido de sus mayoritarios: oleico, palmítico, esteárico y linoleico permite diferenciar aceites de una misma categoría y/o variedades, considerando que la composición de ácidos grasos difiere de una muestra a otra, dependiendo de la zona de producción. Se ha señalado en la literatura, por diversos autores, que los factores principales que afectan la composición son: latitud, condiciones climáticas, variedad y grado de madurez de las aceitunas recogidas. La mayor parte de los estudios utilizan este parámetro como información de identidad de una variedad y zona determinada de producción.

Algunos autores indican que al estudiar la composición acídica del aceite de oliva procedente de diferentes campañas, épocas de recolección y variedades, 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 [7].

Aún teniendo en cuenta el gran tamaño que presentan los rangos de variabilidad de los diferentes ácidos grasos en el aceite de oliva, se pueden considerar éstos como un índice analítico que permite apreciar cualidades positivas en la evaluación de su calidad, ya sea en el sentido de controlar sus posibles alteraciones, en las que los ácidos grasos, especialmente poliinsaturados, tienen una clara intervención o para conocer su pureza teniendo en cuenta el nivel de referidos ácidos. En esta línea, dada su composición, los aceites de oliva aseguran una cantidad suficiente de insaturados, especialmente monoinsaturados (oleico), con todas sus connotaciones beneficiosas para corregir riesgo de enfermedades cardiovasculares; además, presentan una insaturación idónea en la elaboración de alimentos a alta temperatura sin deteriorarse [18].

El estudio del perfil de ácidos grasos es un parámetro que se ha utilizado en múltiples ocasiones para caracterizar aceites de oliva monovarietales, tipificando no solo en función de la variedad de aceituna, sino también en función del grado de acidez ó localización geográfica de la zona de producción [19, 20, 21].

1.4. COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA

El aroma está constituido por un número elevado de compuestos volátiles. Se han identificado del orden de 800 compuestos que proporcionan un aroma único y característico, sin embargo, se estima que sólo un 5% contribuye realmente al aroma, compuestos que son capaces de proporcionar al producto su olor característico.

A este grupo de compuestos se les conoce como compuestos con carácter impactante o compuestos clave (key odorants) [22], cuyo olor es el que da la identidad sensorial al producto. Dada la estrecha relación que tienen el aroma y la calidad, un aspecto a tener muy en cuenta es la posible aparición de olores extraños o anómalos. Estos defectos "off-flavours" son atributos sensoriales que normalmente no están presentes en el alimento y que no se asocian, por lo tanto, con su aroma típico [23, 24].

En el caso del aceite de oliva estos atributos están asociados a defectos como el moho, avinado, rancio, atrojado, aceituna helada, etc. que pueden originarse de diversas maneras; reacciones químicas derivadas de un mal manejo del proceso de producción del aceite, del fruto, condiciones climáticas y/o almacenamiento. En general, estas acciones llevan a la pérdida de compuestos impactantes, cambios en la concentración de una o varias sustancias o a la aparición de otros compuestos que pasan a convertirse en key odorants, pero cuya presencia se asocia al alimento en el que aparecen [24].

Es así que algunos autores han investigado estos efectos en donde el compuesto no sólo se encuentra en pequeñas cantidades en los aceites frescos, pero aumenta durante el proceso de oxidación. El trans-2-heptanal es también un buen indicador para la rancidez. Un atributo sensorial del sedimento fangoso puede ser causado por ácidos cortos orgánicos como el ácido propiónico, ácido butírico, ácido iso-valeriánico y ácido valeriánico. Un sabor mohoso puede ser percibido en muestras que contienen 1-octen-3-ol o 1-octen-3-ona [25].

Algunos autores han realizado la identificación de los compuestos volátiles (key odorants) presentes en el aceite de oliva virgen [Tabla 3]. Los principales compuestos aromáticos del aceite de oliva son el hexanal, el trans-2-hexenal y el 1-hexanol que se encuentran en la mayoría de los aceites de Europa [26]. El compuesto mayoritario en aceites de oliva frescos es el trans-2-hexenal el cual aumenta durante la maduración y alcanza un punto máximo disminuyendo posteriormente, mientras que el hexanal muestra un aumento estable. Para los atributos verdes y afrutados predominan compuestos de 6 carbonos como cis-3-hexenal, hexil acetato, cis-3-hexenil acetato y cis-3-hexenol.

Algunas investigaciones con el objetivo de obtener productos de alta calidad han establecido que los compuestos volátiles se modifican de acuerdo a factores climáticos, de producción y madurez de la aceituna [27,28, 29]. Otros trabajos, indican la influencia de la región geográfica, la variedad, la maduración del fruto y los métodos de extracción en la composición de compuesto orgánico volátil [30].

El análisis del aroma del aceite de oliva ha sido estudiado por diversos investigadores desde la década de los 70. Inicialmente, el objetivo era identificar los compuestos responsables del aroma [30-32], pero los aceites procedentes de distintas regiones, aunque con una composición volátil cualitativa similar, diferían notablemente en su composición cuantitativa [33].

Tabla 3.

Compuestos volátiles de aceite de oliva extra virgen extraídos por HS-SPME [34].

Compuesto	LRI	Aroma	Referencia
Hexanal	804	verde	Reiners and Grosch (1998)
(E)-2-hexenal	855	verde, fruta, dulce	Issaoui et al. (2009)
(E)-3-hexenal	857	verde	Aparicio and Morales (1998)
1-hexanol	873	fruta, plátano	Aparicio and Morales (1998)
1-heptanol	967	tierra, dulce	Morales et al. (2005)
1-octen-3-ol	980	moho, tierra	Morales et al. (2005)
3-octanona	982	tierra, graso	Morales et al. (2005)
6-methyl-5-hepten-2-ona	987	verde, pungente	Morales et al. (2005)
Decano	1.000	–	–
Octanal	1.003	graso	Morales et al. (2005)
(E,Z)-2,4-heptadienal	1.006	graso, rancio	Morales et al. (2005)
(Z)-3-hexenil acetato	1.009	fruta, dulce	Aparicio and Luna (2002)
1-hexil acetato	1.011	fruta, verde,	Aparicio and Luna (2002)
Limoneno	1.032	cítrico, naranja	Issaoui et al. (2009)
(E)-b-ocimeno	1.052	fruta, dulce	Issaoui et al. (2009)
g-terpineno	1.062	–	–
1-octanol	1.070	–	–
undecano	1.100	–	–
Nonanal	1.103	graso	Morales et al. (2005)
dodecano	1.200	–	–
Decanal	1.206	cítrico	Issaoui et al. (2009)
(E)-2-decenal	1.266	pintura, graso	Morales et al. (2005)
a-copaeno	1.376	picante, aromático, madera	Issaoui et al. (2009)
1-tetradeceno	1.393	–	–
tetradecano	1.400	–	–
dodecanal	1.409	–	–
(Z)-b-farneseno	1.444	–	–
pentadecano	1.500	–	–
(E,E)-a-farneseno	1.508	aroma suave a vegetales	Issaoui et al. (2009)
hexadecano	1.600	–	–

LRI: Índice de retención lineal (columna fase estacionaria Me-Silicona 5%).

1.5. CARACTERIZACIÓN QUIMIOMÉTRICA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO

La quimiometría, es el área de la química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal y ello implica: a. diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, b. proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, c. y obtener conocimientos de sistemas químicos [35]. Algunas de las áreas de aplicación más importantes de la quimiometría incluyen (1) la calibración, validación y pruebas de significación, (2) la optimización de las mediciones químicas y procedimientos experimentales y (3) la extracción del máximo de información química a partir de datos analíticos [36].

Parte de la quimiometría se dedica al desarrollo y estudio de técnicas multivariantes, las cuales son capaces de detectar las relaciones existentes en los datos y eliminar la información redundante [37, 38]. Es posible definir tres etapas importantes en el tratamiento de datos, y aplicación de las técnicas multivariantes como se ilustra en el diagrama de bloques de la Figura 4.

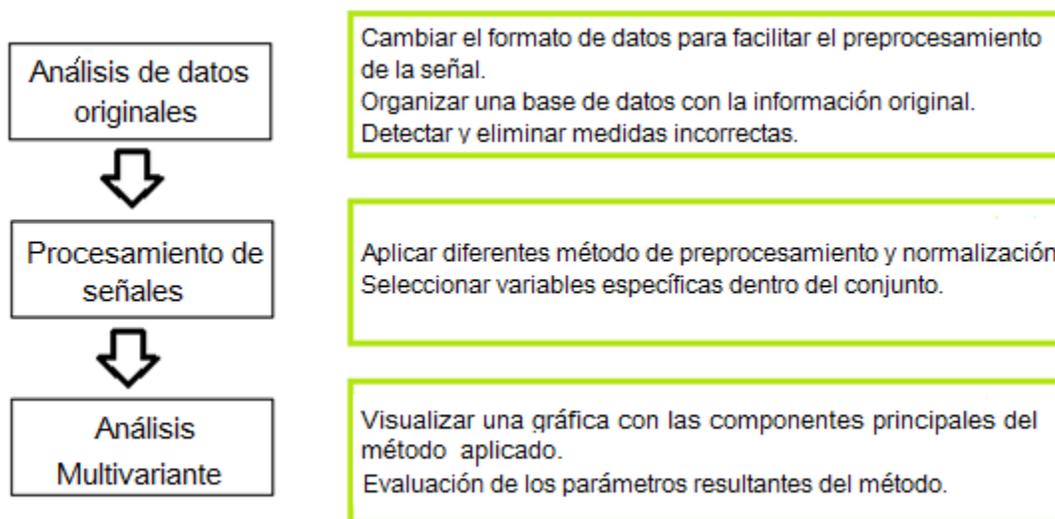


Figura 4. Procesamiento para el análisis de datos.

El bloque inicial de la figura 4, indica que una vez que las señales son adquiridas y guardadas es necesario realizar un análisis estadístico tradicional calculando la desviación estándar para los datos obtenidos, permitiendo valorar la calidad de las muestras medidas y además detectar cualquier tipo de error sistemático a nivel experimental. A continuación se efectúa el pre-procesamiento de la señal y/o normalización, luego la selección de parámetros descriptivos y la preparación de la matriz de datos para la reducción de dimensionalidad. La matriz resultante es utilizada para

representar análisis tipo clustering, discriminación, clasificación, regresión o predicción en función de la problemática seguida [38].

El análisis multivariado implica el uso de técnicas matemático-estadísticas para extraer información a partir de un conjunto de datos complejos, representados por ejemplo, por un grupo de muestras a las que se les ha determinado varios compuestos químicos (una matriz de información). Éste análisis permite ver la muestra como un todo (integral) y no sólo en una única componente, lo que ayuda a poner en evidencia las interacciones entre los constituyentes y entender sus efectos combinados en toda la matriz de información. Hoy en día, la aplicación de técnicas de reconocimiento de patrones no supervisada, como el análisis de componentes principales (PCA) y de métodos de clasificación multivariantes, como el análisis discriminante lineal (LDA), modelado blando independiente de analogía de clases (SIMCA) y análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (DA-PLS); ofrecen la posibilidad de analizar toda una matriz de información y hacer una clasificación posible de las muestras que forman esa matriz.

Se ha reportado el uso de métodos multivariados para la clasificación de los aceites de oliva mediante el uso de la espectroscopia de fluorescencia [39], aplicándose el método de análisis discriminante lineal (LDA) para clasificar los aceites de oliva. Tura y colab. [40] indican que la clasificación de aceites en base a la influencia del medioambiente y año de cosecha para los compuestos volátiles en aceite de oliva italianos es posible determinarla mediante la aplicación de PCA y LDA, otros investigadores [41] han obtenido resultados de acuerdo a la influencia geográfica de la fracción volátil del aceite de oliva para la variedad oueslati utilizando análisis de componentes principales (PCA).

1.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS.

Los perfiles de ácidos grasos y la concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de compuestos volátiles de las muestras, obtenidos mediante los métodos cromatográficos antes detallados, fueron agrupados en una matriz de información y pre-tratados mediante centrado, para el cual se calcula el valor medio de cada columna de la matriz de datos y se resta este valor de la columna, trasladando los ejes del sistema de coordenadas hacia el centroide de los datos y hace que cada muestra exhiba solo las diferencias que tiene con respecto a la muestra promedio de los datos originales [42]. Este pretratamiento es útil para evitar la presencia de valores extremos en la escala de los datos [43].

A continuación se describen las técnicas quimiométricas que han sido utilizadas en el presente trabajo.

1.6.1. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS).

Para tener una visión general de los posibles agrupamientos de las muestras, de acuerdo a su variedad, país de origen y/o año de cosecha, se utilizó la técnica quimiométrica conocida como *Análisis de Componentes principales* (PCA) como primer paso para el análisis de los datos obtenidos.

El PCA es un método matemático bilineal que provee una interpretación general de la principal información contenida en una tabla multivariable, mediante la extracción y visualización de la variación sistemática de los datos en dicha tabla [44]. Los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí, llamadas componentes principales (PCs). No todos los componentes principales contienen la misma información; los primeros son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información más relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o error experimental, o a un sobreajuste del modelo y pueden ser descartados, con lo que se consigue una importante reducción del número de variables. El PCA se describe mediante la siguiente ecuación:

$$X = \sum_{j=1}^a t_j p_j^T + E \quad [1.1.]$$

donde X es la matriz de datos a tratar (en esta tesis serán "huellas dactilares", datos espectrales o cromatográficos de los aceites después de su pretratamiento), a es el número de componentes principales que contienen la información deseada, t_j son los scores para cada componente principal y p_j los loadings y E es una matriz de error, es decir la variación residual de X que no es explicada por el modelo con a componentes principales. El superíndice T indica la matriz traspuesta. La ecuación 1.1 se puede expresar de la siguiente manera:

$$X = TP^T + E \quad [1.2.]$$

donde T es la matriz de scores, con tantas filas como la matriz original X , y que contiene la información sobre las filas (los objetos) de la matriz original; P^T corresponde a la traspuesta de la matriz de loadings, con tantas columnas como los datos originales, y que contiene información sobre las columnas (las variables) de la matriz original. El número de columnas de la matriz de scores corresponde al número calculado de

componentes principales, PC1 explica la máxima variabilidad de la matriz X , PC2 es ortogonal a la primera componente y abarca la mayor cantidad de la variación restante, y así sucesivamente, hasta que se explica el total de la variación útil de la matriz original X .

Al representar gráficamente los valores de los scores, es posible detectar e interpretar las pautas presentadas por las muestras, agrupaciones, similitudes, diferencias y muestras anómalas.

1.6.2. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA, LINEAL DISCRIMINANT ANALYSIS).

El análisis discriminante es una técnica supervisada de clasificación, es decir, donde se han definido previamente el número de clases y de muestras que pertenecen a cada una de ellas [45]. Cuanto mayores son las diferencias entre dos clases dadas, mayor es la distancia de Mahalanobis entre ellas. La discriminación de las muestras se consigue mediante el cálculo de la distancia de Mahalanobis de cada una de ellas a los centros de los grupos considerados [46]. Una muestra desconocida se clasifica como perteneciente al grupo con el cual tenga una distancia más cercana al centro [47]. El LDA puede considerarse similar al PCA sólo en el sentido de que ambos determinan un hiperplano con un menor número de variables en el cual se proyectan los datos de las muestras desde un plano con más variables. Sin embargo, el PCA selecciona la dirección que retiene la máxima estructura entre los datos, mientras que el LDA selecciona la dirección en la que se consigue una separación máxima entre los grupos definidos [48]. En la construcción de este modelo se debe tener en consideración que se requiere un mayor número de muestras que de variables.

1.6.3. MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA, SOFT INDEPENDENT MODELING OF CLASS ANALOGY).

SIMCA es un método de clasificación supervisado donde cada clase se modela usando un PCA de forma independiente, de forma que cada clase tiene un modelo específico que la describe con el número óptimo de PCs [47]. De esta manera, se puede construir un “espacio de la clase”, cuyo volumen marca el límite entre las muestras que son descritas por el modelo como pertenecientes a la clase estudiada y las muestras que no pueden ser consideradas como pertenecientes a ella, para un nivel de confianza seleccionado [49]. Para saber si una nueva muestra se ajusta a la clase, la información que se calcula es dividida en dos, una parte explicada por el modelo de la clase y otra que permanece en los residuales. Si los residuales de la muestra son significativamente mayores que los de la clase, la muestra es rechazada [50].

Dependiendo del programa utilizado en la construcción del modelo SIMCA, se pueden tener diferentes maneras de representar los resultados en la clasificación de las muestras desconocidas; por ejemplo, pueden ser visualizados empleando un gráfico de Cooman [Figura 5], que muestra la discriminación de dos clases a la vez.

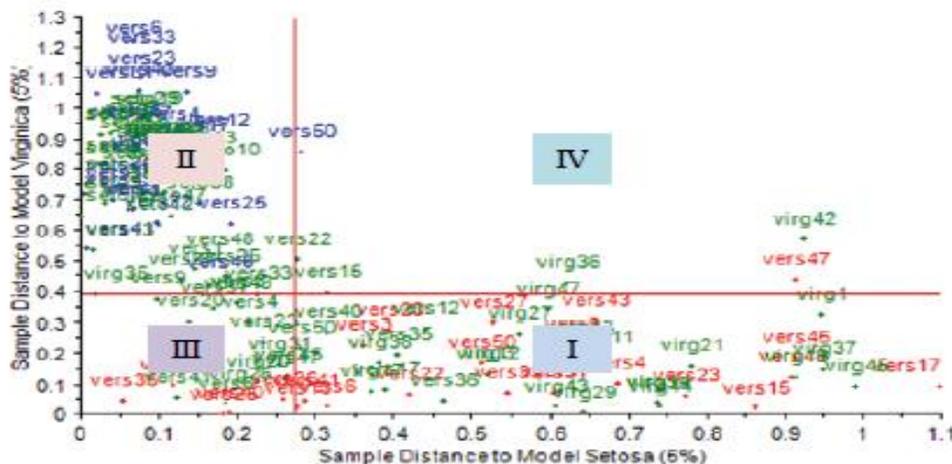


Figura 5. Ejemplo de un gráfico de Cooman; las líneas rojas indican las distancias críticas.

La distancia desde el modelo para la clase 1 es representada frente la distancia del modelo 2, las distancias críticas son indicadas en ambos ejes. Por lo tanto, se definen cuatro zonas en el gráfico: clase 1 (I), clase 2 (II), una zona de confusión en la cual se superponen las clases 1 y 2 (III), y la zona de valores atípicos (IV). Al representar las muestras del conjunto de validación en este gráfico, es más fácil evaluar qué tan certera es la clasificación.

1.6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA, PARTIAL LEAST SQUARES - DISCRIMINANT ANALYSIS).

Es un método supervisado de análisis que se basa en la regresión en mínimos cuadrados parciales [50]. Las variables independientes (X) pueden ser el espectro o el cromatograma de cada muestra, mientras que la variable dependiente Y es una variable categórica, definida por el analista, que codifica cada clase de manera numérica. Habitualmente, la matriz Y consta de números enteros [52].

El resultado de la regresión son valores de Y cercanos a los que indican cada categoría. Una muestra del conjunto de predicción se considera que está correctamente

categorizada si cumple dos criterios: debe tener un perfil cromatográfico o espectral que no sea significativamente diferente de los perfiles de las muestras que forman el conjunto de calibración y el valor calculado de la variable categórica debe estar dentro de un intervalo de valores alrededor del número con el que se codifica la categoría (cut - off value).

1.6.5. VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS Y SELECCIÓN DEL NÚMERO DE FACTORES.

Por último, se selecciona un número adecuado de muestras de cada variedad, país de origen y/o año de cosecha para obtener un set de calibrado con el cual se genera un modelo predictivo. Posteriormente se debe verificar el modelo al utilizarlo para predecir la pertenencia a un grupo de aquellas muestras no consideradas en el set de calibrado. Esta verificación (también llamada validación) de un modelo basado en datos empíricos significa revisar qué tan bien se desempeñará cuando sea utilizado en la predicción de nuevas muestras, del mismo tipo que las utilizadas en su construcción; es decir, estima la incertidumbre de las futuras predicciones. Si la incertidumbre es razonablemente baja, el modelo puede ser considerado válido [46, 52]. La verificación de la bondad del modelo se puede ensayar sobre un nuevo conjunto de muestras, distintas de las utilizadas en la construcción del mismo (llamado conjunto de prueba, test set) o mediante un sistema de validación cruzada (cross-validation).

Con el método de la validación cruzada, las mismas muestras se utilizan tanto para la estimación del modelo, como para su evaluación. Unas cuantas muestras quedan fuera del conjunto de calibración y se construye un modelo con las muestras restantes. Entonces, son predichas las muestras que han quedado fuera de la calibración y se calculan los residuales de predicción.

El proceso se repite con otro subconjunto de muestras del conjunto de calibración, y así sucesivamente hasta que todos los objetos se ha dejado fuera una vez [53]. A partir de la validación cruzada se pueden calcular figuras de mérito para evaluar cómo se comporta el modelo cuando se aplica a nuevos datos y también se puede determinar el número óptimo de factores a incluir (componentes principales para un PCA o variables latentes en un PLS) [54]. Los nombres de las figuras de mérito obtenidas, en la validación cruzada y en la predicción de un conjunto de muestras independiente, varían entre los diferentes programas de quimiometría; en este trabajo, se han utilizado los siguientes:

- ✚ Raíz del error cuadrático medio de calibración (RMSEC, root mean square error of calibration), nos proporciona información sobre el ajuste del modelo a los datos de calibración; es una medida de lo bien que se ajusta el modelo a los datos.

- ✚ Raíz del error cuadrático medio de la validación cruzada (RMSECV, root mean square error of cross-validation), que es una medida de la capacidad de un modelo para predecir las muestras que no fueron utilizadas para construirlo durante el procedimiento de validación cruzada.
- ✚ Raíz del error cuadrático medio de predicción (RMSEP, root mean square error of prediction), nos da información sobre el ajuste del modelo a los datos de predicción. Son utilizadas las muestras de validación preparadas y medidas independientemente de las muestras de calibración; es decir, que no fueron empleadas en la construcción del modelo o en la validación cruzada.

El parámetro PRESS (Predictive Residual Sum of Squares) es la suma del cuadrado de los residuales utilizando un modelo construido con un determinado número de componentes principales o variables latentes. El PRESS se representa gráficamente en función del número de factores y sirve como ayuda para la selección del número óptimo de componentes en el modelo. El error del modelo debería decrecer en la medida en que se incluyen factores que describen grandes cantidades de varianza sistemática, y debería aumentar al incluir factores que describen ruido; es decir, que sólo describen una pequeña cantidad de varianza. Se debe seleccionar el número de factores donde el error del modelo sea mínimo [46, 54].

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Clasificar aceites nacionales de las variedades arbequina, arbosana, frantoio y picual y españoles de la variedad arbequina y picual, en base a su perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos, a través de diferentes herramientas quimiométricas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Caracterizar los componentes volátiles preponderantes y el perfil de ácidos grasos de los aceites de oliva extra virgen monovarietales (arbequina, arbosana y picual) de origen chileno y (arbequina y picual) de origen español.

2.- Comparar los aceites de oliva extra virgen monovarietales procedentes de Chile y España en relación al perfil de ácidos grasos y los compuestos volátiles que son responsables del aroma del aceite.}

3.- Realizar un análisis quimiométrico mediante PCA, LDA, SIMCA, y PLS-DA del perfil de compuestos volátiles y ácidos grasos para establecer diferencias o similitudes entre los aceites de distintas variedades producidos en Chile y en España.

3.- HIPÓTESIS

Las condiciones edafoclimáticas (relativo al suelo y al clima) y la variedad influirían en los perfiles cuantitativos de los componentes volátiles y de los ácidos grasos en los aceites de oliva extra virgen chilenos y españoles.

4. MATERIALES Y REACTIVOS

Para el desarrollo de este trabajo se requirieron los siguientes materiales, que incluyen tanto reactivos utilizados como equipamiento y software estadísticos.

4.1. MATERIALES.

- Viales.
- Vaso pp.
- Agitador magnético.
- Holder SPME.
- Fibra de microextracción en fase sólida (SPME) DVB/Carboxen/PDMS (50/30mm).
- Termómetro de contraste digital VWR Traceable.
- Micropipeta Hirshmann (20-200 μ l).
- Columna capilar HP5-MS (30m x 0,32mm x 0,25 DI)

4.2. REACTIVOS.

- Aceite de Maravilla
- Aceite de Oliva Vírgenes
- Metanol HPLC.
- Hexano HPLC
- Etanol p.a.
- Fenolftaleina
- Trisitol NaOH 0,1 N
- Trisitol Tiosulfato de Sodio 0,1 N
- Ácido Acético glacial p.a.
- Cloroformo p.a.
- Yoduro de Potasio.
- Almidón.
- Hidróxido de Potasio p.a
- Cromato de Potasio p.a.
- Isooctano Espectrofotométrico .
- Estándar de Mezcla de Ácidos Grasos, Supelco 37 FAMEMix, 47885-U.
- Estándar interno, 4 methyl 2 pentanol Sigma Aldrich.

4.3. EQUIPAMIENTO.

- Cromatografo de Gases Varian modelo 421-GC.
- Espectrómetro de masas Varian modelo 220-MS.
- Placa calefactora marca Heidolph MR Hei-Standard
- Balanza analítica 125 A (± 0.0001 g) Precisa.
- Columna capilar HP-5MS 30m x 0,32mm x 0,25 DI
- Columna capilar SPTM – 2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 μ m film de espesor),
- Cromatógrafo de Gases Varian star 3400 CX con detector FID

4.4. OTROS.

- Base de Datos NIST 2005
 - Librería Varían 2005
 - Software Estadísticos (Statgraphics, Unscramble)
-

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada para la caracterización de los compuestos volátiles consideró la técnica de Microextracción en Fase sólida (SPME) para la adsorción de los compuestos volátiles en el aceite, además se estudió la composición de los ácidos grasos de las muestras analizadas mediante la técnica de trans-esterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico, se consideran las siguientes etapas para la realización del presente trabajo:

5.1.- OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA "ACEITE DE OLIVA VIRGEN"

Las muestras de origen chileno de las variedades de arbequina, arbosana, frantoio y picual fueron obtenidas a través de productores provenientes de plantaciones entre las regiones III a VII [Tabla 4], zona de mayor producción en Chile, se analizaron un total de 57 muestras; 29 muestras de arbequina, 11 muestras de arbosana, 12 muestras de frantoio y 5 muestras de la variedad picual, las muestras provenientes de España fueron obtenidas a través de la Sra. María Luisa Ruiz Domínguez, Jefa Panel Cata Valencia, España, se analizaron un total de 16 muestras, 12 muestras de arbequina y 4 muestras de la variedad picual.

Tabla 4.

Origen de los aceites de oliva analizados campaña.

Variedad / Región	Chile					España
	III	IV	V	VI	VII	Valencia
Arbequina	4	4	-	12	9	12
Arbosana	4	1	-	5	1	-
Frantoio	7	2	-	1	2	-
Picual	-	1	1	1	2	4

Universalmente la cosecha de olivas para el aceite se ha definido según la escala de Ferreira (0-7) en un estado de maduración en los valores de 3 a 4 (piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto a piel negra y pulpa blanca) [55], es decir, inicio de pinta de la aceituna, para este estudio se consideró los puntos de maduración 3 a 4 como una variable constante.

5.2.- PARÁMETROS DE CALIDAD (ACIDEZ, PERÓXIDOS, K_{232} Y K_{270}).

Para la determinación de los índices generales de la calidad del aceite de oliva virgen para todas las muestras, se utilizó la metodología del Reglamento 2568/91/ CEE relativo a las características de los aceites de oliva y orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis [56], relacionado con el grado de acidez, índice de peróxidos y absorción espectrofotométrica en el ultravioleta. Los resultados de grado de acidez se expresan en porcentaje de ácido oleico, el índice de peróxidos en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite, y la absorción espectrofotométrica en el ultravioleta como coeficiente de extinción a 270 nm (K_{270}) y a 232 nm (K_{232}).

5.3.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

La extracción de los ácidos grasos se realizó de acuerdo a la metodología del Reglamento (CE) 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 [56]. Anexo "X" B; método A: transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico".

Se pesó aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite con una aproximación de 0,1 mg para posteriormente añadir 3 ml de hexano, se agitó y luego se agregó 0,5 ml de una solución metanólica 2 N de hidróxido potásico, se agitó durante 30 segundos, hasta la separación de fases. La fase superior, que es la que contiene los ésteres metílicos fue inyectada en el cromatógrafo de gases con detector de Ionización de Llama (GC-FID). El análisis de perfil de ácidos grasos fue realizado en triplicado.

5.4.- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.

La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante la técnica SPME desde el espacio de cabeza de la muestra (HS-SPME).

Se tomaron 2,0 g. de la muestra y se fortificó con 20 μ l de 4 metil 2 pentanol (estándar interno) en un vial sellado de 10 ml. el cual fue colocado en baño de agua con agitador magnético a 40°C durante 40 min., la desorción posterior de los analitos se realizó en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas mediante la técnica de microextracción en fase sólida desde el espacio de cabeza de la muestra (GC-MS-HS-SPME) [57, 58].

5.5.- CROMATOGRAFÍA DE GASES, PARA DETERMINACIÓN DE: ÁCIDOS GRASOS (GC-FID) Y COMPUESTOS VOLÁTILES (GC-MS-HS-SPME).

Para la caracterización de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a detector de ionización de llama. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: temperatura inyector 250° C, temperatura del horno 160°C por 14 min.; incremento de 2° C/min hasta 200°C por 15 min, temperatura detector 260°C; gas carrier hidrogeno presión 40 psi; El equipo utilizado es un cromatógrafo de Gases Varian star 3400 CX con detector FID ; columna capilar SPTM – 2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 µm film de espesor).

Para el análisis de los compuestos volátiles se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masa. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura inyector 200° C, temperatura del horno 35°C por 10 min.; incremento de 3° C/min hasta 160°C; para luego aumentar 15°C/min hasta 200°C por 5 min, línea de transferencia: 270° C; temperatura espectrómetro de masas 200°C; gas carrier helio, flujo 1.0 ml/min; El equipo utilizado es un GC Varian 421-GC y 220-MS; columna DB-5 (30 mt. x 0.25 mm x 0.25 ID.) .

La identificación de los compuestos orgánicos detectados se realizó mediante la base de datos NIST y biblioteca acoplada al espectrómetro de masas [59, 60]. Además se utilizó como estándar interno, 4 metil 2 pentanol, para la cuantificación de los compuestos. La Figura 6 resume de forma esquemática la metodología analítica empleada para la determinación de compuestos volátiles mediante GC-MS-HS-SPME.

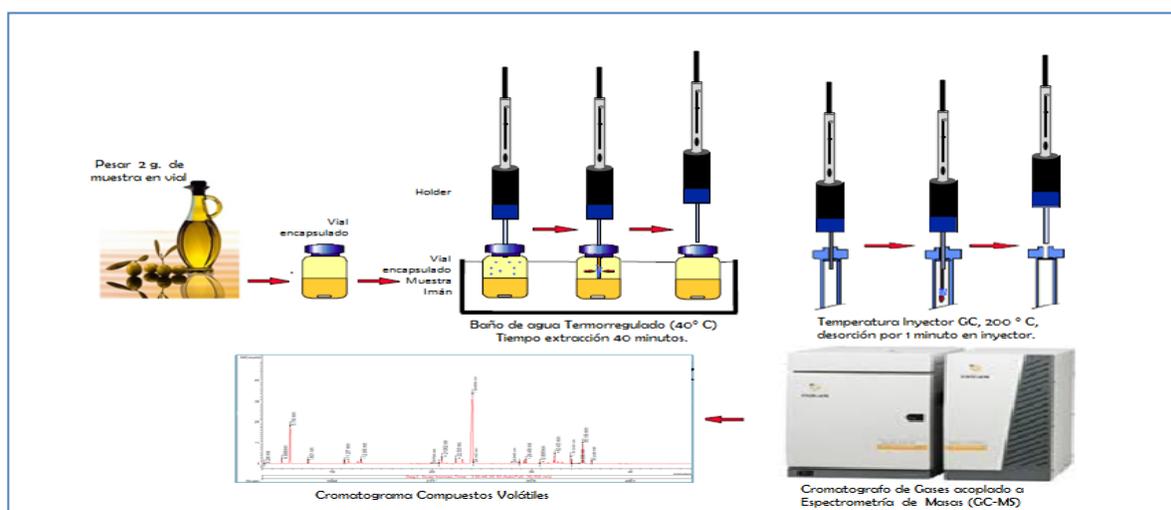


Figura 6. Esquemización de metodología analítica para la determinación de compuestos volátiles por GC-MS-HS-SPME.

5.6.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS.

5.6.1. ANÁLISIS DE VARIANZAS (ANOVA) Y ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA).

Para la aplicación de las herramientas estadísticas ANOVA y LDA se utilizó el software Statgraphics Centurion XV (versión 15.1.02).

Los resultados del perfil de ácidos grasos y compuestos volátiles fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía. Posteriormente, como método de comparación de medias a un nivel de significación del 5% ($P < 0,05$), se utilizó el test de múltiples intervalos LSD (distribución t de Student, menor diferencia significativa) para determinar si había o no diferencias significativas entre las medias.

Se consideraron como variables dependientes 12 ácidos grasos y los siguientes compuestos volátiles: hexanal, trans 2 hexenal, cis 3 hexenal, cis 3 hexenol, trans 2 hexenol, hexanol, cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo y como factores de comparación: variedad de aceituna, año de cosecha y país de origen, para el total de 73 muestras de aceite de oliva.

Para construir los modelos de clasificación en el LDA se emplearon todos los datos obtenidos (descriptores) en el procedimiento experimental: 73 muestras, 12 ácidos grasos y 25 compuestos volátiles, los que fueron previamente centrados y estandarizados. Posteriormente se realizó una selección de las variables descriptoras significativas para cada modelo de clasificación mediante el método de selección inversa ("backwardselection") con un valor de $F \geq 4$ como criterio de retención en el modelo. Los factores de clasificación fueron la variedad, año y país de origen.

5.6.2. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA), MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA) Y ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA).

El PCA, SIMCA y PLS-DA fueron realizados utilizando el programa The Unscrambler (versión 9.7). En todos los modelos se realizó previamente el centrado y estandarización de los datos dada la variabilidad de la concentración de las variables descriptoras (ácidos grasos y compuestos volátiles). En todos los casos el número de componentes necesarios para describir adecuadamente la variabilidad de cada una de las matrices de información se determinó mediante validación cruzada dejando una muestra fuera a la vez ("full crossvalidation").

El modelo supervisado SIMCA para la clasificación de los aceites por variedad consideró en primer término la realización de PCA por cada variedad de aceituna (PCA independientes) determinando sus respectivos número de componentes óptimos mediante validación cruzada. Posteriormente se compararon las varianzas de cada grupo y la residual para cada muestra, determinándose distancia de clases (F crítico) y gráfico de residuo (S_i) v/s "leverage" (H_i) obteniendo con ello la clasificación de cada muestra de acuerdo a la variedad de aceituna establecida.

Por último, para la construcción del modelo supervisado PLS-DA se utilizaron los datos centrados y estandarizados de todas las variables como matriz de información "X" (AG y COV). Mientras que el vector "Y" fue construido con valores de 1 a 4. El número de componentes necesarios para describir adecuadamente la variabilidad de este vector igualmente se determinó mediante validación cruzada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó un total de 73 muestras de aceite de oliva extravirgen, la categoría de estos aceites fue confirmada por medio de la determinación de acidez libre, índice de peróxidos y absorción espectrofotométrica en el ultravioleta K_{232} y K_{270} cumpliendo con la normativa del Reglamento (CE) 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 [56] y COI, para un valor de acidez libre menor o igual a 2,0 mg/kg, índice de peróxidos menor o igual a 20 mg/kg y K_{232} y K_{270} menor a 2,5 y 0,22, respectivamente (ver Anexo 1).

6.1. COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE ACEITES DE OLIVA.

A partir de los datos obtenidos de las 73 muestras (nacionales y españolas) las cuales fueron analizadas en triplicado, se analizó el perfil en ácidos grasos del conjunto de muestras para las variedades arbequina y picual (muestras nacionales y españolas) y las variedades frantoio y arbosana (muestras nacionales). En las Figura 7 y 8, se muestra un cromatograma de estándar de ácidos grasos (FAME MIX-37) y un cromatograma de un aceite de oliva, variedad arbequina, en donde se ve claramente el predominio de los ácidos grasos insaturados (C16:1, C17:1, C18:1, C18:2, C18:3, C20:1) por sobre los saturados, (C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0), en especial del ácido monoinsaturado C18:1, que es el que caracteriza al aceite de oliva, por su alto contenido.

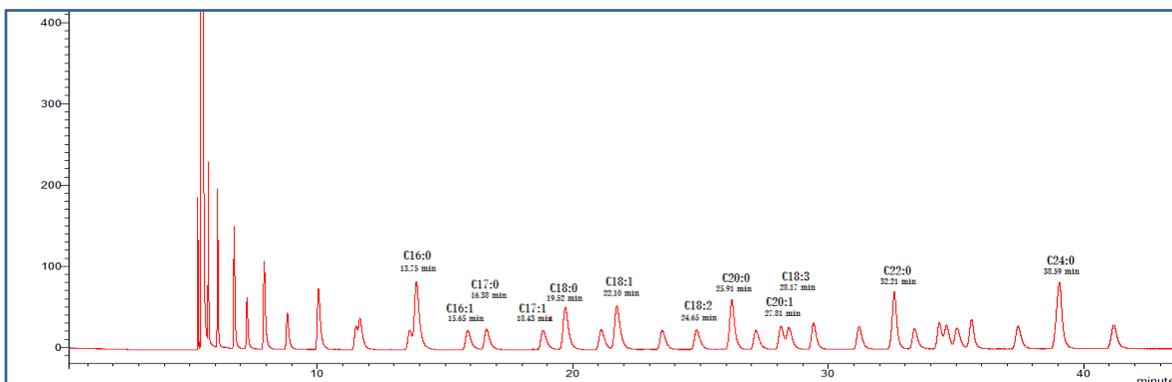


Figura 7. Cromatograma estándar ácidos grasos FAME MIX 37, ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido heptadecanoico (C17:0) y heptadecenoico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenoico (C20:1), ácido heneicosenoico (C21:0), ácido behénico (C22:0) y ácido lignocérico (C24:0).

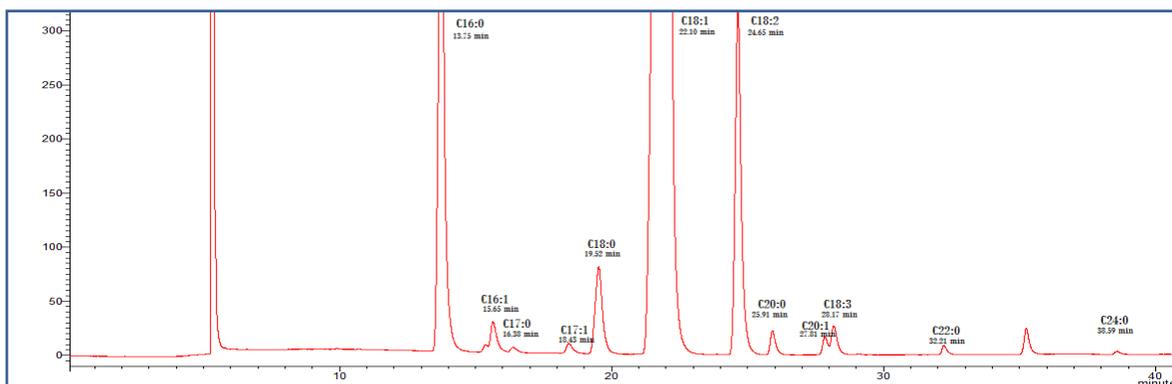


Figura 8. Cromatograma aceite de oliva extra virgen, variedad arbequina, ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido heptadecanoico (C17:0) y heptadecenoico (C17:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenoico (C20:1), ácido heneicosenoico (C21:0), ácido behénico (C22:0) y ácido lignocérico (C24:0).

Para el perfil de ácidos grasos se realizó el test de análisis de varianzas (ANOVA) en donde las diferencias fueron consideradas significativas para un $p < 0,05$ (5% de significancia, 95% nivel de confianza). Posteriormente se aplicó un test de intervalos múltiples de Fisher (mínima diferencia significativa "Least significant difference" LSD) con un 95% de nivel de confianza. Se consideró como factores de variación: variedad de aceituna (arbequina, picual, arbosana y frantoio), país de origen del aceite (Chile v/s España) y año de cosecha para la variedad arbequina y arbosana (campana 2012 v/s 2013).

La distribución de los ácidos grasos, desviación estándar y las diferencias significativas se muestran en las tablas 5, 6 y 7, información respecto a la calidad y estabilidad de los aceites de oliva se proporciona en la Tabla 8.

Tabla 5.

Perfil de ácidos grasos de aceites de oliva extra virgen, variedades arbequina, picual, arbosana y frantoio, expresado como % de ésteres metílicos (media, valor mínimo y valor máximo).

Composición	Picual (n=9)			Arbequina (n= 41)			Arbosana (n=11)			Frantoio (n=12)		
	media	mínimo	máximo									
Ácido Palmítico (C16:0)	10,9 ^{ab}	8,0	12,7	12,0 ^b	8,7	15,5	12,2 ^b	10,8	13,7	11,3 ^a	10,1	12,1
Ácido Palmítoleico (C16:1)	0,88 ^a	0,45	1,17	1,03 ^b	0,71	1,68	1,06 ^b	0,68	1,33	0,78 ^a	0,63	1,00
Ácido Heptadenoico (C17:0)	0,05 ^a	0,02	0,07	0,10 ^b	0,06	0,13	0,12 ^b	0,08	0,17	0,04 ^a	0,03	0,08
Ácido Heptadecanoico (C17:1)	0,10 ^a	0,06	0,15	0,23 ^b	0,16	0,29	0,30 ^b	0,22	0,40	0,11 ^a	0,08	0,23
Ácido Esteárico (C18:0)	2,7 ^b	2,2	3,3	2,0 ^a	1,8	2,3	2,1 ^a	1,8	2,2	2,1 ^a	1,9	2,4
Ácido Oleico (C18:1)	79,5 ^c	76,0	82,1	75,5 ^a	70,7	79,8	76,7 ^{ab}	75,2	79,2	77,9 ^{bc}	76,2	79,6
Ácido Linoleico (C18:2)	4,3 ^a	3,1	5,5	7,6 ^c	5,6	9,8	5,9 ^b	5,4	6,9	6,2 ^b	4,3	7,9
Ácido Linolénico (C18:3)	0,69 ^b	0,51	0,83	0,58 ^a	0,48	0,72	0,67 ^b	0,62	0,73	0,64 ^b	0,46	0,78
Ácido Eicosanoico (C20:0)	0,41 ^{ab}	0,38	0,47	0,42 ^b	0,37	0,61	0,42 ^{ab}	0,39	0,45	0,39 ^a	0,34	0,45
Ácido Eicosenoico (C20:1)	0,25 ^a	0,20	0,29	0,32 ^{ab}	0,23	0,87	0,30 ^{ab}	0,20	0,45	0,28 ^{ab}	0,19	0,32
Ácido Docosanoico (C22:0)	0,13 ^{ab}	0,10	0,18	0,15 ^a	0,09	0,30	0,17 ^b	0,14	0,23	0,13 ^a	0,08	0,18
Ácido Tetracosanoico (C24:0)	0,06 ^{ab}	0,04	0,08	0,06 ^b	0,05	0,11	0,07 ^b	0,05	0,08	0,06 ^a	0,03	0,07

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

En la tabla 5 se observa que la variedad arbequina y arbosana presentan un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de ácidos palmítico, palmitoleico, heptadenoico y heptadecanoico con respecto a las variedades picual y frantoio. La variedad picual presentó un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de ácido esteárico y un contenido significativamente menor ($p < 0,05$) de ácido linoleico, con respecto a las variedades arbequina y frantoio. El ácido oleico presentó diferencias significativas en las tres variedades. El ácido linolénico presentó un contenido significativamente menor para la variedad arbequina. Los ácidos eicosanoico, eicosenoico, docosanoico, y tetracosanoico no presentan diferencias estadísticas significativas entre las variedades.

Al margen de las diferencias significativas señaladas previamente para las diferentes variedades, es posible comentar que la variedad picual presenta el mayor contenido de ácido oleico (79,53 %) y el más bajo contenido de ácido linoleico (4,32 %) frente a la variedad arbequina que presenta el menor contenido de ácido oleico (75,50 %) y el mayor contenido de ácido linoleico (7,62 %) respecto a las otras variedades estudiadas.

El ácido oleico, se encuentra por sobre un 75% en las muestras de las cuatro variedades, picual presenta el valor más elevado (79,5%), le sigue frantoio (77,9%), luego arbosana (76,7%), y finalmente arbequina (75,5%). Estos resultados concuerdan con diversos autores [61, 62, 63], los cuales indican; variedad picual (79,3%) frantoio (78,3%) y arbosana (75,7%) pero no para la variedades arbequina (69,0%) . El contenido de ácido linoleico de la variedad picual (4,3 %) está de acuerdo con el perfil descrito por Sánchez Casas [64] (3,48%) y el de la variedad frantoio (6,2%) con el de Aguilera [61] (6,79%). La variedad arbequina (7,6%) se aleja de los valores descritos como aceptables para esta variedad (10,75%) [65] y la variedad arbosana (5,9 %) está dentro de los valores esperados (5,7 %) según Mansouri [63]. Uno de los factores que más influye en la distribución de los ácidos grasos, es la variedad de la aceituna y su grado de maduración [66].

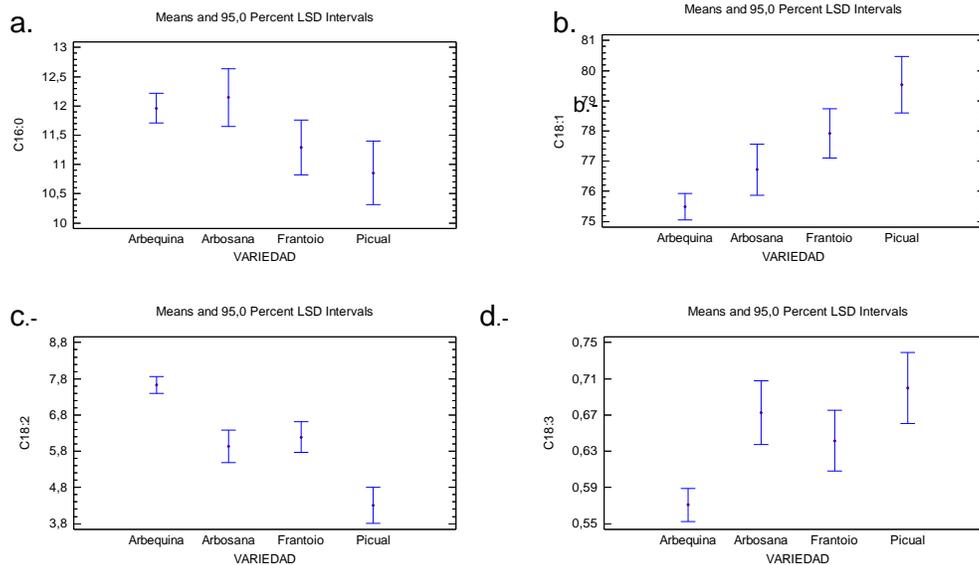


Figura 9. Gráficos del test de intervalos múltiples de Fisher para los contenidos de los principales ácidos grasos del aceite de oliva de las cuatro variedades analizadas. a.- ácido palmítico b.- ácido oleico c.- ácido linoleico d.- ácido linolenico.

La figura 9 muestra los gráficos de medias e intervalos LSD para los ácidos grasos más relevantes en el perfil del aceite de oliva. En esta se observan diferencias significativas en aquellos casos donde los intervalos no se traslapan en dirección vertical.

Tabla 6.

Perfil en ácidos grasos de aceites de oliva extra virgen chilenos y españoles para las variedades arbequina y picual, expresado como % de ésteres metílicos (media, valor mínimo y valor máximo).

Composición	Chile						España					
	Picual (n=5)			Arbequina (n=29)			Picual (n=4)			Arbequina (n=12)		
	media	mínimo	máximo									
Ácido Palmítico (16:0)	10,2 ^a	8,0	11,7	11,6 ^a	8,7	13,9	11,7 ^a	11,0	12,7	12,9 ^b	11,4	15,5
Ácido Palmítoleico (16:1)	0,70 ^a	0,45	0,97	0,97 ^a	0,71	1,40	1,11 ^a	1,07	1,17	1,18 ^b	0,96	1,68
Ácido Heptadenoico (17:0)	0,04 ^a	0,03	0,06	0,09 ^a	0,06	0,13	0,05 ^a	0,02	0,07	0,11 ^b	0,09	0,13
Ácido Heptadecanoico (17:1)	0,10 ^a	0,06	0,15	0,24 ^a	0,16	0,29	0,10 ^a	0,07	0,14	0,23 ^a	0,22	0,25
Ácido Esteárico (18:0)	2,6 ^a	2,2	3,3	2,0 ^a	1,8	2,3	2,9 ^a	2,6	3,3	2,0 ^a	1,8	2,3
Ácido Oleico (18:1)	80,6 ^a	78,0	82,1	76,3 ^a	72,3	79,8	78,2 ^a	76,0	79,5	73,6 ^b	70,7	75,9
Ácido Linoleico (18:2)	4,2 ^a	3,1	5,4	7,2 ^a	5,6	9,8	4,5 ^a	3,8	5,5	8,5 ^b	7,7	9,6
Ácido Linolénico (18:3)	0,64 ^a	0,51	0,82	0,58 ^a	0,48	0,72	0,76 ^a	0,66	0,83	0,56 ^a	0,51	0,67
Ácido Eicosanoico (20:0)	0,42 ^a	0,39	0,47	0,43 ^a	0,37	0,61	0,40 ^a	0,38	0,42	0,41 ^a	0,37	0,45
Ácido Eicosenoico (20:1)	0,26 ^a	0,23	0,29	0,35 ^a	0,27	0,87	0,23 ^a	0,20	0,24	0,27 ^b	0,23	0,31
Ácido Docosanoico (22:0)	0,14 ^a	0,13	0,18	0,16 ^a	0,12	0,30	0,11 ^a	0,10	0,13	0,12 ^b	0,09	0,14
Ácido Tetracosanoico (24:0)	0,06 ^a	0,04	0,08	0,07 ^a	0,05	0,11	0,06 ^a	0,05	0,07	0,06 ^b	0,05	0,07

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

El factor de variación de acuerdo al país de origen para las variedades picual y arbequina se muestran en la tabla 6, donde se observa que para la variedad picual chilena solo presenta un contenido significativamente menor ($p < 0,05$) de ácido palmítoleico con respecto a la variedad picual de origen español, para los otros ácidos la variedad picual no presentan diferencias estadísticas significativas indistintamente del origen geográfico.

La variedad arbequina española presentó un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de ácido palmítico, palmítoleico, heptadenoico y linoleico respecto a las muestras nacionales quienes presentaron un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) para los ácidos oleico, eicosenoico, docosanoico y tetracosanoico. Los ácidos heptadecanoico, esteárico, linolénico y eicosanoico no presentan diferencias estadísticas significativas.

La variabilidad que presentan los resultados está dentro de los rangos expresados para aceites de oliva virgen, los cuales presentan un alto contenido en ácido oleico y niveles inferiores para el ácido linoleico. De acuerdo, a los criterios de calidad establecidos en el Reglamento (CE no 2568/91) [56] y en el CODEX STAN 33-19818(Rev. 2-2003) [67] para los aceites de oliva extravirgenes, se observa que todos los ácidos grasos cumplen con los niveles especificados como límites máximos o intervalos de concentración establecidos (ver Anexo 2).

La tabla 7 muestra el perfil de ácidos grasos para la campaña 2011-2012 y 2012-2013 para las variedades arbequina, arbosana y frantoio de origen chileno, para la variedad arbequina se presentan concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) para los ácidos palmítoleico, eicosenoico, docosanoico y tetracosanoico para la campaña 2011-2012, los otros ácidos no presentan diferencias estadísticas significativas. En el caso de la variedad arbosana sólo se presentan concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) para los ácidos palmítico, palmítoleico y heptadecanoico, por último, la variedad frantoio no presenta diferencias estadísticas significativas entre ambas campañas de muestreo.

Respecto al estudio de los ácidos grasos en aceite de oliva, algunos autores indican que la composición ácida procedente de diversas campañas, épocas de recolección y variedades, afectan principalmente las variaciones porcentuales del contenido en ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico [7], en este estudio se observó que para las cuatro variedades (arbequina, arbosana, frantoio y picual) existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los ácidos mencionados previamente, considerándose relevante, el ácido oleico que presentó diferencias significativas en tres variedades, ácido monoinsaturado importante en la elaboración de alimentos, ya que es idóneo para cocinar a altas temperaturas sin llegar a deteriorarse.

Tabla 7.

Perfil en ácidos grasos de aceites de oliva extra virgen para la campaña 2011-2012 y 2012-2013 para las variedades arbequina, arbosana y frantoio de origen chileno, expresado como % de ésteres metílicos (media, valor mínimo y valor máximo).

Composición	Arbequina						Arbosana						Frantoio					
	2012 (n= 14)			2013 (n=15)			2012(n=7)			2013 (n=4)			2012(n=3)			2013 (n=9)		
	media	mín.	máx.															
Ácido Palmítico (C16:0)	11,7 ^a	8,7	13,9	11,5 ^a	10,2	12,6	12,5 ^a	11,2	13,7	11,6 ^b	10,8	12,0	11,5 ^a	11,2	11,6	11,3 ^a	10,1	12,1
Ácido Palmítoleico (C16:1)	1,01 ^a	0,71	1,40	0,9 ^b	0,75	1,08	1,15 ^a	0,87	1,33	0,92 ^b	0,68	1,10	0,77 ^a	0,71	0,88	0,79 ^a	0,63	1,00
Ácido Heptadenoico (C17:0)	0,09 ^a	0,06	0,12	0,1 ^a	0,08	0,13	0,12 ^a	0,08	0,17	0,13 ^a	0,09	0,17	0,03 ^a	0,03	0,04	0,05 ^a	0,03	0,08
Ácido Heptadecanoico (C17:1)	0,23 ^a	0,16	0,29	0,2 ^a	0,16	0,29	0,31 ^a	0,26	0,40	0,28 ^b	0,22	0,31	0,09 ^a	0,08	0,09	0,11 ^a	0,08	0,23
Ácido Esteárico (C18:0)	1,9 ^a	1,8	2,1	2,0 ^a	1,8	2,3	2,0 ^a	1,8	2,2	2,1 ^a	2,0	2,2	2,1 ^a	1,9	2,2	2,1 ^a	1,9	2,4
Ácido Oleico (C18:1)	75,8 ^a	72,3	79,8	76,7 ^a	74,9	78,2	76,5 ^a	75,2	77,8	77,2 ^a	76,0	79,2	78,0 ^a	76,2	79,6	77,9 ^a	76,4	78,8
Ácido Linoleico (C18:2)	7,6 ^a	5,6	9,8	7,0 ^a	5,9	8,8	5,9 ^a	5,4	6,4	6,1 ^a	5,4	6,9	6,0 ^a	4,3	7,9	6,3 ^a	5,5	7,6
Ácido Linolénico (C18:3)	0,59 ^a	0,48	0,72	0,6 ^a	0,49	0,65	0,68 ^a	0,63	0,73	0,65 ^a	0,62	0,68	0,74 ^a	0,69	0,78	0,61 ^a	0,46	0,75
Ácido Eicosanoico (C20:0)	0,44 ^a	0,38	0,61	0,4 ^a	0,37	0,49	0,40 ^a	0,39	0,42	0,44 ^a	0,41	0,45	0,39 ^a	0,35	0,40	0,39 ^a	0,34	0,45
Ácido Eicosenoico (C20:1)	0,40 ^a	0,28	0,87	0,3 ^b	0,27	0,33	0,27 ^a	0,20	0,31	0,34 ^a	0,29	0,45	0,29 ^a	0,27	0,32	0,27 ^a	0,19	0,32
Ácido Docosanoico (C22:0)	0,17 ^a	0,12	0,30	0,1 ^b	0,13	0,19	0,16 ^a	0,14	0,18	0,18 ^a	0,15	0,23	0,12 ^a	0,10	0,14	0,13 ^a	0,08	0,18
Ácido Tetracosanoico (C24:0)	0,07 ^a	0,05	0,11	0,1 ^b	0,05	0,08	0,07 ^a	0,05	0,08	0,07 ^a	0,06	0,08	0,05 ^a	0,05	0,06	0,05 ^a	0,03	0,07

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

Con el fin de profundizar en el estudio sobre caracterización de los aceites, en la tabla 8 se muestran relaciones entre ellos que simplifican en algunos casos las comparaciones entre los aceites en cuanto a sensibilidad de oxidación y enranciamiento como puede ser la relación insaturados/saturados en la implicancia respecto a trastornos cardiovasculares, además de entregar información respecto a la calidad y estabilidad de los aceites de oliva.

Tabla 8.

Índice de ácidos grasos, expresada en % de ésteres metílicos.

Composición	Chile				España	
	Picual (n=5)	Arbequina (n=29)	Arbosana (n=11)	Frantoio (n=12)	Picual (n=4)	Arbequina (n=12)
Ácidos grasos (AG)						
Saturados	13,5	14,1	15,0	14,0	15,2	15,6
AG. Insaturados	86,5	85,9	85,0	85,9	84,8	84,3
AG. Monoinsaturados	81,7	76,7	78,4	79,1	79,6	75,2
AG. Polinsaturados	4,9	9,1	6,6	6,8	5,2	9,1
Insaturados/Saturados	6,4	6,1	5,7	6,1	5,6	5,4
Monoinsat./Polinsat.	16,8	8,4	11,9	11,6	15,3	8,3
Oleico/Linoleico	19,2	9,3	12,9	12,6	17,5	8,6

- *Ácidos grasos (AG) Saturados: Suma de ácido palmítico (C16:0), ácido heptadecanoico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido eicosanoico (C20:0), ácido docosanoico (C22:0) y ácido tetracosanoico (C24:0).*
- *AG. Insaturados: Suma de ácido palmítoleico (C16:1), ácido heptadecanoico (C17:1), ácido Oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3) y ácido eicosenoico (C20:1).*
- *AG. Monoinsaturados: Suma de ácido palmítoleico (C16:1), ácido heptadecanoico (C17:1), ácido oleico (C18:1) y ácido eicosenoico (C20:1).*
- *AG. Polinsaturados: Suma de ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3).*

En la tabla 8 se muestran las relaciones en las que comparativamente se observa que los niveles medios de ácidos insaturados son muy similares en todas las variedades y diferentes zonas con un rango de 84,33% - 86,52%.

La relación insaturados/saturados presenta índices ligeramente superiores en el grupo de aceites nacionales (rango: 5,68 % - 6,42 %) frente a los que presentan los aceites Españoles (rango: 5,38 % - 5,60 %). Estas diferencias son apreciables si observamos los valores medios de los ácidos grasos saturados en los aceites nacionales, los cuales son menores, esta comparación permite concluir que los aceites con índices

mayores de insaturados/saturados son menos sensibles a la oxidación y al enranciamiento, lo que además podría implicar el aumento en la protección contra las enfermedades del corazón al controlar el colesterol LDL "malo", mientras se promueve el incremento de los niveles de colesterol HDL "bueno".

Las relaciones oleico/linoleico y monoinsaturados/poliinsaturados (Monoinsat./Polinsat.) proporcionan información respecto de la calidad y estabilidad de los aceites de oliva, como es posible observar en la tabla 8, las variedades arbosana y frantoio presentaron valores medios en relación a las otras variedades semejantes entre sí, en cambio la variedad arbequina presentó los valores más bajos para ambas zonas (Chile y España) y muy semejantes, lo que se traduce concretamente que éstos, presentan una estabilidad menor que la variedad picual, la cual sobresale con los valores más altos en cualquiera de estas relaciones, para ambas zonas, presentando una importante estabilidad reconocida para la variedad picual.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE ACEITES DE OLIVA.

En la fracción volátil de las muestras de aceites, se identificaron 25 compuestos volátiles determinados mediante la metodología analítica GC-MS-HS-SPME. Sin embargo, el test de análisis de varianzas se realizó sólo para los compuestos mayoritarios del aceite de oliva identificados como: hexanal, trans 2 hexenal, cis 3 hexenal, cis 3 hexenol, trans 2 hexenol, hexanol, cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo.

Los compuestos volátiles analizados y que forman parte del aroma son muy heterogéneos, están presentes en concentraciones de distintas magnitudes (mg/kg^{-1} a ng/kg^{-1}), de los cuales muchos superan el umbral de percepción estando presentes en muy bajas concentraciones: Las concentraciones de los compuestos volátiles fueron calculadas mediante la fortificación de estándar interno (4 metil 2 pentanol), expresándose los resultados obtenidos como μg de estándar interno por kg de aceite.

En las Figura 10, 11, 12 y 13 se muestran los cromatogramas de los compuestos volátiles analizados por la metodología GC-MS, para las variedades arbequina, frantoio, picual y arbosana, respectivamente.

La tabla 9 muestra los compuestos identificados y cuantificados para todas las muestras, la identificación de cada una de las señales cromatográficas se estableció mediante la comparación de espectros de masas, obtenidos a partir de la base de datos NIST y los análisis realizados en el laboratorio.

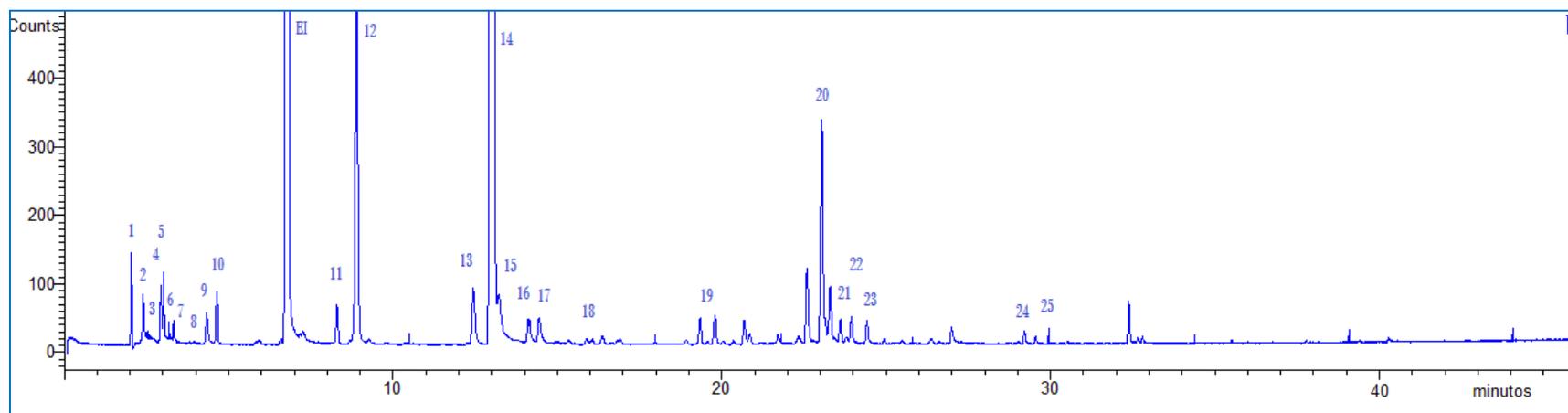


Figura 10. Cromatograma compuestos volátiles por GC-MS, variedad arbequina.

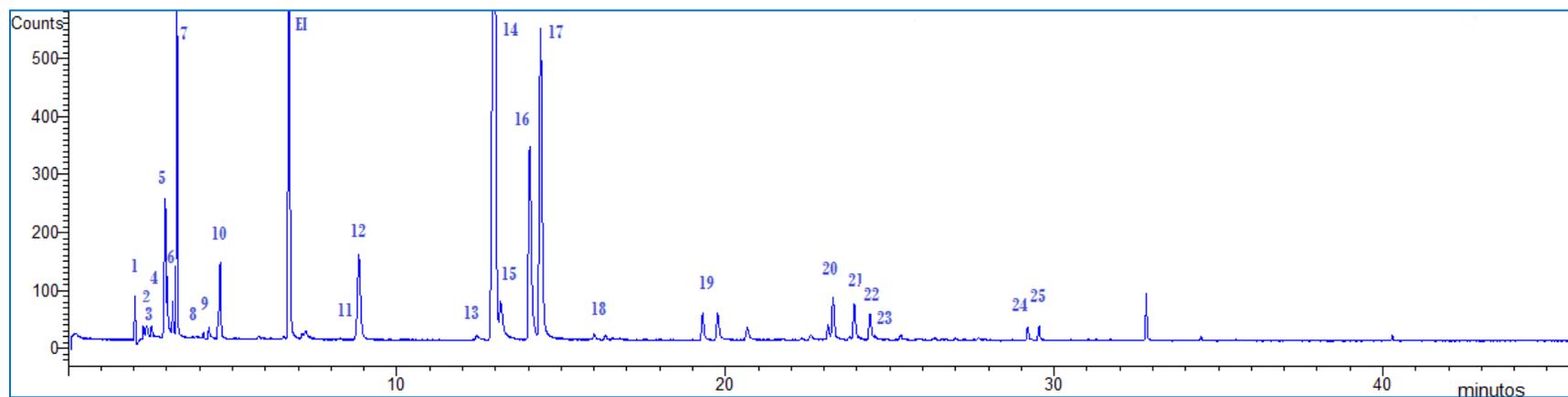


Figura 11. Cromatogramacompuestos volátiles por GC-MS, variedad frantoio.

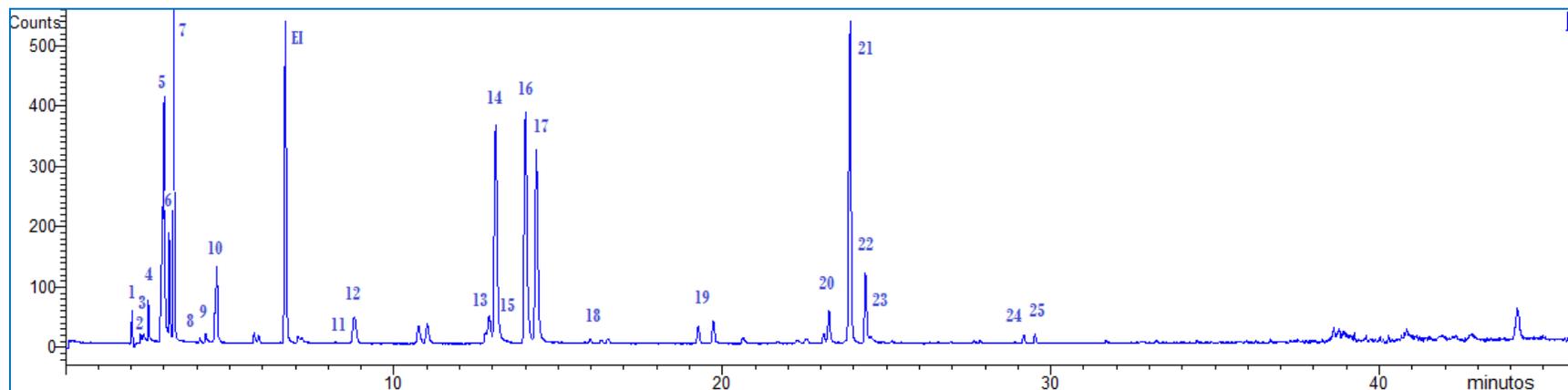


Figura 12. Cromatogramacompuestos volátiles por GC-MS, variedad picual.

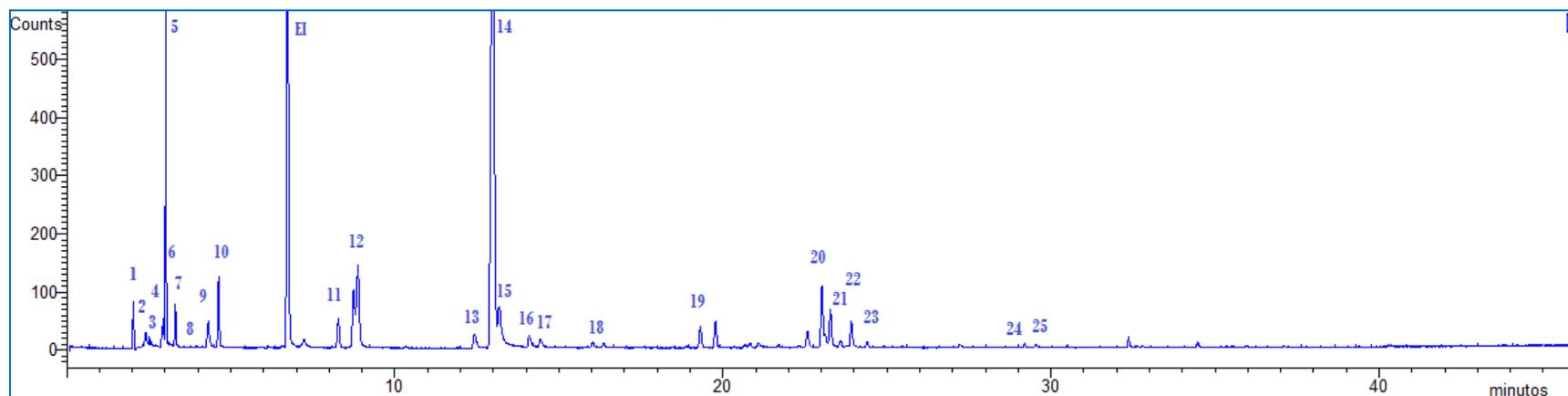


Figura 13. Cromatogramacompuestos volátiles por GC-MS, variedad arbozana.

1. etanol, 2. acetato de metilo, 3. metil 2 butanol 1,3,4. butanol, 5. acetato de etilo, 6. diclorometano, 7. benzaldehído, 8. metil 2 butanol, 9. pente 1 one 3,10. metil 3 butanol, 11. pentanol, 12. hexanal, 13. trans 2 hexenal, 14. cis 3 hexenal, 15. cis 3 hexenol, 16. trans 2 hexenol, 17. hexanol, 18. dihidromirceno, 19.ciclopropano, 1,1-dimetil-2-(.), 20.3 etil1,5-octadieno, 21.cis 3 acetato de hexenilo, 22.acetato de hexilo, 23.o-cimol, 24.nonanal, 25.etilfenol, metil eter

Tabla 9.

Concentración promedio de compuestos volátiles en aceites de oliva extra virgen, variedades arbequina, picual, arbosana y frantoio, expresado como μgde estándar interno (4 metil 2 pentanol) por kg de aceite(media, valor mínimo y valor máximo).

Compuestos volátiles	Picual (n=9)			Arbequina (n= 41)			Arbosana (n=11)			Frantoio (n=12)		
	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo
Etanol	11,8	0,9	40,3	51,5	1,8	212,9	13,8	3,6	57,5	3,5	0,4	10,2
Acetato de metilo	1,1	0,1	2,7	3,8	1,7	8,4	4,6	1,3	10,3	0,7	0,2	2,6
Metil 2 butadieno 1,3	0,6	0,1	2,3	2,8	0,8	5,7	5,8	3,8	8,6	5,2	0,2	21,8
Butanol	8	4	15	115	7	875	39	12	91	125	60	293
Acetato de etilo	20,1	0,2	63,6	30	4	89	44	6	279	3,5	0,7	10,5
Diclorometano	6,0	0,5	12,6	130	1	790	202	20	534	2,7	0,4	9,2
Benzaldehido	0,70	0,01	5,57	1,00	0,10	7,57	1,60	0,02	9,02	0,64	0,02	6,25
Metil 2 Butanol	0,40	0,04	0,88	2,60	0,18	16,18	1,90	0,04	6,23	0,48	0,02	2,85
penten 1 one 3	6	2	12	43	13	90	36	16	58	40	18	57
Metil 3 butanol	2,1	0,2	5,5	6,4	0,5	20,2	1,7	0,2	5,5	1,1	ND	5,8
Pentanol	43	11	94	121	95	229	123	94	213	111	99	127
Hexanal	4,8 ^a	0,8	10,0	21,3 ^b	8,8	43,8	22,0 ^b	10,9	34,6	26,2 ^b	14,5	46,4
Trans 2 hexenal	30 ^a	11	54	380 ^b	101	799	413 ^b	212	752	804 ^c	322	1568
Cis 3 Hexenal	44 ^{ab}	8	117	80 ^b	9	351	193 ^c	55	539	26 ^a	7	61
Cis 3 hexenol	5 ^a	1	10	65 ^c	18	237	146 ^d	21	243	108 ^b	39	175
Trans 2 Hexenol	7 ^a	1	16	94 ^b	34	202	204 ^c	28	396	177 ^c	64	278
Hexanol	9 ^a	1	23	93 ^b	25	359	152 ^c	66	311	35 ^a	17	62
Dihidromirceno	0,8	0,2	2,5	7,0	1,9	16,5	9,2	6,1	16,0	8,4	4,0	13,7
Ciclopropano, 1,1-dimetil-2-(.)	3,4	0,7	12,1	37,1	10,6	84,8	46,0	23,7	85,0	37,5	18,6	66,9
3 etil1,5-octadieno	1,1	0,2	3,5	15,1	2,8	78,8	22,0	7,7	53,6	4,4	0,5	14,8
cis 3 acetato de hexenilo	34,0 ^a	3,6	82,6	122,0 ^b	22,7	371,3	32,0 ^a	20,2	52,1	2,8	0,2	5,3
Acetato de hexilo	4,5 ^a	0,7	12,5	29,0 ^c	7,2	89,5	23,0 ^b	4,1	77,8	2,3	0,2	7,1
o-Cimol	0,03	ND	0,06	0,30	ND	0,78	0,20	0,01	0,52	0,12	ND	0,62
Nonanal	1,2	ND	3,8	3,5	ND	15,7	2,2	ND	9,0	1,2	ND	5,8
2-Etilfenol, metil eter	0,3	ND	0,6	0,3	ND	1,6	0,8	0,1	1,5	0,2	ND	1,4

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

Tal como se mencionó en la introducción, los compuestos volátiles de 6 carbonos son los componentes mayoritarios del aceite de oliva y son los responsables del aroma verde [11]. Las cuatro variedades estudiadas presentan diferencias debido a que la actividad enzimática está determinada para cada cultivar, observándose como resultado un amplio rango de concentraciones de los componentes.

En la tabla 9, se observa que la variedad arbequina, arbosana y frantoio presentan un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de hexanal respecto a la variedad picual. La variedad frantoio presentó un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de trans 2 hexenal, que la variedad arbequina y arbosana con valores medios y la variedad picual con un valor mucho menor. La variedad picual en general presentó valores bastante menores para cis 3 hexenal, cis 3 hexenol, trans 2 hexenol y hexanol comparada con las otras 3 variedades, sin embargo, para cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo, presentó un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$). La variedad frantoio en general presenta un contenido significativamente mayor ($p < 0,05$) de hexanal, trans 2 hexenal, para los compuestos cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo los valores medios fueron menores a las otras 3 variedades.

La importancia de la concentración de los compuestos volátiles señalados es la percepción aromática de olor verde con mayor o menor intensidad, algunos autores indican que éstos también podrían contribuir a otras percepciones sensoriales relacionadas con el sabor [68]. El trans 2 hexenal y trans 3 hexenol han sido relacionados con el atributo amargo del aceite, mientras que el hexanol y trans 2 hexenol se relaciona con atributos deseados o "agradables", sin embargo, la contribución de un volátil para el aroma depende no solo de su concentración, sino también de su umbral de olor. A grandes rasgos entonces se puede decir que la variedad frantoio es la que presentaría mayor amargor y la variedad que presenta un olor verde más agradable es la variedad arbosana con una concentración de 151 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (expresado como μg de estándar interno (4 metil 2 pentanol) por kg de aceite) de hexanol y 204 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (expresado como μg de estándar interno (4 metil 2 pentanol) por kg de aceite) de trans 2 hexenol.

El valor del aroma (AOV) es el parámetro utilizado para evaluar la contribución de los volátiles al aroma, es el que proporciona la primera idea sobre la contribución de dicho compuesto al aroma global del aceite [69]. Si la concentración del compuesto es igual o superior al umbral de detección, entonces el OAV es igual o mayor que la unidad y el compuesto participará en el aroma. Mientras mayor sea el cociente entre la concentración del compuesto y su umbral de percepción mayor será la participación [70], sin embargo, este parámetro no incluye sinergia entre compuestos, pues el aroma del

aceite de oliva está dado por un elevado número de compuestos volátiles muy diversos necesarios para proporcionar una aroma único y característico de cada variedad y aceite. Por lo que la concentración de cada uno de los compuestos no es concluyente, con todo, puede entregarnos mucha información global.

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el factor de variación país de origen para las variedades picual y arbequina se muestran en la tabla 10, se observa que para la variedad picual existen diferencias estadísticamente significativas para los compuestos volátiles de 6 carbonos (hexanal, trans 2 hexenal, cis 3 hexenal, cis 3 hexenol, trans 2 hexenol, hexanol, cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo), mientras que la variedad arbequina presenta diferencias estadísticamente significativas para hexanal, hexanol, cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo, para los otros volátiles la variedad arbequina no presenta diferencias estadísticas significativas indistintamente del origen geográfico.

Hexanal y hexanol son atributos positivos que le otorgan al aceite un aroma verde (manzana) y fruta (plátano) [35], respectivamente. Por lo tanto, las muestras nacionales de la variedad arbequina debieran presentar un aroma más intenso a los atributos mencionados que las muestras españolas, en contraste con las arbequinas españolas que presentan mayor concentración de cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo correspondiente al aroma de fruta dulce y verde [35].

Tabla 10.

Compuestos volátiles en aceites de oliva extra virgen chilenos y españoles para las variedades arbequina y picual, expresado como µgde estándar interno (4 metil 2 pentanol) por kg de aceite(media, valor mínimo y valor máximo).

Compuestos volátiles	CHILE						ESPAÑA					
	Picual (n=5)			Arbequina (n=29)			Picual (n=4)			Arbequina (n= 12)		
	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo
Etanol	3,4	0,9	7,5	19,4	1,8	53,2	22,3	13,0	40,3	128,9	42,0	212,9
Acetato de metilo	0,2	0,1	0,4	4,2	1,7	8,4	2,1	1,4	2,7	2,9	1,9	5,5
Metil 2 butadieno 1,3	0,3	0,1	0,6	3	1,0	5,4	1	0,4	2,3	2,2	0,8	5,7
Butanol 1	7	5	9	26	7	63	11	4	15	331	94	875
Acetato de etilo	2,2	0,2	5,3	26,8	4,3	88,6	42,4	18,6	63,6	35,9	15,3	60,5
Diclorometano	10,2	7,1	12,6	14,1	0,8	67,1	0,6	0,5	0,9	409,4	166,8	789,6
Benzaldehido	1,10	0,01	5,57	1,40	0,15	7,57	0,20	0,12	0,18	0,10	0,10	0,19
Metil 2 Butanol	0,10	0,04	0,29	2,80	0,18	16,18	0,60	0,36	0,88	2,20	1,17	3,65
penten 1 one 3	3	2	4	50	25	90	9	6	12	25	13	39
Metil 3 butanol	0,6	0,2	1,2	6,4	0,5	20,2	4	1,7	5,5	6,4	2,7	9,4
Pentanol	11	11	12	127	95	229	82	53	94	106	96	116
Hexanal	1,4 ^a	0,8	1,9	23,4 ^a	12,3	43,8	9,1 ^b	8,6	10,0	16,0 ^b	8,8	29,7
Trans 2 hexenal	39 ^a	25	54	408 ^a	101	799	19 ^b	11	25	311 ^a	160	623
Cis 3 Hexenal	12 ^a	8	15	88 ^a	9	351	85 ^b	68	117	59 ^a	21	98
Cis 3 hexen 1 ol	2 ^a	1	3	74 ^a	26	237	9 ^b	6	10	42 ^a	18	80
Trans 2 Hexen 1 ol	3 ^a	1	4	104 ^a	43	202	13 ^b	11	16	68 ^a	34	114
Hexanol	2 ^a	1	4	111 ^a	30	359	18 ^b	14	23	50 ^b	25	73
Dihydromircene	0,5	0,2	0,8	7,6	1,9	16,5	1,2	0,4	2,5	5,6	2,2	11,1
A-Cyclopropane, 1,1-dimethyl-2-(1-methyl-2-propenyl)	2,3	0,7	3,4	37,6	10,6	84,8	4,9	1,6	12,1	35,8	11,2	70,3
A-3 etil1,5-octadieno	0,8	0,2	1,1	16,3	2,8	78,8	1,5	0,6	3,5	12	3,4	28,5
cis 3 hexenil acetato	5,2 ^a	3,6	8,6	94,2 ^a	22,7	255,1	71,0 ^b	63,3	82,6	188,2 ^b	85,8	371,3
Acetato de Hexilo	1,0 ^a	0,7	1,2	23,1 ^a	7,2	85,4	8,8 ^b	5,8	12,5	42,6 ^b	18,2	89,5
o-Cymol	0,01	ND	0,02	0,20	ND	0,78	ND	0,03	0,06	0,30	0,05	0,65
Nonanal	0,2	ND	0,4	2,1	ND	9,7	2,5	1,2	3,8	6,8	1,6	15,7
2-Ethylphenol, methyl ether	0,1	ND	0,2	0,2	ND	0,9	0,5	0,5	0,6	0,5	0,1	1,6

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 11.

Compuestos volátiles en aceites de oliva extra virgen para la campaña 2011-2012 y 2012-2013 para las variedades arbequina, arbosana y frantoio de origen chileno, expresado como μg de estándar interno (4 metil 2 pentanol) por kg de aceite (media, valor mínimo y valor máximo).

Compuestos volátiles	Arbequina						Arbosana						Frantoio					
	2012 (n= 14)			2013 (n=15)			2012(n=7)			2013 (n=4)			2012(n=3)			2013 (n=9)		
	media	mín.	máx.	media	mín.	máx.	media	mín.	máx.	media	mín.	máx.	media	mín.	máx.	media	mín.	máx.
Etanol	13,7	1,8	32,7	24,8	4,4	53,2	15,6	3,6	57,5	10,6	7,6	12,7	4,3	2,5	6,7	3,2	0,4	10,2
Acetato de metilo	5,4	3,4	8,4	3,1	1,7	4,2	5,6	1,3	10,3	2,9	2,3	3,7	1,8	1,1	2,6	0,3	0,2	0,8
Metil 2 butadieno 1,3	2,6	1,2	5,1	3,3	1,0	5,4	5,9	4,1	8,1	5,7	3,8	8,6	8,8	2,3	21,8	4,0	0,2	13,1
Butanol 1	23	7	61	28	11	63	25	12	78	63	46	91	80	60	95	140	68	293
Acetato de etilo	26,7	4,3	88,6	27,0	9,2	65,3	60,7	12,4	278,7	13,7	5,6	23,4	5,2	2,8	8,5	3,0	0,7	10,5
Diclorometano	22,3	2,0	67,1	6,5	0,8	34,4	287,9	112,6	533,6	52,1	19,9	120,4	6,8	4,8	9,2	1,3	0,4	4,2
Benzaldehido	2,46	0,76	7,57	0,50	0,15	1,29	2,40	0,28	9,02	0,10	0,02	0,20	2,30	0,26	6,25	0,10	0,02	0,31
Metil 2 Butanol	2,28	0,18	8,90	3,40	0,45	16,18	2,80	1,07	6,23	0,20	0,04	0,57	1,40	0,39	2,85	0,20	0,02	0,81
penten 1 one 3	46	25	69	55	28	90	45	25	58	21	16	30	42	31	50	39	18	57
Metil 3 butanol	7,9	0,5	20,2	5,0	1,6	10,8	2,1	0,6	5,5	0,9	0,2	2,9	1,3	0,0	3,8	1,0	0,2	5,8
Pentanol	142	106	229	112	95	143	130	94	213	111	103	119	117	110	127	110	99	121
Hexanal	25,7 ^a	12,3	43,8	21,3 ^a	14,3	32,4	23,8 ^a	10,9	34,6	18,0 ^a	13,0	24,2	27,3 ^a	16,2	39,9	25,8 ^a	14,5	46,4
Trans 2 hexenal	390 ^a	101	799	424 ^a	167	706	452 ^a	265	752	344 ^a	212	479	1122 ^a	609	1568	698 ^a	322	1060
Cis 3 hexenal	146 ^a	14	351	34 ^b	9	59	208 ^a	55	539	166 ^a	118	188	33 ^a	17	61	23 ^a	7	39
Cis 3 hexenol	85,4 ^a	36,9	236,7	63,1 ^a	26,0	130,0	140,9 ^a	20,7	243,1	155,4 ^a	69,8	228,0	110,0 ^a	55,7	164,6	107,0 ^a	38,8	174,8
Trans 2 hexenol	105,0 ^a	47,8	192,5	102,9 ^a	43,4	202,3	201,1 ^a	28,2	396,3	209,1 ^a	122,9	350,0	188,8 ^a	133,0	262,1	173,1 ^a	63,7	278,1
Hexanol	150 ^a	52	359	74 ^b	30	155	170 ^a	66	311	120 ^a	96	177	38 ^a	33	48	34 ^a	17	62
Dihidromirceno	8,9	3,2	16,5	6,3	1,9	10,1	9,8	6,1	16,0	8,1	6,4	10,4	5,5	4,9	6,2	9,3	4,0	13,7
Ciclopropane, 1,1-dimethyl-2-(.)	45,6	16,7	84,8	30,1	10,6	42,3	48,6	23,7	85,0	41,5	25,5	53,7	37,1	25,3	46,8	37,7	18,6	66,9
3 etil1,5-octadieno	23,9	2,8	78,8	9,3	3,1	13,6	26,7	10,6	53,6	13,0	7,7	15,6	6,6	1,4	10,0	3,6	0,5	14,8
Cis 3 acetato de hexenilo	145,6 ^a	47,1	255,1	46,1 ^b	22,7	98,4	32,2 ^a	20,2	52,1	32,0 ^a	21,7	46,1	5,0 ^a	4,5	5,3	2,1 ^b	0,2	5,2
Acetato de hexilo	26,7 ^a	7,2	85,4	19,7 ^a	11,0	28,7	31,5 ^a	4,8	77,8	7,7 ^a	4,1	17,4	5,6 ^a	4,7	7,1	1,2 ^b	0,2	4,3
o-Cimol	0,30	ND	0,58	0,20	ND	0,78	0,30	0,12	0,52	ND	0,01	0,11	0,40	0,23	0,62	ND	ND	0,03
Nonanal	1,4	ND	5,1	2,7	ND	9,7	2,8	0,0	9,0	1,2	0,2	3,9	4,1	1,7	5,8	0,2	ND	0,5
2-Etilfenol, metil eter	0,2	ND	0,9	0,2	ND	0,4	1,1	0,5	1,5	0,2	0,1	0,6	0,8	0,4	1,4	0,1	ND	0,1

*Letras distintas significa diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%.

La tabla 11, muestra los compuestos volátiles identificados para la campaña 2011-2012 y 2012-2013 para las variedades arbequina, arbosana y frantoio de origen chileno, se presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para hexanal, trans 2 hexenal, cis 3 hexenal, cis 3 hexenol, trans 2 hexenol, hexanol, cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo. La variedad arbequina presenta concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) de cis 2 hexenal, hexanol y cis 3 acetato de hexenilo para la campaña 2011-2012, los otros volátiles no presentan diferencias estadísticas significativas. En el caso de la variedad frantoio sólo se presentan diferencias significativamente ($p < 0,05$) para cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo, por último, la variedad arbosana no presenta diferencias estadísticas significativas entre ambas campañas de muestreo.

En el total de las muestras analizadas no se determinaron la posible aparición de compuestos volátiles que son característicos de olores extraños o anómalos. Estos defectos sensoriales normalmente no están presentes en el aceite virgen o corriente, indicando que los aceites son de calidad extravirgen.

6.3. ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS).

Para tener una visión general de los posibles agrupamientos de las muestras se realizó un PCA global empleando todas las muestras analizadas y los contenidos de ácidos grasos y compuestos volátiles de cada una de éstas. El conjunto de análisis incluyó los promedios de triplicado de las 73 muestras analizadas. En la figura 14 se presentan la gráfica de agrupamiento de las cuatro variedades de aceitunas con el objetivo de detectar e interpretar las pautas presentadas por las muestras, ya sean agrupaciones, similitudes, diferencias y/o muestras anómalas.

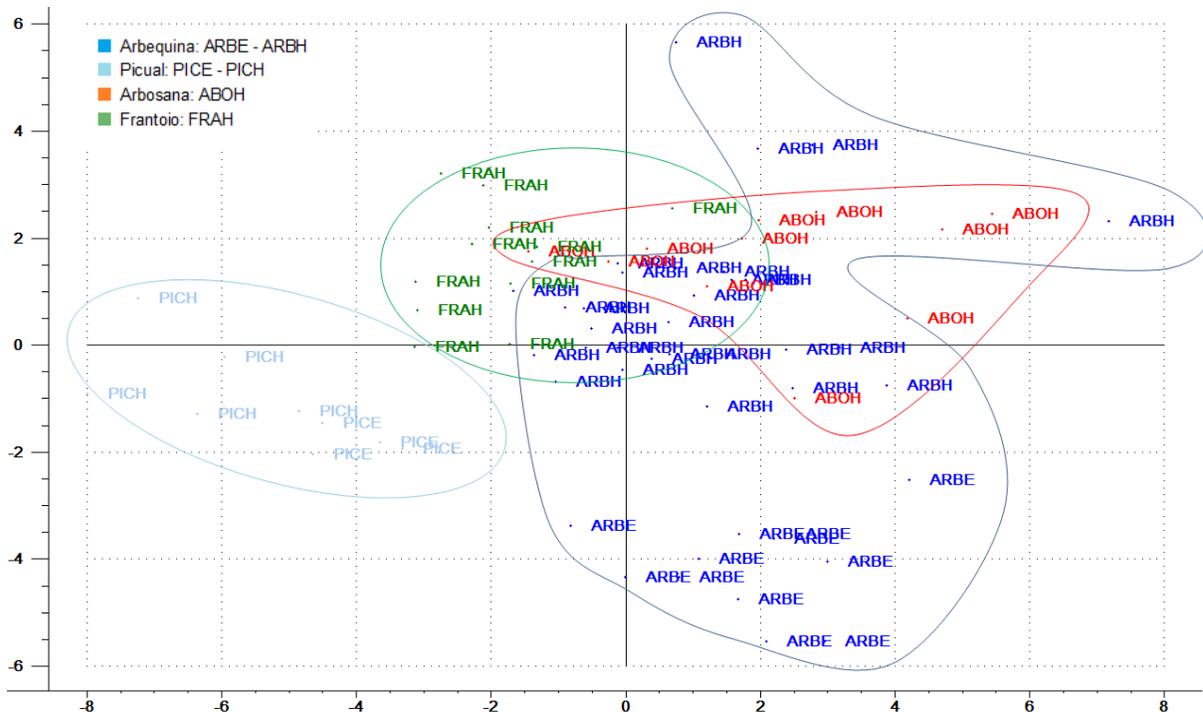


Figura 14. Gráfico 2D de muestras o puntuaciones (scores) del PCA para las cuatro variedades.

El gráfico de scores revela agrupamientos por variedad de aceitunas de las muestras analizadas. Las dos primeras componentes explicaron casi un 54% de la variabilidad de los datos (23% para PC1 y 15% para PC2). En el cuadrante superior izquierdo es posible diferenciar las muestras de la variedad frantoio, en cambio en el cuadrante inferior izquierdo es posible observar las muestras de variedad picual nacionales y españolas (PICH-PICE), en el cuadrante superior derecho se observa la presencia de la variedad arbosana (ABOH), por último, la variedad arboquina muestra una sub-agrupación de muestras españolas en el cuadrante inferior derecho (ARBE) y chilenas en el cuadrante superior derecho.

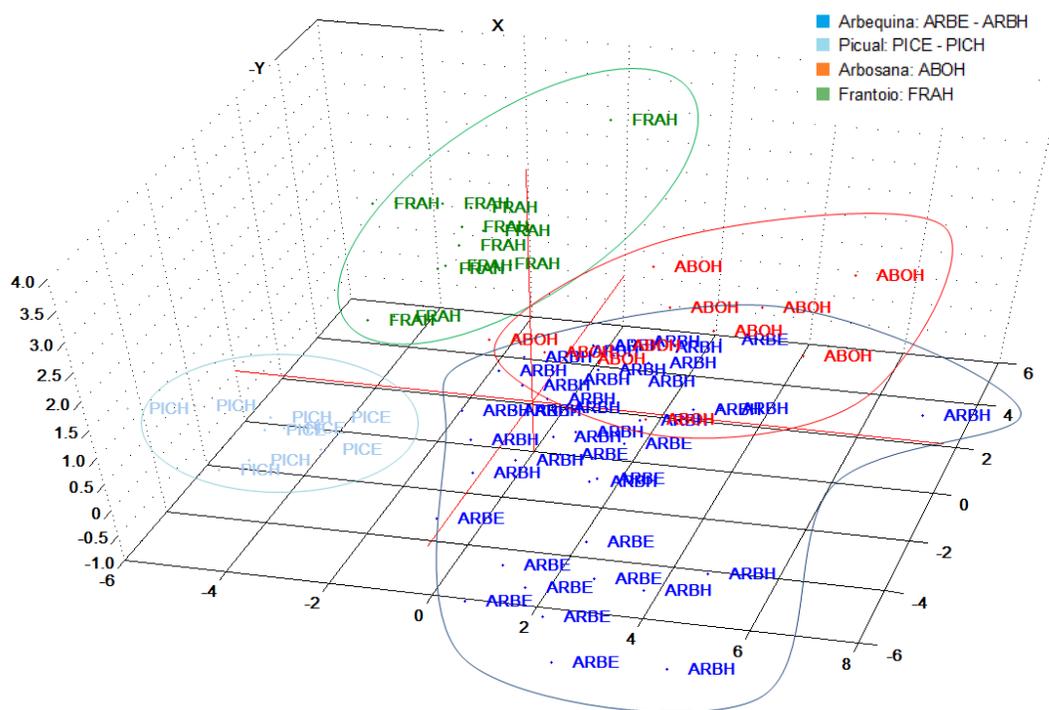


Figura 15. Gráfico 3D de muestras o puntuaciones (scores) del PCA para las cuatro variedades.

La figura 15 muestra un gráfico 3D de los scores para los tres primeros componentes obtenidos del PCA. Sin embargo, la validación cruzada indica que el número de componentes necesarios para explicar adecuadamente los datos son 7, éstos dan cuenta de la información más relevante que entregan el análisis de los ácidos grasos y los compuestos volátiles, en el gráfico es posible visualizar una clara distribución de las cuatro variedades de aceitunas, aunque existe una ligera superposición entre las variedades arbequina y arbosana.

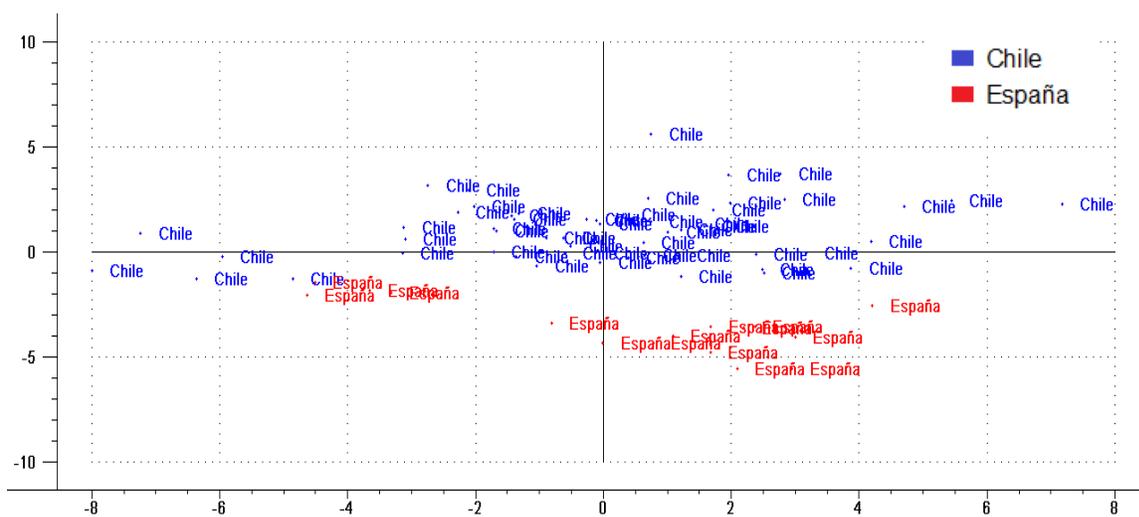


Figura 17. Gráfico 2D de muestras o puntuaciones (scores) del PCA para país de origen del aceite .

El gráfico de las muestras (figura 17) identificadas por origen revela que existe un claro agrupamiento definido por el eje de la PC2. Además, se observan dos sub-grupos de muestras españolas. Un primer sub-grupo se concentra en el extremo inferior derecho correspondiente a la variedad arbequina y un segundo sub-grupo para la variedad picual, ubicado en el cuadrante inferior izquierdo, cercanas a muestras nacionales.

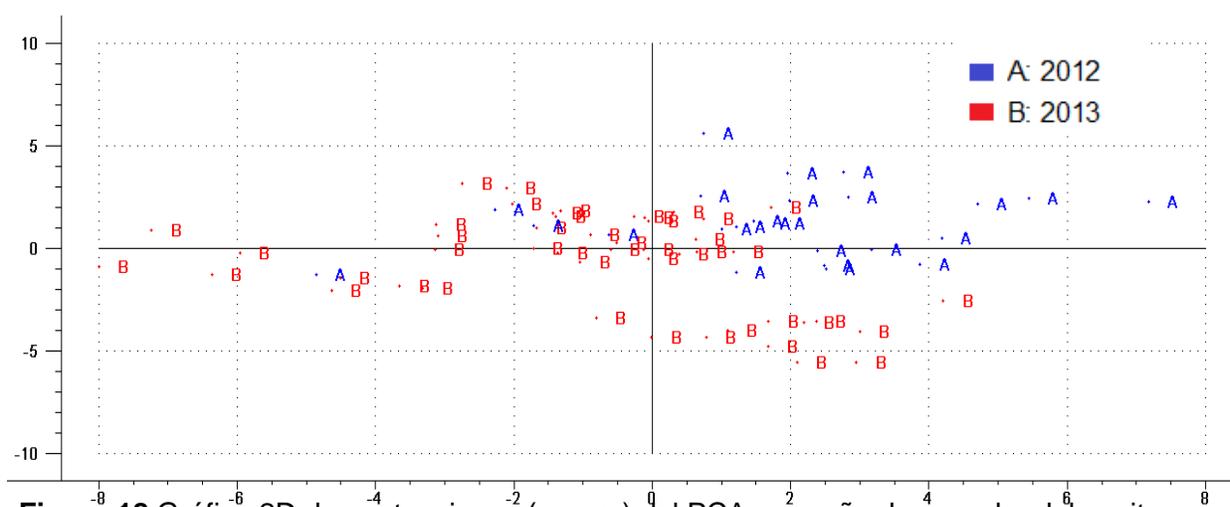


Figura 18. Gráfico 2D de puntuaciones (scores) del PCA para año de cosecha del aceite.

Respecto al año de cosecha del aceite, en la figura 18 no se observan claras agrupaciones o distribuciones para las muestras de aceites de los años 2012 y 2013, aunque existe una ligera tendencia definida por el eje de la PC1. Sin embargo, hay varias muestras que se superponen hacia el centro de la distribución. Esto puede deberse a que hay poca variación en la composición de las muestras entre los años de cosecha, tal como quedó en evidencia en los ANOVA correspondientes, con lo cual su clara diferenciación no es posible.

De acuerdo, a los resultados obtenidos en el PCA hay claras evidencias que el perfil de ácidos grasos y compuestos volátiles obtenidos en las muestras contienen información relevante para su diferenciación en cuanto a variedad de la aceituna y país de origen. Sin embargo, para el año de cosecha no se observan claras evidencias.

6.4. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL (LDA, LINEAL DISCRIMINANT ANALYSIS).

El análisis discriminante lineal fue empleado para construir modelos de clasificación de las muestras de acuerdo a los tres criterios ya revisados en base a los contenidos de compuestos volátiles y ácidos grasos. El resultado obtenido para variedad de aceituna se presenta en la figura 19, mientras que en las tablas 12 y 13 se presentan los porcentajes de muestras correctamente clasificadas para el país de origen y año de campaña .

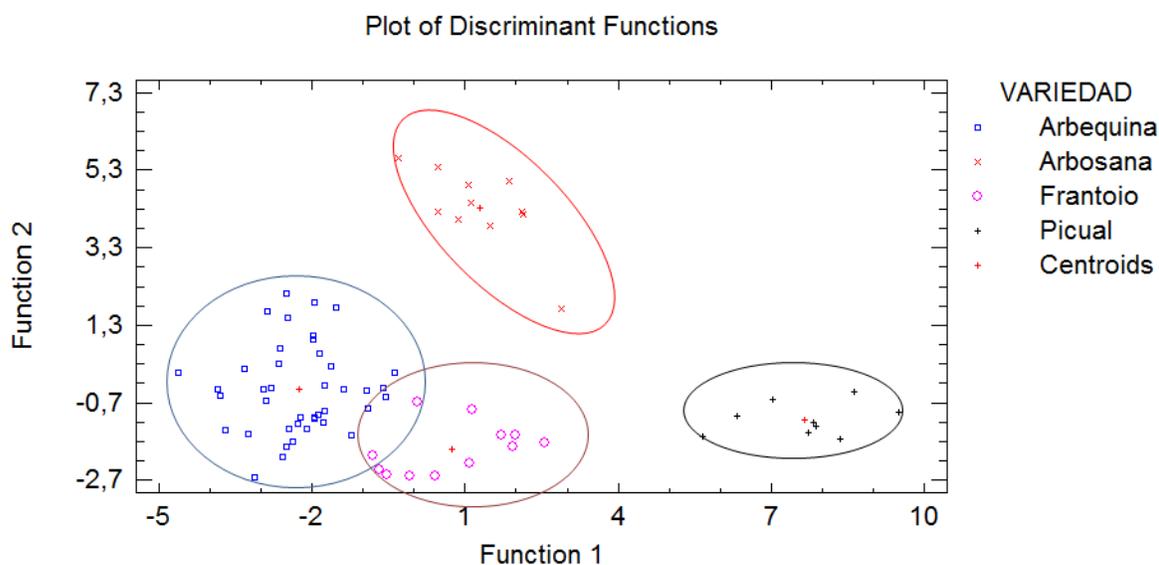


Figura 19. Gráfico de Análisis discriminante lineal para variedad de la aceituna.

En la clasificación simultánea se utilizó 73 muestras para la discriminación de cuatro variedades (figura 19). Los resultados del modelo LDA para variedad mostró que los compuestos volátiles y ácidos grasos analizados permitieron la clasificación correcta del 100% para todas las variedades de aceituna. La selección (“backward selection”) de los compuestos relevantes para realizar la discriminación, determinó a 9 de ellos como estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a un nivel de confianza del 95%. Estos fueron: 4 ácidos grasos (ácido heptadenoico, ácido linoleico, ácido linolenico y ácido eicosenoico), y 5 compuestos volátiles (trans 2 hexenol, trans 2 hexenal, metil 3 butanol, penten 1 one, y etil 5 octadieno). Estos compuestos permiten la correcta clasificación del 100% de todas las muestras, reconociendo si las muestras son de variedad arbequina, arbosana, frantoio ó picual.

Se destaca entonces que para la correcta clasificación existen dos compuestos volátiles (trans 2 hexenol, trans 2 hexenal) correspondientes a las percepciones sensoriales de olor verde, siendo el trans 2 hexenal unos de los compuestos volátiles mayoritarios del aceite (7,3a 821,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aceite). Por lo tanto, las variedades estudiadas se caracterizarán por ser aceites de olivas con aroma verde frescos. Además, para la correcta clasificación se consideran los dos ácidos grasos responsables de la biogénesis del aroma como son ácido linoleico y ácido linolenico, los que dan lugar aaldehydosyalcoholesdeseisátomosdecarbono (C6)yésteres.

La clasificación de las muestras por país de origen del aceite (tabla 12) fue de un 98,6%, las muestras nacionales fueron clasificadas correctamente en un 100%, en cambio las muestras españolas fueron clasificadas en un 94% certeramente, sólo una muestra del total de 17 muestras fue clasificada erróneamente, las nueve variables seleccionadas que permitieron realizar la discriminación de las muestras fueron: 3 ácidos grasos (ácido palmítico, ácido heptadecanoico y ácido esteárico) y 6 compuestos volátiles (etanol, diclorometano, cis 3 acetato de hexenilo, cis 3 hexenal, benzaldehido y metil 2 butanol) los cuales fueron determinados como predictores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 12. Clasificación de muestras por el país de origen con el modelo LDA.

País	Número de muestras	Correctamente clasificadas	
		Chile	España
Chile	56	56 (100%)	0
España	17	1 (5,88)	16 (94,12%)

* Porcentaje total (promedio) de clasificación correcto: 98,63%

Los compuestos volátiles que permitieron la clasificación por país de origen: cis 3 acetato de hexenilo, cis 3 hexenal, se asocian a las percepciones sensoriales descritas para aceites verdes y afrutados.

El LDA con dos niveles de selección para año de producción de aceite de oliva muestran que para el año 2012 el 83% de las muestras fueron clasificadas correctamente, y para el año 2013 el 94% de las muestras de tal año fueron correctamente clasificadas. Por lo tanto, el modelo tiene un 90% de muestras correctamente clasificadas.

Tabla 13. Clasificación de muestras por año de campaña con el modelo LDA.

AÑO	Número de Muestras	Correctamente clasificadas	
		Año 2012	Año 2013
2012	24	20 (83,3%)	4 (16,7%)
2013	49	3 (6,1%)	46 (93,9%)

* Porcentaje total (promedio) de clasificación correcto: 90,4%

El uso de algoritmo de selección determinó que 5 variables son predictores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a un nivel de confianza del 95%. Las cinco variables discriminantes fueron: 2 ácidos grasos (ácido oleico y ácido linolénico) y 3 compuestos volátiles (benzaldehído, acetato de metilo y metil 3 butanol). El método LDA tuvo un valor más bajo de acierto en la clasificación para año de producción de aceite de oliva que para la variedad de aceituna y país de origen. Sin embargo, aun se considera un buen modelo de clasificación para definir año de producción de aceites de oliva, esto indica que las 5 variables que describen el modelo permiten la correcta clasificación.

Para validar el modelo de clasificación se utilizó el reconocimiento de patrones supervisados, cuyo objetivo fue predecir la variedad a la que pertenecen nuevas muestras a partir de la medida de las variables predictoras, para ello se estableció un número de muestras de variedad conocida como conjunto para la construcción del modelo de entrenamiento, para luego incluir un set de muestras que forman parte del conjunto de muestras originales, pero que son excluidas del set para su autopredicción.

La tabla 14 detalla las muestras clasificadas correctamente, en el cual el "training set" incluye el 50% y 75% de las muestras para establecer el modelo de clasificación, y el 50% y 25% de las muestras restantes son excluidas para predecir la variedad de aceituna al que pertenece el aceite de oliva, el 50% y 75% de las muestras seleccionadas para el modelo se realizó en 4 diferentes ordenes de elección.

Tabla 14. Clasificación de muestras del modelo de predicción.

VARIEDAD	N° total de muestras	50%	50% DE MUESTRAS PREDICHAS				75%	25% DE MUESTRAS PREDICHAS			
		A	B1	B2	B3	B4	A	B1	B2	B3	B4
Arbequina	41	20	18 (86%)	21 (100%)	13 (62%)	11 (52%)	31	7 (70%)	10 (100%)	8 (80%)	8 (80%)
Arbosana	11	6	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	8	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)
Frantoio	12	6	5 (83%)	6 (100%)	4 (67%)	3 (50%)	9	3 (100%)	2 (67%)	3 (100%)	3 (100%)
Picual	9	5	4 (100%)	4 (80%)	2 (50%)	4 (100%)	7	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)

* Porcentaje de clasificación correcto: 88%; A: Training Set; B: Predicción

El modelo matemático construido, refleja que el uso de algoritmos seleccionados es apropiado para realizar la predicción de nuevas muestras, reconociendo si las muestras son de variedad arbequina, arbosana, frantoio ó picual. Los resultados muestran que el 88% de muestras externas al "training set" son clasificadas correctamente,

6.5. MODELADO BLANDO INDEPENDIENTE DE ANALOGÍAS DE CLASES (SIMCA, SOFT INDEPENDENT MODELING OF CLASS ANALOGY).

Luego de realizar el estudio previo de las muestras mediante un PCA, se empleó el modelado SIMCA de cada una de las cuatro variedades: frantoio, picual, arbequina y arbosana, establecidos para un nivel de confianza del 95%, y las muestras dentro de los límites fueron clasificadas como miembros de cada variedad.

Para la construcción del primer modelo SIMCA se consideraron tres clases: F (frantoio), PE (picual), y Ar (arbosana). El número de componentes principales necesarias para definir adecuadamente cada clase fueron de 8, 2 y 5, respectivamente. Todas las variables incluidas en la construcción del modelo SIMCA exhibieron una buena capacidad de modelado y de discriminación.

En la Figura 20 se presenta un gráfico de Cooman, que muestra la distancia de las muestras de variedad frantoio y picual con respecto a la variedad arbosana, a partir de esta gráfica llegamos a la conclusión de que las muestras de las tres variedades tienen

una buena probabilidad de ser asignadas a la clase correcta, dentro de un nivel de significación del 5%, como también fue observado en el modelo LDA.

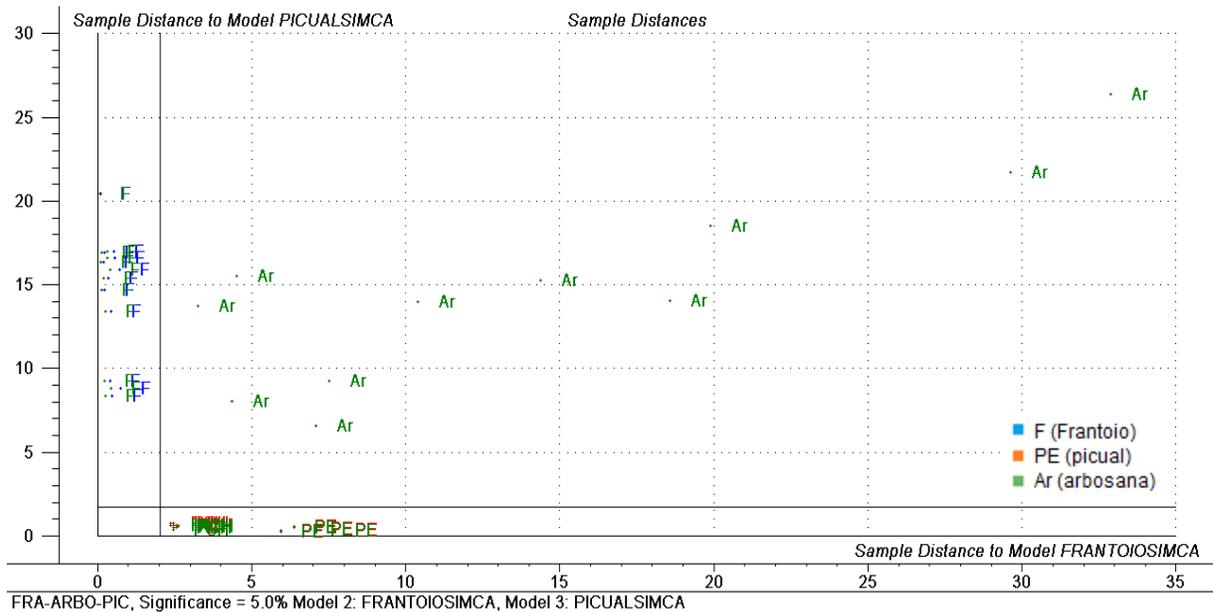


Figura 20. Modelo SIMCA, diagrama de Coomans: distancias de las muestras de frantoio, picual y arbosana (con líneas continuas se destacan los límites de las clases para un nivel de significación del 5 %).

En el diagrama de Coomans (figura 21) se presentan las distancias de todas las muestras de las variedades PE (picual), F (frantoio) y AE-ACH (arbequina). El número de componentes principales necesarias para definir adecuadamente cada clase fueron de 2, 8 y 12, respectivamente, todas las muestras del conjunto se ubican en los cuadrantes correctos: las muestras de la clase PE caen en el cuadrante I, las muestras de la clase F en el cuadrante II y las muestras de la clase AE-ACH se ubican en el cuadrante III. En la gráfica se destaca también que las muestras de la clase AE-ACH tienen una tendencia a la dispersión, observada inicialmente en el análisis PCA.



Figura 21. Modelo SIMCA, diagrama de Coomans: distancias de las muestras de frantoio, picual y arbequina (con líneas continuas se destacan los límites de las clases para un nivel de significación del 5 %).

Los resultados muestran que la clasificación final del conjunto de muestras estuvieron dentro de los límites de clasificación para las variedades picual y frantoio, sin embargo, al realizar un modelo SIMCA con las variedades arbequina y arbosana, éstas no fueron lo suficientemente diferentes como para ser discriminadas por el modelo SIMCA, como era de esperar y de acuerdo al modelo PCA, SIMCA no se pudo detectar diferencias significativas considerables para las variedades mencionadas previamente.

6.6. ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA, PARTIAL LEAST SQUARES - DISCRIMINANT ANALYSIS).

Se construyó un modelo de clasificación supervisada mediante el método de PLS-DA, con todas las variables como información (AG y COV) y las variedades incluidas en el vector Y, enumeradas de 1 a 4.

En la Figura 22 se presenta un gráfico de regresión entre los valores asignados a cada variedad (1 a 4) y los valores predichos por el modelo PLS-DA de acuerdo a validación cruzada. La línea de regresión obtenida en la predicción de las muestras para el gráfico A, indica un valor de pendiente de 0,662 y $r^2 = 0,632$, por lo que es posible concluir que el modelo no presenta un buen ajuste para clasificar nuevas muestras para predecir variedad de aceituna, esto se debe a que la variedad arbequina presenta una

gran dispersión en las variables utilizadas para este estudio, sin embargo, en el gráfico B se observa un valor de pendiente de 0,852 y $r^2 = 0,884$, considerando como modelo de predicción 3 variedades de aceitunas (arbosana, picual y frantoio), por lo tanto, el modelo con 5 componentes principales explica el 65 % de la varianza en las variables y el 16 % en las variedades, indicando que el modelo creado presenta un buen ajuste de predicción.

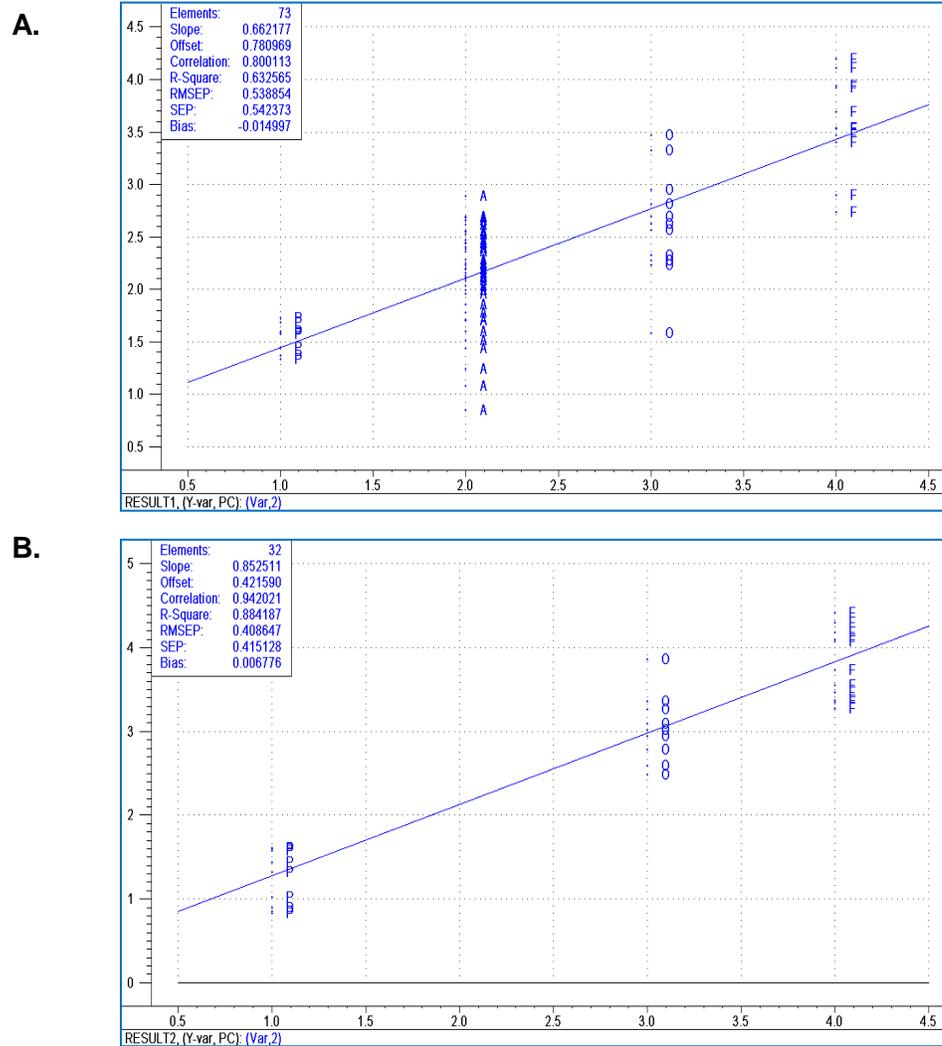


Figura 22.A. Gráfico de regresión para las 4 variedades (arboquina, arbosana, frantoio y picual) B. Gráfico de regresión entre los valores asignados para 3 variedades (arbosana, frantoio y picual).

Por otra parte, la gráfica de las puntuaciones del PLS-DA mostró que, incluso considerando sólo los dos primeros componentes, se obtiene una muy buena clasificación de las muestras por variedad. En el cuadrante superior izquierdo es posible diferenciar las muestras de la variedad arbosana (ABO), en cambio en el cuadrante inferior izquierdo es posible observar las muestras de variedad arbequina (ARB), en el cuadrante superior derecho se observa la presencia de la variedad frantoio (FRA), por último, la variedad picual (PIC) es posible observar en el cuadrante inferior derecho.

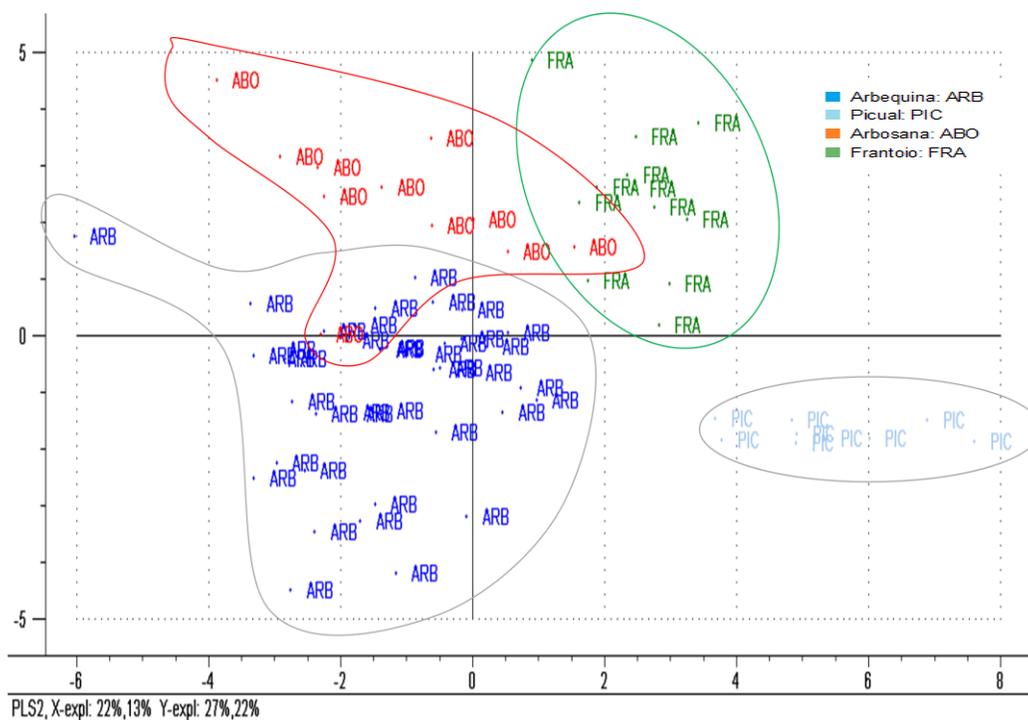


Figura 23. Gráfico 2D de puntuaciones (scores) del PLS-DA para las cuatro variedades.

La figura 24 muestra un gráfico 3D de los scores para los tres primeros componentes obtenidos del PLS-DA, luego de validación cruzada. En ella es posible visualizar una clara distribución de las cuatro variedades de aceitunas, aunque existe una ligera superposición entre las variedades arbequina y arbosana.

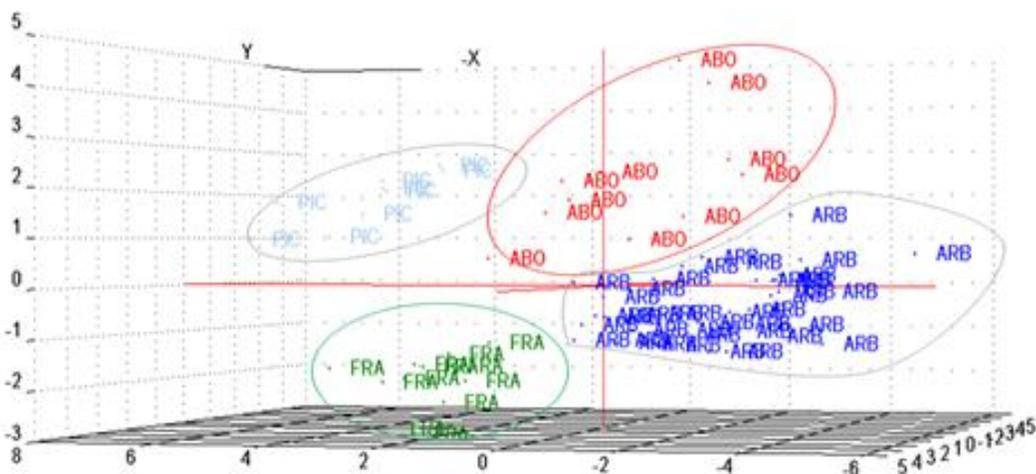


Figura 24. Gráfico 3D de puntuaciones (scores) del PLS-DA para las cuatro variedades.

La figura 25 proporciona información sobre los compuestos volátiles y ácidos grasos y su relación con las variedades. En el cuadrante superior derecho se observan los ácidos oleico (18:1) y linolénico (18:3) los cuales parecieran ser característicos de las muestras de la variedad frantoio, en el cuadrante inferior izquierdo se observa el ácido esteárico (18:0) el cual pudiera en gran medida ser responsable de la agrupación de las muestras de la variedad picual, los compuestos volátiles se encuentran ubicados en los cuadrantes del sector izquierdo los que pueden ser responsables de la agrupación de las variedades arbequina y arbosana.

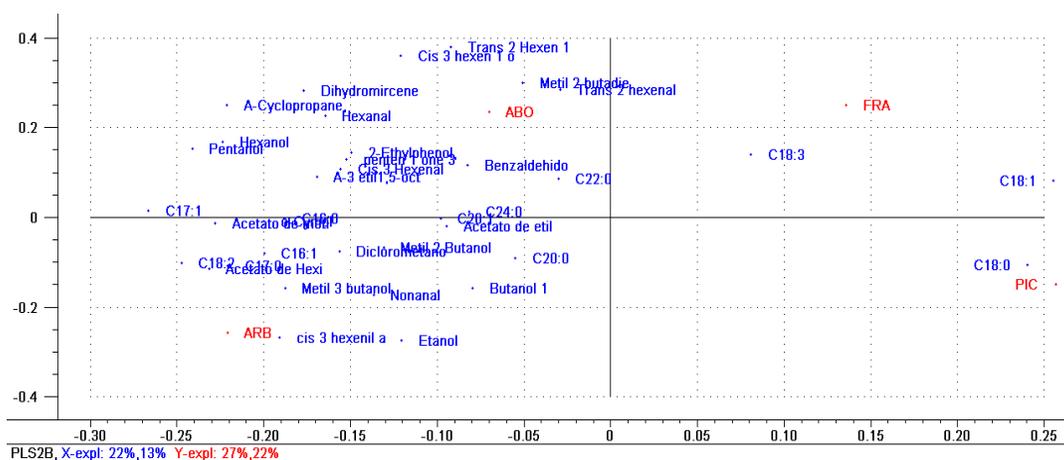


Figura 25. Gráfico 2D de los coeficientes o variables (loadings) del PLS-DA para las cuatro variedades.

La variedad arbequina está en el cuadrante inferior izquierdo cerca de los compuestos cis 3 acetato de hexenilo y acetato de hexilo lo que indica un cuadrante con aceite de oliva con atributos afrutados verdes. Por su parte, en el cuadrante superior izquierdo se ubica la variedad arbosana cerca de los compuestos trans 2 hexenal, hexanal y cis 3 hexenol con aceites con características de notas verdes, almendrado y platano.

7. CONCLUSIÓN

La metodología analítica implementada para la determinación de ácidos grasos (transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico e inyección por GC-FID) y la determinación de compuestos volátiles (GC-MS-HS-SPME) resultaron ser adecuadas para cumplir con los objetivos del presente trabajo.

El 100% de los aceites de oliva analizados españoles y nacionales son de calidad oliva virgen extra, cumpliendo con la normativa del Reglamento (CE) nº 2568 /91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva.

El test de análisis de varianzas (ANOVA), permitió determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los principales ácidos grasos característicos de los aceites de oliva y en los principales compuestos volátiles identificados, considerando los factores de variación: variedad de aceituna (arbequina, picual, arbosana y frantoio), país de origen del aceite (Chile v/s España) y año de cosecha para la variedad arbequina y arbosana (campaña 2012 v/s 2013).

Las relaciones oleico/linoleico y monoinsaturados/poliinsaturados (Monoinsat./Polinsat.) proporcionan información respecto a la calidad y estabilidad de los aceites de oliva, presentando una importante estabilidad reconocida la variedad picual, la cual sobresale con los valores más altos en cualquiera de estas relaciones respecto a las variedades arbequina, arbosana y frantoio.

El Análisis de Componentes principales (PCA) permitió tener una visión general de los agrupamientos de las muestras, de acuerdo a su variedad, país de origen y/o año de cosecha. Los modelos construidos explican el 54% de la variabilidad de los datos, mostrando cuatro grupos perfectamente separados en el caso de variedad, y dos grupos para el factor país de origen. Sin embargo, para el año de cosecha no se observan claras evidencias de agrupamiento, esto puede deberse a que existe poca variación en la composición de las muestras para los años de cosecha estudiados (2012/2013).

El método LDA para variedad mostró que los compuestos volátiles y ácidos grasos analizados permitieron la clasificación correcta del 100% para todas las variedades de aceituna, con un total de 9 compuestos relevantes para realizar la correcta discriminación. La clasificación de las muestras por país de origen del aceite fue de un 99% con 9 variables predictoras seleccionadas, las muestras nacionales fueron clasificadas correctamente en un 100%, en cambio las muestras españolas fueron

clasificadas en un 94% certeramente, para los años de cosecha el modelo tiene un 90% de muestras correctamente clasificadas con 5 variables discriminantes. Considerándose un buen modelo para los tres factores de variación de estudio.

La validación del modelo para predecir la variedad de aceituna del aceite de oliva utilizado indico que el 88% de las muestras excluidas en el set de calibrado fueron clasificadas correctamente .

El método SIMCA, es útil para el objetivo del estudio, pues todas las variables incluidas en la construcción del modelo SIMCA exhibieron una buena capacidad de modelado y de discriminación. Sin embargo, las variedades arbequina y arbosana, no fueron lo suficientemente diferentes como para ser discriminadas por el modelo SIMCA, como era de esperar y de acuerdo al modelo PCA, SIMCA no se pudo detectar diferencias significativas considerables para las variedades mencionadas previamente.

El modelo PLS-DA de clasificación supervisada construido explica una gran cantidad de la varianza de X e Y (65%, 16%; respectivamente); la regresión obtenida en la predicción de las muestras indica un valor de pendiente de 0,852 y $r^2 = 0,884$ para 3 variedades (arbosana, picual y frantoio), por lo que es posible concluir que el modelo presenta un buen ajuste para clasificar nuevas muestras para predecir las variedades de aceitunas mencionadas.

Las herramientas analíticas y quimiométricas utilizadas en el presente trabajo fueron capaces de detectar relaciones existentes en los datos obtenidos del total de muestras analizadas, permitiendo agrupar la información de acuerdo a los objetivos planteados, logrando diferenciar conglomerados de muestras por variedad, año de cosecha y país de origen.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Angerosa, F., Basti, C., Vito, R. and Lanza B [1999]. Effect of fruit stone removal on the production of virgin olive oil volatile compounds. *Food Chem.*, 67, 295-299.
- [2] Olías, J.M., Pérez, A.G., Rios, J.J. and Sanz, C. [1993]. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the green odor notes. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2368-2373.
- [3] Salas, J.J. and Sánchez, J. [1998a]. Lipoxygenase activity from the pulp tissues of olive (*Olea europaea*) in *Advances in Plant Lipid*, p. 297-299.
- [4] Salas, J.J. and Sánchez, J. [1998b]. Hydroperoxidelyase from olive (*Olea europaea*) fruits in *Advances in Plant Lipid*, p. 300-302.
- [5] Salas, J.J. and Sánchez, J. [1998c]. Alcohol dehydrogenase from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry*, 48, 35-40
- [6] Informe anual de producción de aceite de oliva 2010. International Olive Council, November 2014
- [7] Uceda, M, Aguilera, M.P, Beltrán, G., Jiménez, A. [2000]. Aceites de oliva vírgenes extra. Calidad y Diversidad. PROEDI, Promociones Editoriales S. L. Zaragoza.
- [8] Informe anual del Mercado Nacional de Aceite de Oliva [2012]. Chileoliva.
- [9] Sanz Cañada, Javier, Villar Hernández, J. [2009]. THE PROTECTED DESIGNATIONS OF ORIGIN OF OLIVE OIL IN SPAIN: LOCAL AGRIFOOD SYSTEMS, GOVERNANCE AND TERRITORIAL EXTERNALITIES. Some contributions on Oliviculture and Elaiotechnic from the perspective of experience ISBN: 978-84-613-2082-0 - GEA Westfalia Separator, 241pp.
- [10] www.infoagro.com/olivo/denominaciones_origen_aceite_oliva_actualizacion-htm
- [11] P. Luaces, A.G. Pérez y C. Sanz [2004]. Efecto del deshuesado de la aceituna sobre el aroma del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 55, Fasc. 2, 174-179
- [12] Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Di Loreto G, Jannucci E, Lucera L, Russi F [2002]. Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed,

and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, 50:3775–3779.

[13] Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C. and Vito, R. [2000]. Virgin olive oil odour notes: their relationships with the volatile compound from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.*, 68, 283-287.

[14] Conde Carlos, Serge Delrot, Hernani Gerosa [2008]. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology* 165, 1545-1562.

[15] Morales, M.T., Angerosa, F. and Aparicio, R. [1999]. Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: Chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites*, 50, 114-121.

[16] Jesús Lozano Sánchez, Antonio Segura Carretero, Alberto Fernández Gutiérrez, [2000]. Libro "Composición del Aceite de Oliva". Capítulo 7 pág. 197 a 224.

[17] Estudio del contenido de ácidos grasos de aceites monovarietales elaborados a partir de aceitunas producidas en la región extremeña [2003]. *Grasas y Aceites* Vol. 54 371-377.

[18] Hidalgo, F.; Navas, M.A.; Guinda, A.; Ruiz, A.; Leon, M.; Lanzon, A.; Maestro, R.; Janer del Valle; M.L.; Perez, M.C., Cert, A.; Alba, J.; Gutierrez, F.; Dobagarnes, C.; Graciani, E. [1993]. La Calidad del Aceite de Oliva Virgen: Posibles Nuevos Criterios para su Evaluación. *Grasas y Aceites*, 44, 10-17.

[19] Alessandri, S; Cimato, A; Modi, G.; Creucenzi, A.; Caselli, S.; Tracchi, S. [1999]. Multivariate models to classify Tuscan virgin olive oils by zone. *Grasas y Aceites*, 50, 369-378.

[20] Poiana, M.; Giuffrè, A.M.; Giuffrè, F.; Modafferi, V.; Neri, A.; Mincione, B.; Taccone, P.L. [1997]. Ricerche sugli oli di oliva monovarietali. Nota IV. Contributo alla caratterizzazione dell'olio estrato da olive della cv. Nocellara messinese. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74, 59-71.

- [21] Motilva María José, Ramo Tomás, Romero María Paz. [2001]. Caracterización geográfica de los aceites de oliva vírgenes de la denominación de origen protegida "Les Garrigues" por su perfil de ácidos grasos. *Grasas y Aceites*. 52 (1): 26-32.
- [22] Fisher, C., Scott, T.R. [1997]. *Flavores de los alimentos. Biología y química*.
- [23] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. [2004]. *Food Chemistry*. 3rd revised edition. Berlin: Springer.
- [24] McGorrin, R.J. [2002]. Character impact compounds: flavors and off-flavors in foods. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; p. 375-413.
- [25] <http://www.tdcolive.net/documents/booklet/tecnicaaalisisinstrumental.pdf>.
- [26] Angerosa F, Servili M, Selvaggine R., Tatichi A, esposto S, Montedoro G, [2004]. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatography A*, 1054, 17-31
- [27] Motilva M.J., Romero M.P. [2010]. The Effect of the Ripening Process of the Olive Fruit on the Chlorophyll and Carotenoid Fractions of Drupes and Virgin Oils. IN: Victor Preedy, Ronald Watson, editors. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Pages 59-68.
- [28] Aurora Gómez-Rico, Giuseppe Fregapane, María Desamparados Salvador [2008]. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils *Food Research International*, Volume 41, Issue 4, Pages 433-440.
- [29] P. Kandyli, A.S. Vekiari, M. Kanellaki, N. Grati Kamoun, M. Msallem, Y. Kourkoutas [2011]. Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting Original Research Article. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 5, 1333-1341.
- [30] Flath, R.A., Forrey, R.R., Guadagni, D.G. [1973]. Aromatic components of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 21, 948-952.
- [31] Lercker, G., Capella, P., Deserti, P. [1973]. Volatile and aromatic
-

compoundsofextravirginoliveoils.Sc.Techn.Alim.,3,299-303.

[32]

Reiners,J.,Grosch,W.[1998].Odorantsofvirginoliveoilswithdifferentflavorprofiles.J.Agric. FoodChem.46,2754-2763.

[33] Kalua,C. M.,Allen,M. S.,BedgoodJr., D. R.,Bishop,A.G.,Prenzler,P. D.[2005].Discriminationofoliveoilsandfruitsintocultivarsandmaturitystagesbasedon phenolicandvolatilecompounds.J.Agric.FoodChem., 53,8054-8062.

[34] Ouni Yousef, Nabil Ben Yousef, Zarrouk Mokhtar, Flamini Guido, [2011]. Influence of olive storage period on volatile compounds and oil quality of two tunisian cultivars of *Olea europaea*, Chemlali and Chetoui. International Journal of food Science and Technology 46, 1245-1252.

[35] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi & J. Smeyers-Verbeke, [1997]. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier Science, Amsterdam.

[36] P. Gemperline, [2006]. Practical Guide to Chemometrics, Second Edition, CRC Press, Boca Raton, FL.

[37] K. L. Goodner, J. G. Dreher & R. L. Rouseff, [2001]. The dangers of creating false classifications due to noise in electronic nose and similar multivariate analyses sensors and Actuators BChemical, 80, 261-266.

[38] P. Oliveri, C. Casolino & M. Forina, [2010]. Chemometric Brains for Artificial Tongues, (Ed. A. Press), pp. 57-117.

[39] A. Dankowska, M. Małeczka, W. Kowalewski [2013]. Discriminación de aceites de oliva comestibles mediante espectroscopía de fluorescencia sincrónica y análisis multivariante. Grasas y Aceites; Vol 64, No 4; 425-431

[40] Debora Tura, Osvaldo Failla, Daniele Bassi, Stefano Pedo, Arnaldo Serraiocco, [2009]. Environmental and seasonal influence on virgin olive (*olea europaea*) oil volatiles in northern Italy. Scientia Horticulturae 122, 385–392.

[41] Ouni Youssef, Flamini Guido, Issaoui Manel, Nabil Ben Youssef, Cioni Pier Luigi, Hammami Mohamed, Douja Daoud, Zarrouk Mokhtar, [2011]. Volatile compounds and

compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry* 124, 1770–1776.

[42] Brereton, R. G. [2007]. *Applied Chemometrics for Scientist*, John Wiley & Sons, Ltd, Great Britain.

[43] Fan, X.; Cheng, Y.; Ye, Z.; Lin, R.; Qian, Z. [2006]. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Anal. Chim. Acta*, 555, 217-224.

[44] Chen, Y.; Xie, M.; Yan, Y.; Zhu, S.; Nie, S.; Li, C.; Wang, Y.; Gong, X. [2008]. Discrimination of *Ganoderma lucidum* according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Anal. Chim. Acta* 2008, 618, 121-130.

[45] Cozzolino, D.; Fassio, A.; Restaino, E.; Fernandez, E.; La Manna, A. [2008]. Verification of Silage Type Using Near-Infrared Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56, 79-83.

[46] Brereton, R. G. [2007]. *Applied Chemometrics for Scientists*; John Wiley & Sons, Ltd: pp 145-191.

[47] P. Gemperline. [2006]. *Practical Guide to Chemometrics*, Second Edition, CRC Press, Boca Raton FL.

[48] Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger [2007]. K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196-214.

[49] Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G.; Loa, M. Z.; Rivera-Espinoza, Y. [2009]. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Res. Int.*, 42, 313-318.

[50] Ni, Y.; Lai, Y.; Brandes, S.; Kokot, S. [2009]. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example. *Anal. Chim. Acta*, 647, 149-158.

[51] Berrueta, L. A.; Alonso-Salces, R. M.; Héberger, K. [2007]. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196-214.

- [52] Liu, F.; He, Y. [2008]. Classification of brands of instant noodles using Vis/NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Res. Int.* 41, 562-567.
- [53] P. Gemperline. [2006]. *Practical Guide to Chemometrics, Second Edition*, CRC Press, Boca Raton FL.
- [54] Wise, B.; Gallagher, N.; Bro, R.; Shaver, J.; Windig, W.; Koch, R. [2006]. *Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo*. ISBN: 0-9761184-1-6.
- [55] Barranco et al. [2008]. Libro técnico *El Cultivo del Olivo*, editorial Mundiprensa.
- [56] Reglamento 2568/91/ CEE relativo a las características de los aceites de oliva y orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis[1991].
- [57] M. Guerfel, M.B. Mansour, Y. Ouni, F. Guido, D. Boujnah and M. Zarrouk, [2012]. Chemical composition of virgin olive oils from the Chemlali cultivar with regard to the method of the olive tree propagation, *Grasas y Aceites* 63 (3) 290-292.
- [58] Y. Ouni, F. Guido, m. Issaoui, Y. Nabil, P.L. Cioni, M. Hammami, D. Douja, M. Zarrouk. [2011]. Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, 124, 1770-1176.
- [59] Gómez-Rico A., Salvador M, and Giuseppe Fregapane [2009]. Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETc in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International*, 42, 8, 1067-1076.
- [60] Aurora Gómez-Rico, Giuseppe Fregapane, María Desamparados Salvador [2008]. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils *Food Research International*, 41, 433–440
- [61] Aguilera M., Ortega D. y Beltrán G. [2003]. Caracterización del aceite de oliva de variedades italianas (frantoio y leccino) cultivadas en Andalucía. En: XI SIMPOSIUM CIENTÍFICO-TÉCNICO Expoliva. Feria internacional del aceite de oliva. 14 a 16 de Mayo de 2003. Jaén, España.
- [62] Rondanini D.P., Castro D.N., Searles P.S. , Rousseaux M.C. [2011]. Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites*, 62 (4): 399-409.
-

- [63] Mansouri Farida, Ben moumen Abdessamada, Lopez Gerardd, Fauconnier Marie-Laureb, Sindic Mariannec; Serghini-Caid Hanaa, Elamrani Ahmeda. [2003]. Preliminary Characterization of monovarietal virgin olive oils produced in eastern area of Morocco. Inside Food Symposium, Leuven, Belgium
- [64] Sánchez C., Jacinto et al. [2003]. Estudio del contenido de ácidos grasos de aceites monovarietales elaborados a partir de aceitunas producidas en la región extremeña. *Grasas y Aceites*. 54(4): 371-77.
- [65] Villamil, J.J., Cabrera D., Rodriguez, P. [2007]. Resultados experimentales en olivos. En: Jornada de divulgación, programa nacional de producción frutícola. INIA Las Brujas, Uruguay 5 de octubre.
- [66] Perez - Arquillue C., et al. [2003]. Estudio de la calidad de aceite de oliva virgen en Aragón. *Grasas y Aceites*. 54(2): 151-60.
- [67] Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva CODEX STAN 33-1981 (rev. 2-2003).
- [68] Aparicio, R.; Morales, M. T.; Alonso, V. [1996b]. Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1253- 1264.
- [69] Laura Aceña Muñoz [2011]. Aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría en la caracterización del aroma del vinagre de vino, de los pistachos y del aceite de oliva (Tesis doctoral - Terragona).
- [70] Ramon Aparicio* and Maria T. Morales [1998]. Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil *J. Agric. Food Chem.* 46, 1116-1122
-

ANEXO 1: TABLA DE RESULTADOS DE ÍNDICE DE ACIDEZ, PEROXIDOS Y K₂₃₂ Y K₂₇₀

N°	Variedad	Acidez (% ácido Oleico)	Índice de Peróxidos (meq de O ₂ libre/Kg)	K232	K270	Δ K
1	Picual 1	0,2	3,7	1,46	0,14	< 0,01
2	Picual 2	0,1	1,7	1,49	0,12	< 0,01
3	Picual 3	0,1	18,0	1,76	0,13	< 0,01
4	Picual 4	0,1	11,8	1,56	0,14	< 0,01
5	Picual 5	0,2	3,7	1,46	0,14	< 0,01
6	Picual 6	0,1	1,7	1,49	0,12	< 0,01
7	Picual 7	0,1	18,0	1,76	0,13	< 0,01
8	Picual 8	0,1	11,8	1,56	0,14	< 0,01
9	Picual 9	0,1	12,5	1,64	0,12	< 0,01
10	Arbequina 1	0,2	2,9	1,58	0,16	< 0,01
11	Arbequina 2	0,2	3,9	2,18	0,20	< 0,01
12	Arbequina 3	0,2	5,1	1,71	0,11	< 0,01
13	Arbequina 4	0,2	4,0	1,57	0,11	< 0,01
14	Arbequina 5	0,1	5,2	1,59	0,15	< 0,01
15	Arbequina 6	0,1	4,4	1,49	0,12	< 0,01
16	Arbequina 7	0,2	4,0	1,54	0,16	< 0,01
17	Arbequina 8	0,2	4,3	1,65	0,14	< 0,01
18	Arbequina 9	0,2	11,9	2,40	0,18	< 0,01
19	Arbequina 10	0,1	6,6	1,87	0,15	< 0,01
20	Arbequina 11	0,2	10,5	2,01	0,13	< 0,01
21	Arbequina 12	0,2	11,3	1,87	0,13	< 0,01
22	Arbequina 13	0,2	12,6	1,92	0,15	< 0,01
23	Arbequina 14	0,2	9,9	1,54	0,14	< 0,01
24	Arbequina 15	0,2	4,4	1,47	0,13	< 0,01
25	Arbequina 16	0,1	3,7	1,61	0,09	< 0,01
26	Arbequina 17	0,2	2,2	1,46	0,12	< 0,01
27	Arbequina 18	0,2	5,3	1,79	0,14	< 0,01
28	Arbequina 19	0,1	6,4	1,63	0,11	< 0,01
29	Arbequina 20	0,2	7,9	1,63	0,11	< 0,01
30	Arbequina 21	0,1	9,4	1,66	0,12	< 0,01
31	Arbequina 22	0,2	8,0	1,70	0,11	< 0,01

32	Arbequina 23	0,2	11,2	1,69	0,09	< 0,01
33	Arbequina 24	0,1	9,9	1,72	0,10	< 0,01
34	Arbequina 25	0,1	4,8	1,62	0,12	< 0,01
35	Arbequina 26	0,2	4,2	1,53	0,07	< 0,01
36	Arbequina 27	0,3	7,2	1,69	0,10	< 0,01
N°	Variedad	Acidez (% ácido Oleico)	Índice de Peróxidos (meq de O2 libre/Kg)	K232	K270	Δ K
37	Arbequina 28	0,5	6,0	1,78	0,12	< 0,01
38	Arbequina 29	0,1	6,9	1,65	0,11	< 0,01
39	Arbequina 30	0,1	6,1	1,55	0,10	< 0,01
40	Arbequina 31	0,2	8,7	1,34	0,12	< 0,01
41	Arbequina 32	0,2	9,4	1,78	0,13	< 0,01
42	Arbequina 33	0,2	5,7	1,98	0,10	< 0,01
43	Arbequina 34	0,2	8,0	1,55	0,15	< 0,01
44	Arbequina 35	0,2	9,5	1,67	0,18	< 0,01
45	Arbequina 36	0,1	4,7	1,54	0,19	< 0,01
46	Arbequina 37	0,2	10,5	1,88	0,17	< 0,01
47	Arbequina 38	0,2	9,8	1,76	0,19	< 0,01
48	Arbequina 39	0,2	8,3	1,45	0,15	< 0,01
49	Arbequina 40	0,2	9,8	1,66	0,18	< 0,01
50	Arbequina 41	0,2	5,6	1,34	0,14	< 0,01
51	Arbosana 1	0,2	3,8	1,58	0,16	< 0,01
52	Arbosana 2	0,3	5,0	1,73	0,20	< 0,01
53	Arbosana 3	0,1	4,4	1,51	0,09	< 0,01
54	Arbosana 4	0,2	4,6	1,68	0,13	< 0,01
55	Arbosana 5	0,2	4,3	1,56	0,17	< 0,01
56	Arbosana 6	0,2	4,6	1,43	0,13	< 0,01
57	Arbosana 7	0,1	5,3	1,59	0,11	< 0,01
58	Arbosana 8	0,1	4,7	1,23	0,16	< 0,01
59	Arbosana 9	0,1	4,9	1,66	0,11	< 0,01
60	Arbosana 10	0,2	5,3	1,79	0,14	< 0,01
61	Arbosana 11	0,1	5,0	1,50	0,10	< 0,01
62	Frantoio 1	0,3	7,6	1,75	0,12	< 0,01
63	Frantoio 2	0,2	8,76	1,68	0,14	< 0,01
64	Frantoio 3	0,3	9,3	1,87	0,16	< 0,01
65	Frantoio 4	0,2	9,4	1,66	0,15	< 0,01
66	Frantoio 5	0,2	9,8	2,17	0,14	< 0,01
67	Frantoio 6	0,2	7,6	2,07	0,16	< 0,01
68	Frantoio 7	0,2	8,4	1,99	0,19	< 0,01
69	Frantoio 8	0,2	6,4	1,65	0,12	< 0,01
70	Frantoio 9	0,1	7,4	1,72	0,10	< 0,01
71	Frantoio 10	0,1	4,7	2,05	0,15	< 0,01
72	Frantoio 11	0,1	5,6	2,11	0,14	< 0,01

73 Frantoio 12 0,3 6,6 1,76 0,11 < 0,01

ANEXO 2: TABLA DE VALORES DE CRITERIOS DE CALIDAD ESTABLECIDOS EN EL REGLAMENTO (CE N° 2568/91) [56]

Parámetro	Valor
Acidez (% ácido oleico)	≤ 1,0
Índice de Peróxidos(meq de O ₂ libre/Kg)	≤ 20,0
K ₂₃₂	≤ 2,50
K ₂₇₀	≤ 0,20
Delta K	≤ 0,01
Ácido Palmítico (C16:0) %	7,5 - 20,0
Ácido Palmítoleico (C16:1) %	0,3 - 3,5
Ácido Heptadenoico (C17:0) %	< 0,3
Ácido Heptadecanoico (C17:1) %	< 0,3
Ácido Esteárico (C18:0) %	0,5 - 5,0
Ácido Oleico (C18:1) %	55,0 - 83,0
Ácido Linoleico (C18:2) %	3,5 - 21,0
Ácido Linolénico (C18:3) %	< 1,0
Ácido Eicosanoico (C20:0) %	< 0,6
Ácido Eicosenoico (C20:1) %	< 0,4
Ácido Docosanoico (C22:0) %	< 0,2
Ácido Tetracosanoico (C24:0) %	< 0,2