



**UNIVERSIDAD DE LA SERENA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes a través de la Prueba de  
Schaal. Incidencia en los parámetros de calidad**

**Memoria de título para optar al título de:  
QUÍMICO LABORATORISTA**

**PROFESOR GUÍA: Sra. FABIOLA JAMETT DÍAZ,**

**Carla Cordes Cortés  
Andrea Guerra Jeraldo**

**2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros Agradecimientos van hacia nuestros padres por estar siempre con nosotras y nos iluminaron con su cariño y apoyo a lo largo de nuestra carrera para llegar a ser profesionales como ellos lo soñaron.

A todas las personas que se preocuparon por nosotras, a las amigas que hemos encontrado a lo largo de los estudios y que siempre estuvieron ahí cuando las necesitamos.

A los profesores que día a día nos ayudaron en nuestra formación dándonos su dedicación, enseñanza y profesionalismo.

Y sobre todo a nuestra querida profesora Fabiola Jamett por su cariño, amistad, desvelos y por sus sabios consejos que nos han ayudado a que esto fuera posible.

La emoción nos embarga, el día tan ansiado ha llegado, nuestra meta se a cumplido, es hora de agradecerles a ustedes porque la realidad de nuestro sueño se haya cumplido y podamos emprender nuestro camino.

Gracias a Dios.

## INDICE DE MATERIAS

<b>1.0</b> Resumen.....	7
<b>2.0</b> Abstract.....	8
<b>3.0</b> Introducción.....	9
<b>3.1</b> Calidad del Aceite de Oliva.....	9
<b>3.2</b> Calidad Reglamentaria.....	10
<b>3.3</b> Estabilidad del aceite de oliva.....	11
<b>3.4</b> Deterioro oxidativo del aceite de oliva.....	13
<b>3.5</b> Deterioro oxidativo por vía enzimática.....	15
<b>3.6</b> Componente Polifenólico.....	15
<b>3.7</b> Análisis de los compuestos fenolitos del aceite de oliva.....	18
<b>3.8</b> Preparación de la muestra.....	18
<b>3.9</b> Contenido de tocoferoles.....	19
<b>3.10</b> Medida de la acidez.....	20
<b>3.11</b> Índice de peróxidos.....	21
<b>3.12</b> Absorbancia por radiación Ultra violeta.....	21
<b>3.13</b> Dienos y Trienos conjugados.....	22
<b>3.14</b> Pruebas de Resistencias de la estabilidad oxidativa.....	22
<b>3.14.1</b> Método del Oxígeno activo.....	22
<b>3.14.2</b> Pruebas de Absorción del Oxígeno.....	22
<b>3.14.3</b> Pruebas de conductividad.....	23
<b>3.14.4</b> Pruebas de almacenamiento acelerado.....	23
<b>3.14.5</b> Pruebas de almacenamiento a temperatura ambiente.....	23

<b>4.0</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivos generales.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.0</b>	<b>Desarrollo Experimental.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Test de Schaal.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Índice de Acidez: Método ISO 660.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Índice de Peroxido: Método ISO 3960.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4</b>	<b>Prueba Espectrofotométrica : Método COI/T.20/DOC19.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5</b>	<b>Polifenoles: Método espectrofotométrico.....</b>	<b>28</b>
<b>6.0</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>30</b>
<b>7.0</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>37</b>
<b>8.0</b>	<b>Referencia Bibliográficas.....</b>	<b>38</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1:</b> Diseño Experimental.....	26
<b>TABLA N°2:</b> Curva de Calibración de Polifenoles Totales.....	29
<b>TABLA N°3:</b> Valores de Índice de Peróxidos medidos en los Aceites de oliva para ambas variedades aplicando el Test de Schaal.....	41
<b>TABLA N°4:</b> Valores de Índice de Acidez medidos en los Aceites de Oliva para ambas variedades aplicando el Test de Schaal.....	42
<b>TABLA N°5:</b> Resultados Prueba Espectrofotométrica medidos en las Aceites de Oliva para la variedad Arbequina, aplicando el Test de Schaal.....	43
<b>TABLA N°6:</b> Resultados Prueba Espectrofotométrica medidos en las Aceites de Oliva para la variedad Frantoio, aplicando el Test de Schaal.....	44
<b>TABLA N°7:</b> Resultados Polifenoles Totales, medidos en los aceites de oliva para las variedades Frantoio y Arbequina, aplicando el test de Schaal.....	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°1:</b> Variación del Índice de Peroxido. Prueba de Schaal para las variedades Arbequina y Frantoio.....	30
<b>FIGURA N°2:</b> Variación del Índice de Acidez. Prueba de Schaal para variedades Arbequina y Frantoio.....	31
<b>FIGURA N°3:</b> Medida Espectrofotométrica. $K_{232}$ para las variedades Arbequina y Frantoio.....	33
<b>FIGURA N°4:</b> Medida Espectrofotométrica. $K_{270}$ para las variedades Arbequina y Frantoio.....	33
<b>FIGURA N°5:</b> Prueba Espectrofotométrica, delta K para las variedades Arbequina y Frantoio.....	34
<b>FIGURA N°6:</b> Contenido Polifenólico de Aceites de Arbequina Y Frantoio. Prueba de Schaal.....	35

## 1.0 RESUMEN

Los Polifenoles Naturales tienen actividad antioxidante y protegen a los aceites de la oxidación, para determinar la incidencia de éstos, se sometieron a prueba de **Schaal Oven Storage Stability Test** 2 muestras de aceites de oliva de dos variedades: Arbequina y Frantoio para establecer la relación existente entre el tiempo de almacenamiento (oxidación de las aceites de oliva) y los parámetros reglamentados y contenido polifenólico total, ya que éstos tienen variaciones relativas en los aceites dependiendo de la variedad, de los tratamientos agrológicos y de almazara.

Las muestras sometidas a los tratamientos de oxidación fueron comparadas con un valor referencial cero. Las pruebas Químicas que permitieron verificar el deterioro de los aceites de oliva fueron el índice de acidez, Índice de Peróxido, la prueba espectrofotométrica en el UV y el contenido de polifenoles totales analizados al inicio y al final del proceso.

Los resultados obtenidos mediante la Prueba de Schaal muestran que transcurridos las 12 primeras horas de tratamiento (T 60°C), los parámetros que presenta mayor variación son el índice de peróxido y la prueba espectrofotométrica. Esta última notoriamente en el  $\Delta K$ , pasando el aceite de la calidad virgen a lampante. El contenido de polifenoles totales encontrado fue muy bajo, para la categoría de aceites etiquetados Extra Virgen al inicio de la prueba, lo que indicaba un consumo significativo de éstos en los aceites desde el inicio del envasado hasta el momento de su adquisición para los ensayos, no presentando una variación significativa durante la aplicación del test lo que demuestra una gran resistencia de éstos al proceso de oxidación aplicado. El índice de acidez si bien fue variando paulatinamente durante todo el proceso, no superó el valor de 0,8 para un aceite de oliva virgen.

Estos resultados demuestran que los procesos de iniciación de la oxidación más importantes son la descomposición de hidroperóxidos ( $\Delta K$ ), los que una vez formados facilitan las reacciones de propagación, catalizados por la presencia de oxígeno, luz y temperatura; la presencia de antioxidantes en el aceite retardarían esto procesos si superan la concentración de polifenoles por sobre los 20 pp expresados como ácido cafeico.

## 2.0 ABSTRACT

The Polifenoles Natural has antirust activity and protects to oils of the oxidation, to determine the incidence of these, was on approval put under of Schaal Oven Storage Stability Test 2 olive oil samples of two varieties: Arbequina and Frantoio to establish the existing relation between the regulated time of storage (oxidation of olive oil) and parameters and total polifenólico content, since these have relative variations in oils depending on the variety, the agrológicos treatments and oil mill.

The samples submissive the oxidation treatments were compared with a referential value zero. The Chemical tests that they allowed to verify the deterioration of olive oil were the acid value, Peroxide Index, the espectrofotométrica test in the UV and the analyzed total content of polifenoles at the beginning and at the end of the process.

The results obtained by means of the Test of Schaal show that passed the 12 first hours of treatment (T 60°C), the parameters that greater variation presents/displays are the peroxide index and the espectrofotométrica test. The this last well-known in  $\square$  K, happening oil of the virgin quality to lampante. The content of total polifenoles found was very low, for the category of labeled oils Extra Virgin at the beginning of the test, which indicated a significant consumption of these in oils from the beginning of the packaging to the moment of its acquisition for the tests, not presenting/displaying a significant variation during the application of the test which demonstrates a great resistance of these to the applied process of oxidation. The acid value although was varying throughout the process gradually, did not surpass the value of 0.8 for a virgin olive oil.

These results demonstrate that the processes of most important initiation of the oxidation are the decomposition of hidroperóxidos ( $\square$  K), those that once formed facilitate the propagation reactions, catalyzed by the presence of oxygen, light and temperature; the presence of antirust in the oil would slow down this processes if they surpass the concentration of polifenoles by on the 20 pp expressed like cafeico acid.



### **3.0 INTRODUCCIÓN**

El aceite de oliva es uno de los más antiguos aceites vegetales conocidos y juega un rol fundamental en la nutrición humana especialmente en la cuenca del mar mediterráneo. Diversos estudios han demostrado que la equilibrada proporción de los elementos químicos que forman el aceite de oliva confiere a éste una serie de características peculiares convirtiéndolo en una fuente inagotable de elementos esenciales para la vida del ser humano.

La composición del aceite de oliva es bastante compleja y dentro de esta se puede distinguir fundamentalmente dos grupos de compuestos: una fracción mayoritaria, llamada saponificable, que representa entre 98 y 99 % del peso total, formada por una mezcla de triglicéridos (ésteres naturales de ácidos grasos y de glicerina) y ácidos grasos libres, dependientes del estado de deterioro de la oliva o del aceite propiamente tal. Los ácidos grasos principales que forman los triglicéridos del aceite son el oleico (entre 55 y 83%), el palmítico, el linoleico, el esteárico y linolénico. En función de su estabilidad, la tasa relativa de autooxidación es de 1:12:25 para oleato, linoleato y linolenato respectivamente (Bertrán et al., 2004).

La otra fracción llamada insaponificable (no compuesta por ácidos grasos), que representa entre 0,5 a 1,5% en peso, es muy importante para caracterizar a los aceites de oliva vírgenes dado que es la responsable del olor, color y sabor de los aceites, propiedades que desaparecen en buena medida en el proceso de refinación.

La fracción insaponificable comprende otras muchas sustancias fundamentales como terpenos, esteroides, alcoholes, pigmentos (clorofila, carotenos), tocoferoles (predominantemente vitamina E) y polifenoles.

#### **3.1 CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA**

Definir la calidad del aceite de oliva es un proceso complicado, ya que es difícil entender que la calidad no es un valor absoluto, sobre todo cuando se trata de alimentos en los que

entran criterios de sabor, color y olor, composición fisicoquímica, características nutricionales y terapéuticas, cualidades culinarias, etc. No obstante, la información o los hábitos culturales unifican los criterios y, con el apoyo del sector comercial, que necesita unas referencias fijas para poder establecer cualquier tipo de relaciones económicas, con el tiempo se van creando normas que definen el concepto de calidad en el aceite de oliva.

En el caso del aceite de oliva se puede decir que la máxima calidad es la que se obtiene cuando los frutos están maduros y sanos antes de su recolección.

### **3.2 CALIDAD REGLAMENTADA**

El Reglamento de la Comunidad Económica Europea (CE) N° 1989/2003 de la Comisión del 6 de noviembre de 2003, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 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, así como la normativa del Consejo Oleícola Internacional (COI) Res-4/75-IV/96 del 20 de noviembre de 1996, establece categorías comerciales para el aceite virgen de oliva y así diferenciar calidades, desde un punto de vista netamente comercial. Es así que tenemos aceites de oliva Virgen Extra, Virgen o Fino, Corriente y Lampante (a escala europea, la categoría Corriente queda incluida en Lampante, a partir de noviembre de 2003). (ver Cuadro N°1)

Dicha clasificación es relevante dado que limita las posibilidades de comercialización y uso del aceite; en efecto, sólo está permitido envasar aceite virgen de las categorías Extra y Fino, mientras que los Lampantes deben ser obligatoriamente refinados (proceso que implica diversas etapas fisicoquímicas para eliminar todos aquellos compuestos y aromas que hacen inviable su consumo directo como lo señala Romero y Tous (1999).

La acidez es uno de los parámetros químicos de los aceites de oliva que indica la cantidad de ácidos grasos libres que contiene el aceite (expresada en % de ácido oleico). Es importante saber que la acidez es un parámetro químico más para determinar su calidad reglamentada y que no tiene relación con el sabor. Una acidez baja garantiza que los aceites vírgenes se han elaborado con frutos sanos y en las mejores condiciones en todas las fases

del proceso. Por ello, para cada categoría de aceite de oliva se exige que tenga, como máximo, un grado de acidez (Jamett y col. 2007).

### 3.2.1 Cuadro 1 Parámetros reglamentados de calidad según categoría de aceite de Oliva.

<b>Categoría</b>	<b>Acidez %</b>	<b>Índice de peróxidos meq O<sub>2</sub>/kg</b>	<b>K<sub>232</sub></b>	<b>K<sub>270</sub></b>	<b>ΔK</b>
Aceite de oliva virgen extra	Máx. 0.8	Máx. 20	Máx. 2,40	Máx. 0,22	≤ 0,01
Aceite de oliva virgen	Máx. 2,0	Máx. 20	Máx. 2,50	Máx. 0,25	≤ 0,01
Aceite de oliva virgen corriente	Máx. 3.3	Máx. 20	Máx. 2.50	Máx. 0,25	≤ 0,01
Aceite de oliva virgen lampante	> 3.3	> 20	Máx. 3.70	≥ 0,25	-

Fuente: Comisión de la Comunidad Europea. CEE 2568/91.

### 3.3 ESTABILIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

Los aceites se oxidan por la acción del oxígeno atmosférico. Esta alteración se caracteriza por cambios fisicoquímicos, descenso del valor nutricional y aparición de la rancidez e incluso alguna toxicidad. El proceso es complejo porque depende de la influencia de muchos factores, tales como la luz, la temperatura, enzimas y metales. Sin embargo, siempre tiene lugar por el mismo camino: reacción en cadena envolviendo radicales libres (autooxidación).

Los ácidos grasos insaturados son los principales sustratos en el proceso de autooxidación, con los hidroperóxidos arílicos, sus productos primarios. Los hidroperóxidos pueden ser sustratos de diferentes procesos, dando lugar a productos de oxidación secundarios. Otros sustratos insaturados, tales como carotenos y α -tocoferol, pueden sufrir similares reacciones oxidativas con pérdida de la actividad vitamínica y color, además del valor nutritivo.

Los hidroperóxidos son productos primarios muy inestables que, por descomposición forman productos secundarios. Estos productos secundarios pueden incluir cientos de compuestos individuales que afectan negativamente al flavor de los alimentos. En muchos casos, estos compuestos están asociados a la rancidez oxidativa y/o la formación del flavor indeseable. Los métodos analíticos desarrollados para medir el nivel de oxidación están basados en los productos formados y/o envueltos en este proceso de deterioro oxidativo. La medida del índice de peróxidos (IP) se usa como indicador de la oxidación inicial por que mide el contenido de hidroperóxidos. El método más común es la metodología basada en el índice de yodo.

Durante la formación de radicales peroxidados e hidroperóxidos, tiene lugar un cambio en la configuración de los dobles enlaces, transformándose la configuración normal metileno-interrumpida en sus formas conjugadas. Los dienos conjugados muestran una absorción a 232 nm y los trienos a 268 nm. Mediante la medición de los dienos conjugados, se estima indirectamente el estado oxidativo del aceite.

Cabe señalar que en ausencia de luz, el aceite de oliva es oxidado de una forma mucho más lenta que cuando se expone a una luz difusa o directamente a la luz solar. Las clorofilas probablemente actúan como oxidantes débiles, interfiriendo con los mecanismos de radicales libres. En presencia de luz se cree que las clorofilas actúan como promotoras de una oxidación fuerte. Sin embargo Gutiérrez – Rosales et al., 1992 que añadieron clorofilas, no observaron efecto prooxidante al exponer el aceite a la luz artificial. La adición de clorofila producía un descenso inmediato en la estabilidad, pero mas tarde, durante todo el periodo de almacenamiento, la influencia de la luz era el factor predominante, mientras que el efecto de los aditivos era despreciable, los valores de  $K_{232}$  fueron similares en las muestras con y sin adición de clorofila. Según los autores estas diferencias observadas en la conducta de la clorofila, deberían ser atribuidas a la presencia de otros pigmentos en el aceite de oliva natural. (Jamett y col. 2007).

La separación de los polifenoles de las muestras originales, sin alterar otros compuestos antioxidantes han permitido estimar por primera vez, la contribución de los polifenoles en la estabilidad oxidativa del aceite de oliva virgen, siendo ésta del 50%.

También se ha realizado estudios sobre los cambios en los componentes mayores y menores del aceite de oliva virgen durante la oxidación. Durante el periodo de inducción, los polifenoles, tocoferoles y pigmentos sufren las más importantes alteraciones. Otros compuestos tales como ácidos grasos y volátiles, sufren modificaciones significativas solamente durante la fase rápida o exponencial de la oxidación mientras los antioxidantes naturales alcanzan los valores mínimos. La evolución de los diferentes compuestos y parámetros analizados sugieren que los contenidos en ortodifenol son los mejores índices para determinar la vida media de los aceites. (F. Gutiérrez- Rosales, 1992)

### ***3.4 DETERIORO OXIDATIVO DEL ACEITE DE OLIVA***

Los lípidos juegan un papel muy importante en el metabolismo de las células por ser una fuente de energía y un almacén de materiales de reserva. Los principales procesos que conducen a la alteración de los lípidos son la rancidez hidrolítica, o lipólisis, y la rancidez oxidativa u oxidación. En el aceite de oliva, el primero comienza cuando el aceite está en el fruto, mientras que el último se produce durante el proceso de elaboración del aceite y en el almacenamiento (Kiritsakis, 1990). La rancidez proviene de una gran variedad de sustancias químicas. Las papilas gustativas humanas son muy sensibles a algunos compuestos, como las lactonas y los ácidos grasos libres, de forma que son necesarias sólo pequeñas cantidades de estos compuestos para estropear el sabor de un alimento. Aunque la rancidez hidrolítica, que se produce por la liberación de los ácidos grasos libres de los glicéridos, es extremadamente importante para determinar cómo sabe un producto, es improbable que tenga alguna importancia nutricional porque las grasas son hidrolizadas mediante enzimas en el intestino delgado antes de ser absorbidas. En algunos casos, la rancidez hidrolítica es deseable. La rancidez oxidativa, sin embargo, conduce a la formación de compuestos tanto incomedibles como tóxicos, lo que es inaceptable desde el punto de vista nutricional (Sanders, 1983).

Como ya se mencionaba cuando los lípidos se oxidan forman hidroperóxidos, los cuales son susceptibles de una posterior oxidación o descomposición en productos secundarios de la reacción, tales como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes (Gardner, 1987; Frankel, 1984).

En muchos casos, estos compuestos afectan negativamente al flavor, aroma, sabor, valor nutricional y calidad sensorial global (Vercellotti, St. Angelo y Spanier, 1992). Muchos sistemas catalíticos incluyendo la luz, la temperatura, los enzimas, los metales, las metaloproteínas, los pigmentos y los microorganismos pueden acelerar la oxidación de los lípidos. La mayor parte de estas reacciones necesitan de algún tipo de radical libre y/o especie oxigenada. La oxidación se puede producir tanto en la oscuridad (autooxidación) como en presencia de luz (fotooxidación).

Los efectos de la post-cosecha y el almacenamiento fomentan una oxidación gradual de los lípidos, lo que produce una disminución de la estabilidad, o tiempo de vida útil, debido a procesos químico-orgánicos continuos desencadenados por las peroxidaciones iniciales (Heath y Reineccius, 1986). Los efectos del almacenamiento post-cosecha y el posterior procesado sobre la oxidación lipídica son de gran interés en el caso del aceite de oliva. El aceite de oliva se oxida cuando se pone en contacto con el oxígeno, aunque ciertas sustancias que retrasan la oxidación (antioxidantes) están presentes en el tejido celular de la planta. Los ácidos grasos esenciales, como el linoleico y linolénico, se destruyen y ciertas vitaminas liposolubles desaparecen cuando el aceite se oxida. Algunos de los parámetros relacionados con el deterioro oxidativo del aceite de oliva se incluyen dentro de las regulaciones oficiales del aceite de oliva (EC, 1997; IOOC, 1996 a). Estas regulaciones incluyen la determinación del índice de peróxidos, absorbancia en el ultravioleta y análisis sensorial (prueba de panel), así como la acidez libre, como índices de calidad de estos aceites. **El cuadro nº1** muestra los parámetros químicos relacionados con la oxidación. Estos valores se usan normalmente para establecer las distintas categorías de aceite descritas por las regulaciones (EC, 1997) de las comunidades Europeas.

El aceite de oliva se considera resistente a la oxidación debido a su bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados y por la presencia de antioxidantes naturales tales como el  $\alpha$ -tocoferol y los compuestos fenólicos, hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico y otros (Tsimidou, Papadopoulos y Boskou 1992). Sin embargo, el aceite de oliva es susceptible de oxidarse como ocurre con otros aceites vegetales. Muchos de los cambios indeseables que se producen en el aceite de oliva se pueden atribuir a procesos oxidativos. Aunque estos

procesos requieren varios factores, la presencia de oxígeno en el aire es una de las principales causas del deterioro del aceite. El proceso del deterioro oxidativo puede seguir rutas enzimáticas y/o químicas.

### **3.5 *DETERIORO OXIDATIVO POR VÍA ENZIMÁTICA***

La cascada de enzimas comienza a actuar en el momento en que se produce cualquier daño al tejido del fruto, ya sea durante la maduración, la recolección, el almacenamiento o el procesamiento de las aceitunas. En el aceite de oliva virgen (zumo de aceitunas), esta ruta actúa durante el proceso de extracción del aceite de oliva ya que los compuestos volátiles se forman inmediatamente que se cortan las aceitunas.

Las enzimas de rotura pueden ser naturales de las aceitunas y las plantas, en tanto que las enzimas microbianas no se pueden excluir como un factor del deterioro adicional. La formación de pequeñas cantidades de hidroperóxidos puede tener un efecto de aceleración sobre la oxidación en el aceite resultante. Los radicales libres formados por la descomposición de hidroperóxidos pueden intensificar aún más la oxidación, lo cual produce la formación del flavor desagradables más pronto de lo esperado, con lo que resulta una menor estabilidad del aceite durante su almacenamiento.

### **3.6 *COMPONENTE POLIFENÓLICO.***

Los compuestos fenólicos están presentes en el mesocarpio de la aceituna y aunque son solubles en agua, se han encontrado pequeñas cantidades en el aceite de oliva. Los polifenoles naturales, tanto los compuestos simples (por ejemplo, los ácidos fenólicos, o sus ésteres) como los compuestos más complejos (por ejemplo, lactonas, chalconas y flavonoides) tienen actividad antioxidante y protegen a los aceites vegetales de la oxidación (Shahidi y Wanasundra, 1992). Los compuestos fenólicos encontrados principalmente en el aceite de oliva son ácidos fenólicos, y su acción como antioxidantes mejora significativamente la estabilidad oxidativa de éste. (Angerosa y col., 1995).

El contenido de polifenoles entrega información de la calidad nutricional, estabilidad y características sensoriales del aceite. Generalmente rangos entre 50 a 200 ppm como ácido cafeico son considerados bajos, desde 200 a 400 ppm “medios” y sobre 400 ppm “altos”.

Esta estabilidad oxidativa, dependiente del contenido de polifenoles, dependerá no sólo de la variedad de la oliva y del proceso de obtención del aceite, sino que también de los tratamientos agrológicos empleados en los cultivos, sobre todo aquel que tiene que ver con el proceso de regadío de los mismos.

En la región de Coquimbo las investigaciones de INIA y la Universidad de la Serena han reportado para la temporada 2006 (Troncoso y col. 2007) y 2007 (Jamett y col. 2007) niveles medios de polifenoles totales del orden de 210, 330 y 264 ppm ácido cafeico para Arbequina, Frantoio y Picual respectivamente. Sin embargo en algunas zonas se han encontrado niveles máximos para Arbequina de 333 ppm, 560 ppm en Frantoio y de 470 ppm para Picual.

Cimato y col., 1991, trabajando en cuatro zonas italianas para la variedad Frantoio menciona niveles máximos de 500 ppm de ácido cafeico sólo para una de ellas. Por otro lado Uceda y col., 1999, menciona niveles de 200 y 470 ppm para las variedades Arbequina y Picual respectivamente, para la región de Andalucía. También menciona que estos contenidos están relacionados fuertemente con la variedad y la época de cosecha.

Aparentemente las muchas variedades involucradas en el proceso completo, son responsables de las diferencias encontradas entre los diversos investigadores, Bouskou (1998) señala que pequeñas diferencias en la maquinaria de molido de la oliva, las temperaturas aplicadas, la duración con el contacto del agua y el volumen total de agua utilizada, pueden provocar cambios significativos en el contenido de polifenoles totales.

Se debe mencionar además que los compuestos fenólicos, son los principales responsables de las percepciones gustativas en el aceite de oliva siendo responsables de la astringencia



que es una sensación táctil inducida químicamente que se puede definir como una sensación de sequedad y aspereza en la boca.

El contenido de polifenoles cambia a lo largo de la maduración según una curva de segundo grado con un máximo que generalmente coincide con el momento en que se alcanza la máxima cantidad de aceite en el fruto. Este máximo tiene lugar aproximadamente en la misma fecha en cultivares distintos, aunque corresponden a estados de madurez diferentes en los mismos. Estas modificaciones inciden sobre las características sensoriales de los aceites que tienen aromas cada vez mas apagados. Perdiéndose parte de su fragancia al tiempo que decae el flavor amargo, apareciendo la sensación del flavor dulce. Un retraso en la época de recolección da lugar a aceites menos fragantes, más apagados, menos amargos y con sensación de mayor suavidad, siempre que el fruto procesado este sano y proceda del árbol.

Desde el punto de vista terapéutico, en trabajos recientes, se ha puesto en evidencia que existe una acción antioxidante de algunos componentes fenólicos presentes en el aceite de oliva, en particular la acción inhibitoria de la oxidación de las LDL (implicadas en la patogénesis de la aterosclerosis ) ejercida por el hidroxitirosol, polifenol lipófilo y buen indicador de los fenoles totales presentes en los aceites de oliva, y por la oleuropeína, también lipofílica, presente en gran cantidad en las aceitunas y el aceite extraído de las mismas.

La acción protectora antioxidante ha quedado demostrada también para los demás componentes fenólicos presentes en menor cantidad en el aceite de oliva, como el ácido ferúlico y el ácido cafeico. Hasta ahora, no se ha propuesto ningún método estándar u oficial, para la determinación de fenoles naturales del aceite de oliva, y los valores encontrados por diversos investigadores, apenas si pueden ser comparados, en lo referente al contenido total de polifenoles y porcentaje de los componentes individuales.

La presencia de polifenoles en el aceite de oliva está relacionada con la estabilidad oxidativa y la calidad sensorial del aceite. Una correlación lineal entre este índice y la estabilidad

oxidativa del aceite se puede considerar como bien documentada (Baldioli y col., 1996; Cantarelli, 1961).

### **3.7 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA**

Las técnicas de elección para la separación y caracterización de compuestos fenólicos individuales son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida (LC) acoplada con detección ultravioleta (UV). La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y de masas (MS) se aplica para ayudar en la identificación de los compuestos más complejos.

Los procedimientos colorimétricos todavía son los métodos más apropiados para la estimación de los fenoles totales o de los o- difenoles totales. En todos los casos, los componentes fenólicos tienen que ser extraídos de la matriz del aceite. La preparación de la muestra engloba el aislamiento de la fracción polar del aceite por extracción líquido- líquido o extracción en fase sólida con o sin posterior purificación del extracto.

### **3.8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

La fracción polar del aceite de oliva se obtiene normalmente con mezclas agua- metanol. De acuerdo con Montedoro y Cantarelli (1969), la solubilidad de los polifenoles en agua es muy pobre incluso cuando el volumen de disolvente es cinco veces el volumen de aceite. Por otro lado, el metanol puro no es apropiado porque algunos lípidos polares se disuelven también. La proporción óptima de disolvente es metanol- agua, 80:20, v/v. Otros investigadores proponen un incremento del contenido de agua (por ejemplo, 40%) para evitar la separación de fases a través de centrifugación (Vázquez y col., 1976). Las sustancias tensioactivas (por ejemplo, Tween 20 a un nivel de 2%) han sido utilizadas repetidamente por algunos investigadores para liberar los compuestos fenólicos de las membranas lipoproteínicas (Montedoro, 1972; Montedoro y col., 1992a; Montedoro y col., 1978; Montedoro y Cantarelli 1969). Las modificaciones posteriores estarían relacionadas con la cantidad de aceite, los procedimientos de separación de fases o la limpieza de extracto.

Montedoro y col., (1992a) revisaron varios esquemas de extracción intentando ajustar el procedimiento de preparación de la muestra para el análisis HPLC de fenoles. El 80% de metanol y la purificación del extracto polar con acetonitrilo- hexano (1:4 v/v) proporcionó la mejor recuperación. Las extracciones con metanol absoluto (Solinas et al., 1981; Solinas et al., 1978) y 60% de metanol (Vázquez Roncero y col., 1976) fueron menos eficaces.

Cortesi, Azzolini y Rovellini (1995) propusieron tetrahidrofurano en vez de metanol para la extracción polar. Los autores han puesto de manifiesto que con la mezcla tetrahidrofurano – agua (80:20 v/v), las cantidades de fenoles recuperados son significativamente más altas que las obtenidas después de la extracción con metanol- agua (60:40 v/v).

Angerosa y col., (1995) han puesto de manifiesto que los mejores resultados se obtienen con metanol puro, comparándolo con los resultados obtenidos usando la combinación propuesta por Montedoro y col., (1992a).

### **3.9 CONTENIDO DE TOCOFEROLES**

Los tocoferoles contienen la vitamina E y realizan la función nutritiva más importante del aceite de oliva. Estos son compuestos heteroácidos de alto peso molecular, se han identificado varios tocoferoles aislados y han sido designados como alfa, beta, gamma-tocoferol. La diferencia entre ellos radica fundamentalmente en la posición de varios grupos metilos.

Los tocoferoles se encuentran en cantidades diversas en los aceites vegetales, en los aceites de oliva el contenido de tocoferoles varia de 5 a 15 mg/100g siendo el mayoritario el alfa-tocoferol (52-87%), en menor cantidad se encuentra el beta-tocoferol (10-20%) y el gamma-tocoferol (7-23%). Debido a que son fáciles de oxidar los tocoferoles son excelentes antioxidantes naturales y confieren estabilidad a la grasa o aceite que los posee siendo siempre su contenido más alto en los aceites vírgenes.

El contenido total de tocoferoles se determina habitualmente por el método Emmerie y Engels, basado en una reacción coloreada entre el ion ferroso y el  $\alpha,\alpha$ -bipiridilo. La determinación, que es simple y rápida, se realiza colorimétricamente a 520nm utilizando una recta de calibrado de  $\alpha$ -tocoferol o hidroquinona. Aunque existen otros métodos se considera el mejor, a pesar de que puede producirse un efecto depresivo sobre el desarrollo del color cuando se aplica dicho método a aceites y grasas.

Han sido puestas a punto técnicas de HPLC para eliminar el efecto del deterioro de los tocoferoles por la alta temperatura usada en GLC, técnica empleada antiguamente para determinar los tocoferoles individuales. Hoy los tocoferoles se pueden analizar directamente por HPLC, mediante inyección del aceite disuelto en fase móvil hexano:isopropanol (99,8:0,2 v/v) en una columna Lichrosorb Si-60 de 5  $\mu$ m con una longitud de 250mm y un diámetro interno de 4mm. Las características del detector de fluorescencia son  $I_{EX} = 290$  nm y  $I_{EM} = 330$  nm.

Para preparar los estándares, se adicionan los patrones de tocoferoles a un aceite de oliva y se somete a una saponificación en frío, el insaponificable se disuelve en la fase móvil y se analiza en columna de fase inversa, variando la fase a lo largo del análisis. La detección se realiza también por fluorescencia.

### **3.10 MEDIDA DE LA ACIDEZ**

Los aceites de oliva tal como están contenidos en las aceitunas sanas y maduras, tienen una acidez muy baja. La hidrólisis provocadas, sobre todo por la actividad microbiana, son las que elevan la acidez, por lo tanto este parámetro alerta sobre determinadas alteraciones sufridas por los aceites. La acidez se expresa en porcentaje de ácido oleico. Estos grados no tienen relación con la intensidad del sabor, sino que son una pauta para catalogar los aceites de oliva. (**Tabla N° 1** ). Cuando la acidez es elevada los aceites no pueden ser utilizados directamente para la alimentación humana. Si superan 3,3° deben ser refinados.

### **3.11 INDICE DE PEROXIDOS**

La cantidad de oxígeno activo contenido en el aceite evalúa el estado de oxidación primaria. El índice de peróxido detecta la oxidación incipiente, antes de que se hayan formado carbonilos, y por tanto, antes de que haya manifestación de malos olores y sabores. El índice de peróxido también da una información sobre la alteración en los tocoferoles y poli fenoles, que son los antioxidantes naturales del aceite de oliva virgen.

Al avanzar el estado de oxidación de un aceite, desaparecen los peróxidos, dando lugar a otros productos. Es posible que un aceite muy alterado de un bajo índice de peróxido. La información completa sobre el estado de oxidación se adquiere con la determinación, además, del  $K_{270}$ .

### **3.12 ABSORBANCIA POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA ( $K_{232}$ y $K_{270}$ ).**

Los ácidos grasos poliinsaturados son sensibles a las oxidaciones auto catalíticas, induciendo la extensión de este proceso a otros ácidos grasos. En primer lugar aparecen hidroperóxidos, poco estables, que absorben cerca de una longitud de onda de 232 nm. A continuación son las diacetonas y las cetonas alfa-insaturadas que absorben cerca de los 270 nm. También pueden formarse otras funciones oxigenadas, hidroxilos y carbonilos, que incrementan la absorbancia de la radiación UV entre 260 y 280nm, con un máximo alrededor de 270nm.

El coeficiente de extensión específica aumenta conforme la alteración oxidativa es mayor, hasta fases muy avanzadas. Por esto complementa la información obtenida con el índice de peróxidos. Los índices de extinción específica sirven también como criterio de pureza, porque los aceites con tratamientos industriales, como es la aplicación de altas temperaturas o la decoloración en el proceso de refinación, incrementan los trienos conjugados. La presencia de otros ácidos grasos de aceites diferentes al de oliva eleva también el 270.

### 3.13 DIENOS Y TRIENOS CONJUGADOS

Durante la formación de radicales peroxidados e hidroperóxidos, tiene lugar un cambio en la configuración de los dobles enlaces, transformándose la configuración normal metileno-interrumpida en sus formas conjugadas. Los dienos conjugados muestran una absorción a 232 nm y los trienos a 268 nm (Nor y Augustin, 1984). Mediante la medición de los dienos conjugados, se estima indirectamente el estado oxidativo del aceite.

### 3.14 PRUEBA DE RESISTENCIA A LA ESTABILIDAD OXIDATIVA

Se han puesto a punto numerosas pruebas, basadas en la oxidación acelerada, para evaluar la resistencia del aceite a la oxidación. Según Frankel (1993) las pruebas de estabilidad oxidativa en las que la temperatura esté por encima de los 85° C no son fiables debido a los diversos mecanismos de oxidación implicados. Warnery col., (1989) encontraron, además, que los resultados del Rancimat y el método del oxígeno activo no coinciden con la prueba de estabilidad realizada a 60°C.

Las pruebas más usadas son:

**3.14.1 Método del oxígeno activo:** En el método del oxígeno activo (AOM) o prueba de Swift, el aire borbotea a través del aceite que se mantiene a 98° C. Se toman muestras de aceite a diferentes intervalos, y se determina el índice de peróxidos. El período de inducción se determina gráficamente, dibujando el IP frente al tiempo.

**3.14.2 Prueba de absorción del oxígeno:** el deterioro oxidativo se puede también observar manteniendo el aceite a temperaturas elevadas en un sistema cerrado y midiendo la absorción de oxígeno. Existen muchas variaciones a este procedimiento, incluyendo el procedimiento ASTM de bomba de oxígeno, el aparato FIRA-Astell, la prueba de Silvestre y la ganancia de peso o los procedimientos gravimétricos.

**3.14.3 Pruebas de conductividad:** Estas pruebas se basan en la descomposición de los hidroperóxidos y en la formación de ácidos grasos de cadena corta que cambian la conductividad del agua. Estos ácidos, producidos cuando los aceites se calientan a 100° C o más, son los ácidos fórmico y acético principalmente. Se han desarrollado varios instrumentos automatizados, incluyendo el Rancimat y el OSI (Rosell, 1987), que están basados en el principio de conductividad.

**3.14.4 Pruebas de almacenamiento acelerado:** Estas pruebas se han utilizado ampliamente para observar la estabilidad de los aceites vegetales usando una modificación de la prueba Schaal Oven (Eskin y col., 1989). En esta prueba, la oxidación se acelera manteniendo la muestra de aceite a 60 – 65°C en la oscuridad y las muestras se evalúan a intervalos prefijados midiendo la evolución de la oxidación. Existen variaciones en las condiciones de la prueba de la estufa o de Schaal. Estas incluyen diferencias en la cantidad de aceite a almacenar, el tamaño de los depósitos de almacenamiento y la proporción entre la superficie del aceite y su volumen, así como si los depósitos están cubiertos o descubiertos durante el tiempo de almacenamiento. La proporción entre el área de la superficie y el volumen del aceite afecta directamente al nivel de oxidación. La Prueba de Schaal es más fiable que las pruebas llevadas a cabo a temperaturas elevadas porque reproduce los cambios oxidativos observados en los estudios realizados sobre el tiempo de vida útil (Shelf-life) (Tie y De Man, 1987). Aumentando la temperatura de almacenamiento, el nivel de oxidación crece tal modo que la totalidad de la prueba se puede realizar en un espacio de tiempo más corto. Un día de almacenamiento bajo esta condición equivale a un mes a temperatura ambiente (Evans y col., 1973). Esta prueba también se puede realizar con exposición a la luz para evaluar el efecto de la fotooxidación en la estabilidad oxidativa del aceite.

**3.14.5 Pruebas de almacenamiento a temperatura ambiente:** Estas pruebas se realizan de manera similar a la prueba de Schaal, excepto en que el almacenamiento es a temperatura ambiente. Las pruebas deben llevarse a cabo durante un largo período de tiempo debido a la lentitud del proceso de oxidación, consecuentemente son muy costosas y necesitan mucho tiempo. (Aparicio y Harwood., 2003)

## 4.0 *OBJETIVOS*

### 4.1 *OBJETIVOS GENERALES*

Establecer la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes, de 2 variedades de olivas a través de la Prueba de Schaal.

### 4.2 *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

1. Aplicar el **Test de Estabilidad de Schaal** en las muestras seleccionadas.
2. Determinar Índice de peróxidos en las muestras sometidas al test de Schaal
3. Caracterizar los aceites de las diferentes variedades estudiadas sometidas a test de Schaal en sus contenidos de polifenoles.
4. Establecer el comportamiento de los aceites a los tiempo de exposición o deterioro en el índice de peróxidos, índice de acidez, pruebas espectrofotométrica y contenido de polifenoles.



## 5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se sometieron a oxidación a través de la prueba de estabilidad de Schaal Oven Storage Stability Test. 2 muestras de aceites de oliva de las variedades Arbequina y Frantoio con el objetivo de determinar el comportamiento en los parámetros de calidad reglamentados de los aceites. De tal manera de tener un diagnóstico del comportamiento de los aceites a través de la visualización de los cambios y poder diseñar en muestras frescas parámetros de determinación objetiva de la estabilidad de los mismos.

Las muestras de aceites, en virtud de no tener acceso a aceites frescos, en espera de la cosecha del año, se adquirieron en un supermercado. Se seleccionaron dos variedades varietales Arbequina y Frantoio de origen Chileno, de la zona de la Región de Coquimbo. Marca Kardemili.

Los parámetros químicos medidos fueron: Determinación de la acidez libre: Según el método ISO 660. Determinación del Índice de peróxido según método ISO 3960. Determinación de la absorbancia en el ultravioleta según el método COI/T.20/Doc.19. y Polifenoles: Método espectrofotométrico empleando el reactivo de Folin-Ciocalteau.

### 5.1 TEST DE SCHAAL

Se seleccionaron dos variedades de aceites de oliva extra virgen para realizar las pruebas de estabilidad a través del Test de Schaal. Se empleó un volumen de 30 mL de aceite colocados en vasos de plumavit resistentes al calor. La temperatura se mantuvo constante a 60°C durante todo el experimento, empleando para ellos una estufa de aire forzado, marca Mermert Una vez transcurridos los tiempos de exposición los vasos se fueron retirando cada 12 horas, congelándolos para su posterior análisis. El diseño completo del experimento se muestra en la tabla N° 1

Los análisis realizados posteriormente en las muestras de aceites fueron índice de Acidez, índice de Peróxidos,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ,  $\Delta K$  y contenido de polifenoles.

<p>Tabla N°1.</p> <p><b>DISEÑO EXPERIMENTAL:</b></p> <p>Variedad (V): Arbequina y Frantoio</p> <p>Tiempos de exposición (T): Cada 12 horas</p> <p>Réplicas (R): 3</p> <p>Factorial = (V x T)x R = (2 x 10)x 3 = 60 unidades experimentales</p>
<p>(T) Tiempos de exposición: Horas</p> <p>0</p> <p>12</p> <p>24</p> <p>36</p> <p>48</p> <p>60</p> <p>72</p> <p>84</p> <p>96</p> <p>108</p>

## 5.2 INDICE DE ACIDEZ: MÉTODO ISO 660

Se adicionó 50 mL de etanol absoluto sobre un erlenmeyer de 250 mL y se colocó sobre placa calefactora, en agitación continua, hasta alcanzar 60° C de temperatura, medida con termómetro. Al alcanzar la temperatura mencionada se le adicionó 0,5 µL de fenolftaleína al 1% y se neutralizó por titulación empleando KOH 0,1 N (preparado desde titrisol, Merck), hasta viraje del indicador a un rosado pálido.

La solución anterior neutralizada se adicionó sobre matraz erlenmeyer de 250 mL que contenía aproximadamente 10 g de muestra de aceite de oliva, masada con precisión de 10 mg. Posterior a esta acción, se tituló la solución hasta coloración rosa pálido del indicador. Para la titulación se empleó una bureta digital de capacidad máxima de 50 mL y precisión +0,01 mL.

Cálculo:

$$\% \text{ ácido oleico} = \frac{V * N * 282}{10 * p}$$

Donde:

V = volumen de solución gastado por la bureta de titulación en muestra.

N = Normalidad KOH (0.1).

p = peso de la muestra.

### 5.3 ÍNDICE DE PERÓXIDOS: MÉTODO ISO 3960

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra de aceite de oliva con precisión de 10 mg en un matraz erlenmeyer de 250 mL con tapa. Posteriormente se adicionó 50 mL de solución ácido acético/ isooctano (60:40) agitando hasta disolución del aceite. Luego se procedió a incorporar 500 µL de solución saturada de KI con agitación constante por exactamente 1 minuto. Al transcurrir este tiempo se adicionó 30 mL de agua destilada para detener la reacción de oxidación titulando con una solución de tiosulfato de potasio 0.01 N preparada desde un tritrisol Merck. Al observarse el cambio de color amarillo a amarillo pálido se adicionó 500 mL de solución de almidón al 1% y se continuó la titulación hasta un viraje del almidón de azul a blanco. Para la valoración se empleó una bureta digital de capacidad de máxima de 50 mL y precisión +0,01 mL.

Cálculos:

$$IP = \frac{1000 (V - V_o) c}{m}$$

V = volumen de solución gastado por la bureta de titulación en muestra

V<sub>o</sub> = volumen de solución gastado por la bureta de titulación en blanco.

c = concentración conocida [0.01]

m = masa de la muestra (g).

#### 5.4 PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA: MÉTODO COI/T.20/DOC.19.

Se pesó aproximadamente 0.25 g de Muestra de aceite de oliva, con precisión de 1 mg, que se colocaron en un matraz de aforo de 25 ml. Luego se adicionó isooctano grado espectrofotométrico para la disolución del aceite y aforado a volumen total del matraz. Empleando un blanco de isooctano se midió la extinción a las longitudes de onda de 232-266, 270 y 274 nm para ello se empleó un espectrofotómetro de arreglo de diodos, marca Spekol- HENA, con precisión de la longitud de onda de 1 nm. A partir de estas lecturas de determinaron los  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  y el  $\Delta K$  respectivos.

Cálculo:

$$K = \frac{L}{C * b}$$

**Donde:**

L = lectura de Absorbancia a la  $\lambda$  respectiva.

C = Concentración de la muestra (gramos/100 mL)

B = Espesor de la cubeta en cm

$$\Delta K = K_m - \left[ \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \right]$$

Donde  $K_m$  es la extinción específica a la longitud de onda m, que es la de máxima absorción alrededor de 270 nm.

#### 5.5 POLIFENOLES: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO EMPLEANDO EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

Se pesaron 1 – 1.5 g de aceite con precisión 1 mg. Empleando una solución metanol-agua (80:20) se procedió a extraer los polifenoles por 3 veces en agitación continua por tres

minutos en cada extracción ayudándose por un Vortex- mixer. Para la medida espectrofotométrica 200  $\mu$ L del extracto obtenido de las extracciones, en matraces de 10, 0 mL se adicionaron de 1 ml de metanol, 5 mL de agua destilada y 500  $\mu$ L de reactivo folin, se esperaron 3 minutos, al cabo de los cuales se adicionó 1 ml de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 35%, finalmente se completó el matraz con agua destilada dejándose 1 hora en reposo y oscuridad. Finalizado este tiempo la solución fue medida a 725 nm frente a una curva de calibración en la cual se empleó como patrón ácido cafeico.

La curva empleada fue la siguiente:

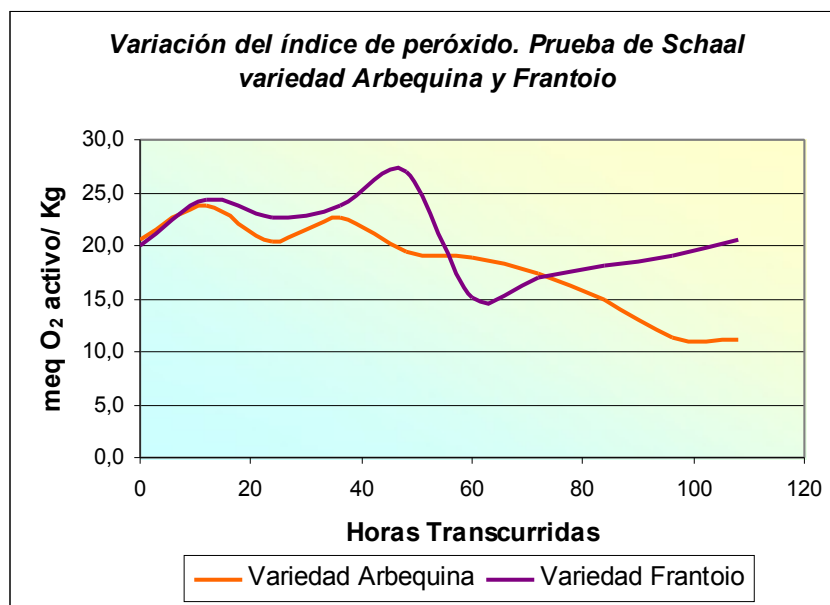
Tabla N° 2: Curva de calibración polifenoles totales:

<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Volumen</b>	<b>A</b>
<b>Ácido cafeico</b>	<b>patrón</b>	
2	200 $\mu\text{l}$	0.238
4	400 $\mu\text{l}$	0.496
6	600 $\mu\text{l}$	0.688
8	800 $\mu\text{l}$	0.866

## 6.0 RESULTADOS

En la Figura N° 1 se representan los valores obtenidos de índice de peróxido para ambas variedades. Se debe señalar que los aceites empleados en el experimento correspondieron a dos muestras adquiridas en un supermercado, rotulados ambos, aceite de oliva extra virgen. De acuerdo a los análisis realizados en el punto 0, valor referencial blanco, los aceites cumplía con la categoría, pero en el límite de Peróxidos, esto es 20 meq.O<sub>2</sub> activo/Kg de aceite. Esto suponía ya un aceite relativamente viejo; por lo que se esperaba un contenido de polifenoles bajo. Los valores de todas las unidades experimentales, en triplicado, se encuentran tabuladas en el anexo tablas.

Figura N°1

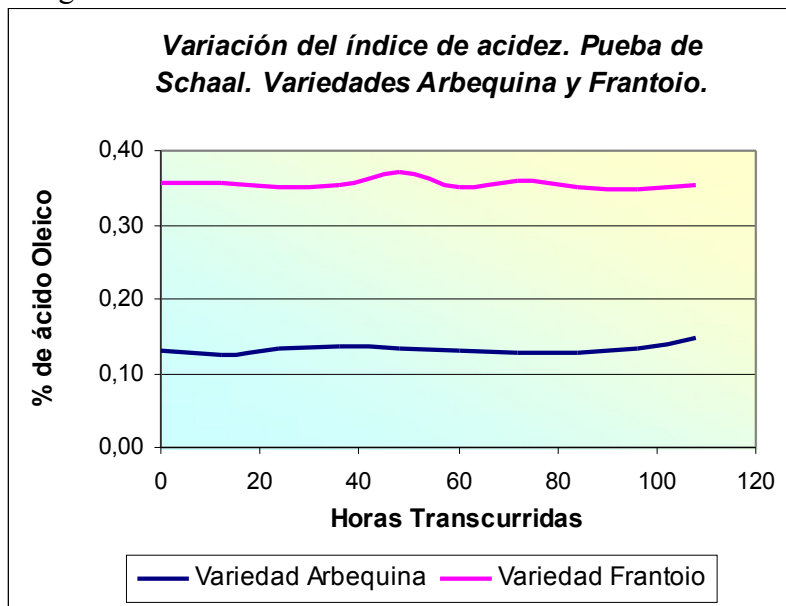


Se puede observar en la figura 1, para ambas variedades, al inicio de la prueba de estabilidad, un aumento del índice de peróxido, superando dentro de las primeras 20 horas los 20 meq de O<sub>2</sub> activo/kg de aceite, por lo tanto ambos aceites quedaron fuera de la categoría virgen extra o virgen, pasando a la categoría de lampante, es decir aceite no comestible. Si bien se esperarí para ambas variedades un incremento constante del índice de peróxido en las pruebas realizadas no se observa este comportamiento. En la variedad

Frantoio se incrementa hasta transcurridas las 40 horas (28meq O<sub>2</sub>/Kg), con un descenso brusco a las 60 horas del índice de peróxido cercano a los 15 meq O<sub>2</sub>/kg, volviendo a incrementarse paulatinamente hasta los 20 meq O<sub>2</sub>/Kg de aceite. Para la variedad Arbequina el comportamiento las primeras 40 horas es similar pero luego presenta un descenso paulatino hasta alcanzar los 10 meq O<sub>2</sub> /Kg a las 108 horas, finalización del experimento. Este comportamiento se puede explicar ya que al avanzar el estado de oxidación de un aceite, desaparecen los peróxidos, dando lugar a otros productos, disminuyendo por consiguiente los valores del índice de peróxidos (Jamett y Col. 2007).

Es por esta razón que la información completa sobre el estado de oxidación se adquiere con la determinación de la absorbancia por radiación ultravioleta, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub> y ΔK. Bajo este prisma es muy probable que ambos aceites alcanzaran un estado de deterioro significativo cercano ya sobre las 40 horas de tratamiento, dando los valores de índice de peróxido señalados en la Figura 1, en descenso hacia las 108 horas de tratamiento.

Figura N°2



En la Figura 2, se representan los valores de índice de acidez. Se puede observar, en ambas variedades un mantenimiento del índice de acidez a lo largo del proceso de oxidación. Este valor expresa la acidez libre, es decir la liberación de ácidos grasos por las enzimas

lipolíticas. Para la máxima categoría de un aceite, extra virgen, la acidez debe ser menor a 0,8%. En aceites de oliva virgen frescos para las variedades estudiadas, procedentes de la misma empresa, se han registrado valores de acidez de 0,1 a 0,2 para la variedad arbequina y de 0,3 y 0,5 para la variedad Frantoio. (Cosecha 2008). Estos datos confirman lo señalado anteriormente que las muestras adquiridas en el supermercado para este estudio, probablemente correspondieran a la cosecha 2007, siendo aceites ya con pérdida significativa de antioxidantes, afirmación que se corrobora con el contenido de polifenoles (Figura 7), encontrados al inicio del tratamiento que no superó los 30 mg de ácido cafeico/Kg de aceite para ambas variedades. Los valores normales encontrados para ambas variedades en aceites frescos se encuentran alrededor de 200 mg de ácido Cafeico/Kg de aceite para la variedad Arbequina y de 350 mg de ácido cafeico/Kg para la variedad Frantoio.

En el caso de las dos variedades estudiadas, el índice de acidez inicial, antes de ser sometidos los aceites a la oxidación, fue de 0.13 y 0.37 % de ácido oleico para las variedades Arbequina y Frantoio respectivamente. Durante las 108 horas de tratamiento oxidativo, el valor del índice de acidez se mantuvo constante, por lo que se puede inferir que los aceites no se vieron afectados por el tratamiento, por lo que no se vio favorecida la actividad enzimática. Esto se puede explicar por la riqueza en ácido oleico y en agentes antioxidantes en el aceite de oliva, que lo posesiona en una situación privilegiada, ya que se precisan temperaturas particularmente intensas y prolongadas para que se produzcan alteraciones evidentes. (Viola, 2004). Por otro lado las alteraciones físicoquímicas más importantes son las de los ácidos grasos poliinsaturados. En el aceite de oliva el contenido de estos dos ácidos grasos, en ambas variedades no supera el 1% para linolénico y 13% para linoleico.

En las Figuras N° 3, 4 y 5 se muestran las variaciones de  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  y  $\Delta K$  para ambas variedades de aceites estudiadas. Como se mencionó anteriormente este parámetro debe ser el complemento del índice de peróxidos. Un aceite es lampante, es decir pierde sus cualidades de consumo y debe refinarse cuando los valores superan los valores de valor: 2.60 para  $K_{232}$ , 0,25 para  $K_{270}$  y 0,01 para  $\Delta K$ .



Figura N°3

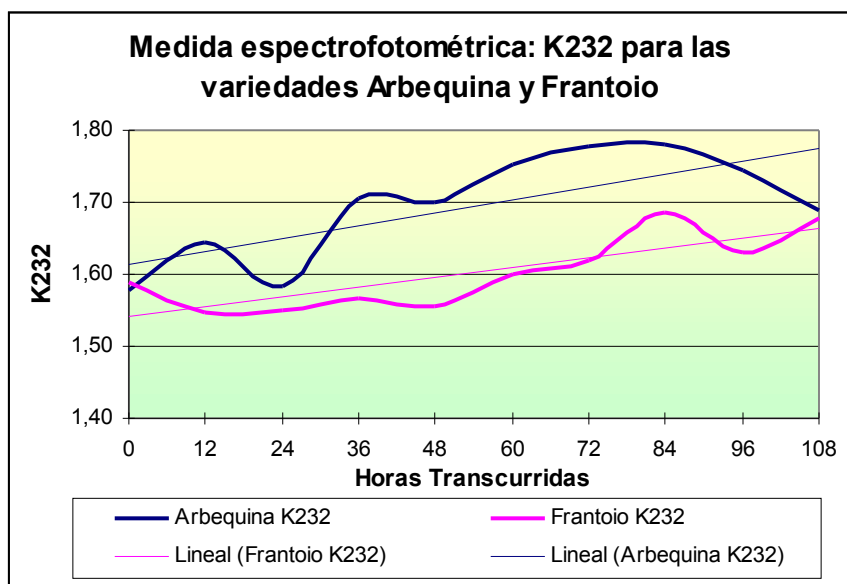
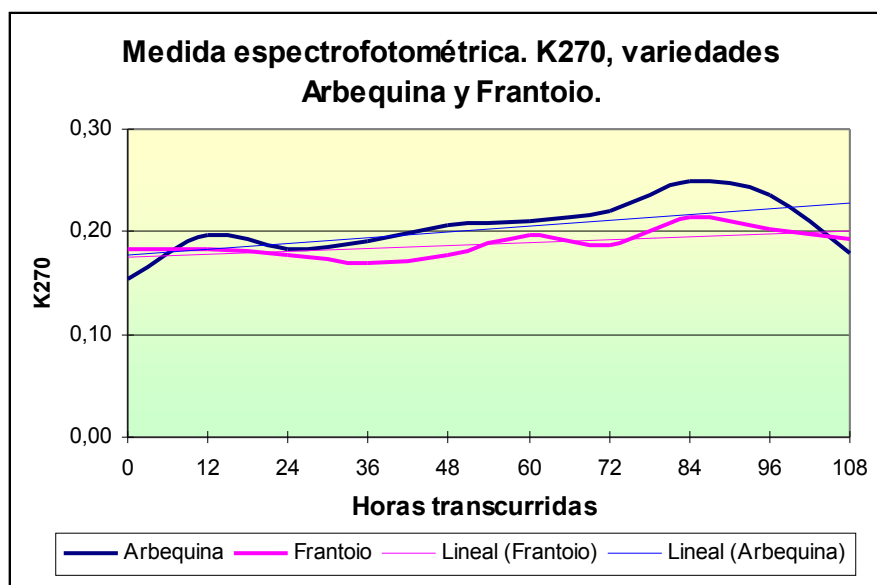


Figura N°4

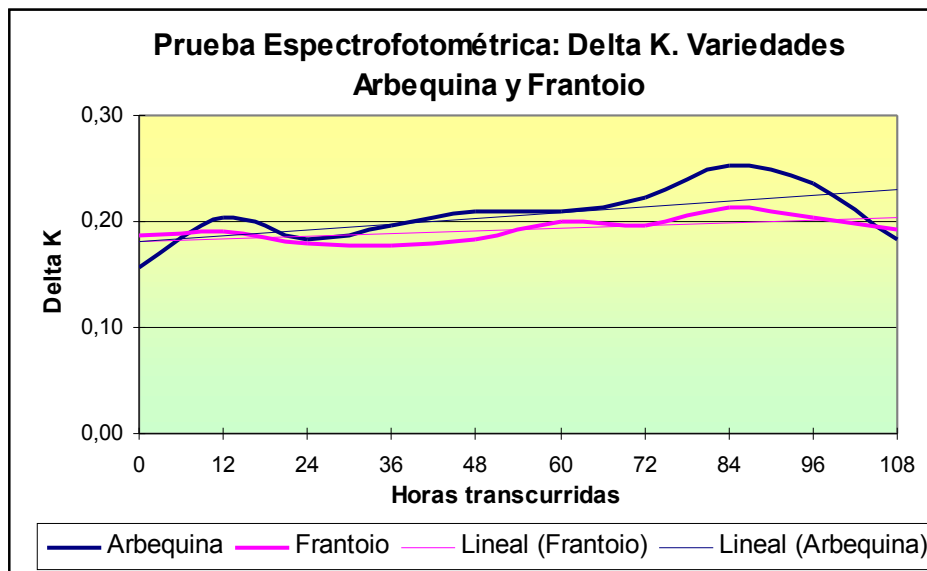


En los aceites estudiados el incremento en estos parámetros es evidente, con una tendencia al alza en los tres. La mayor variación se experimenta en la prueba del  $\Delta K$  dejando a ambos aceites en la clasificación de lampantes. Como ya se mencionó durante la formación de radicales peroxidados e hidroperóxidos, tiene lugar un cambio en la configuración de los dobles enlaces, transformándose la configuración normal metileno-interrumpida en sus

formas conjugadas. Los dienos conjugados muestran una absorción a 232 nm y los trienos a 270 nm. (Noor y Agustín 1984). Se puede observar claramente en las figuras 3 y 4 como estos se incrementan paulatinamente con las horas transcurridas, siendo los valores más altos en la variedad Arbequina que la Frantoio.

Los ácidos grasos poliinsaturados son sensibles a las oxidaciones autocatalíticas, induciendo la extensión de este proceso a otros ácidos grasos. En primer lugar aparecen hidroxiperóxidos poco estables, que absorben cerca de una longitud de onda de 232 nm (Figura 4), a continuación son las diacetonas y las cetonas alfa- insaturadas que absorben cerca de los 270 nm. (Figura 5). También puede formarse otras funciones oxigenadas, hidroxilos y carbolilos, que incrementan la absorbancia de la radiación UV entre 260 y 280, con un máximo alrededor de 270 nm. ( $\Delta K$ , figura N° 5). El coeficiente de extinción específica aumentará conforme la alteración oxidativa sea mayor, hasta fases muy avanzadas. (Jamett y Col. 2007).

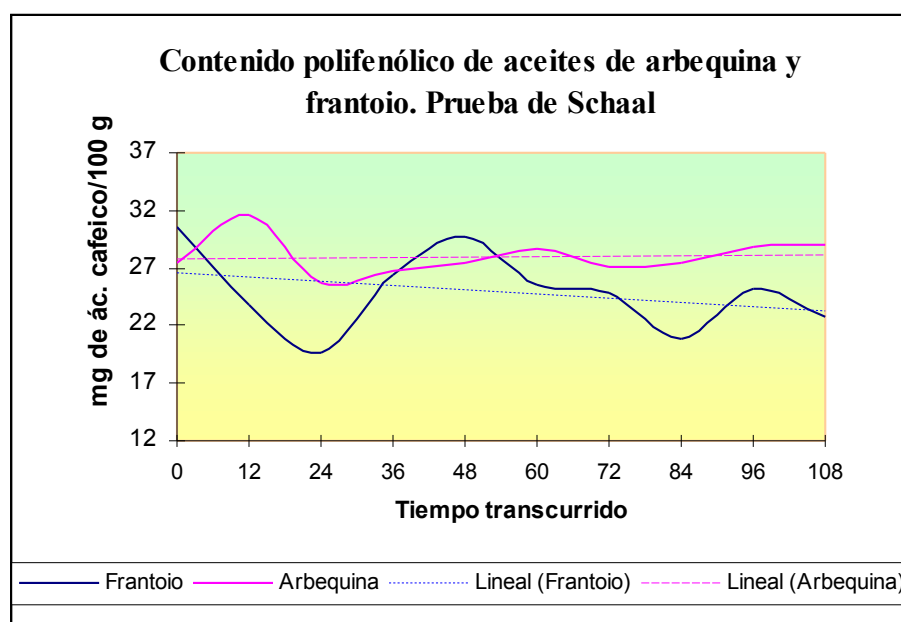
Figura N° 5



Es necesario mencionar que si bien en los dos primeros parámetros los aceites inicialmente cumplieron con la categoría, de extravirgen o virgen (referencia cero), en el parámetro Delta K para ambas variedades superaron el valor exigido por el reglamento de ser menor a 0,01.

Con este valor ambos aceites no deberían estar a la venta pues pertenecen a la categoría de lampante con un deterioro avanzado de los mismos. Sin duda debido a esta situación es que el contenido de polifenoles en ambos aceites inicial fue tan bajo, ya que prácticamente se estaban agotando desde la fecha que el aceite fue obtenido y envasado. Así y todo en la Figura 6 se puede observar como estos participan en el proceso de prevenir la oxidación, disminuyendo muy tenuemente frente a los tratamientos seleccionados, encontrando aun polifenoles al finalizar la actividad. 108 horas equivalentes a 5 meses a temperatura ambiente.

Figura N°: 6



La separación de los polifenoles de las muestras originales, sin alterar otros compuestos antioxidantes ha permitido estimar la contribución de los polifenoles en la estabilidad oxidativa del aceite de oliva virgen, siendo ésta del 50%.

Para poder establecer de una manera más clara el comportamiento de los mismos es necesario trabajar sobre aceites frescos recién extraídos de almazara y estudiar además la influencia de los tocoferoles, antioxidantes que también se encuentran en los aceites de oliva. Ya que durante el periodo de inducción, los polifenoles, tocoferoles y pigmentos sufren las más importantes alteraciones. Otros compuestos tales como ácidos grasos y volátiles, sufren modificaciones significativas solamente durante la fase rápida o exponencial de la oxidación mientras los antioxidantes naturales alcanzan los valores mínimos. Situación que se ve reflejada en el delta K obtenido en los aceites y en el contenido de polifenoles, que continuaron con un deterioro mínimo.

Sería importante además estimar los cambios en los ácidos grasos durante la oxidación ya que éstos difieren entre variedades y en menor o mayor grado son afectados por los procesos oxidativos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante la Prueba de Schaal muestran que transcurridos las 12 primeras horas de tratamiento (T 60°C), los parámetros que presenta mayor variación son el índice de peróxido y la prueba espectrofotométrica. Esta última notoriamente en el  $\Delta K$ , pasando el aceite de la calidad virgen a lampante. El contenido de polifenoles totales encontrado fue muy bajo, para la categoría de aceites etiquetados Extra Virgen al inicio de la prueba, lo que indicaba un consumo significativo de éstos en los aceites desde el inicio del envasado hasta el momento de su adquisición para los ensayos, no presentando una variación significativa durante la aplicación del test lo que demuestra una gran resistencia de éstos al proceso de oxidación aplicado. El índice de acidez si bien fue variando paulatinamente durante todo el proceso, no superó el valor de 0,8 para un aceite de oliva virgen.

Estos resultados demuestran que los procesos de iniciación de la oxidación más importantes son la descomposición de hidroperóxidos, que son productos primarios muy inestables que, por descomposición, forman productos secundarios (incremento del  $\Delta K$ ), los que una vez formados facilitan las reacciones de propagación, catalizados por la presencia de oxígeno, luz y temperatura.

La presencia de antioxidantes en el aceite retardarían estos procesos si superan la concentración de polifenoles por sobre los 20 pp expresados como ácido cafeico.

Para establecer relaciones más concretas entre el contenido de antioxidantes presentes en el aceite de oliva y su estabilidad, se sugiere pruebas ampliadas que consideren, además de los polifenoles, el contenido de carotenoides y tocoferoles junto con el seguimiento del perfil de ácidos grasos. Dentro del diseño incluir, además diferencias en la cantidad de aceite al almacenar, el tamaño de los depósitos de almacenamiento y la proporción entre la superficie del aceite y su volumen frente a la aplicación del Test. Serían también importante incluir en los ensayos la exposición de los aceites a la luz para evaluar el efecto de la fotooxidación en la estabilidad oxidativa del aceite de oliva.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angerosa F y col. 1995. "GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgen olive oil". *J Agric Food Chem*, 43, pp. 1802-1807.
2. Angerosa F y col. 1996. "Characterization of phenolic and secoiridoid aglycones present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry". *J. Chromatogr A*, 736, pp. 195-203.
3. Aparicio R. y Harwood J, 2003. Manual del aceite de oliva. Primera edición AMV Ediciones y Mundi prensa . Madrid. España. Cap.7. pp 91-193.
4. Baldioli y col. 1996. "Antioxidant activity of tocopheroles and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. oil. Chem Soc.* 73, pp. 1589-1593.
5. Beltran y col. 2004. Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgin de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad oxidative. *Grasas y Aceites.* 51, pp. 320-324.
6. Bouskou, D. 1998. "Química y tecnología del aceite de oliva". Mundi-prensa. AMV Ediciones. Primera Edición. Madrid. España, pp. 119-132
7. Cantarelli, C. 1961. "Polyphenols in the fruit and in olive oil". *Riv Ital sostanze grasse*, 38, pp 69-72.
8. Cimato y col., 1991. La caratterizzazione dell' olio extravirgine típico toscano. Consorzio Regionale Olivo extra virgine di Oliva Típico Toscano. En Barranco D., Fernández – Escobar R y Rallo L. 1999. *El Cultivo del Olivo*, Tercera Edición. Cap. 18. pp 580-582.
9. Cortesi, N., Azzolini, M. y Rovellini, P. 1995. "Dosaggio dei componenti minori polari (CMP) in oli vergini di oliva". *Riv Ital Sustance Grasse.* N° 72, pp 333-337.
10. De Man, J.M., Tie, F. y De Man , L., 1987. "Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method". *J Am Oli Chem Soc*, 64, pp. 993-995
11. Eskin, N. A. M. y Vaisey-Genser, M., 1989. "Applications for genetically modified oils". *J. Am Oil Chem Soc.* N° 66, pp-1058-1063.
12. Evans, C.D., et al. 1973. Long term storage of soybean and cottonseed saladoils". *J Am Oil Chem Soc*, N° 50, pp. 218-220.
13. Frankel, 1980. "Lipid oxidation". *Prog. Lipid. Res* 19. pp 1-22

14. Frankel, E. N. 1993. "In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids". *Trends Food Sci Technol.* N° 4, pp 220-223.
15. Gardner, H. W. 1987. "Reactions of hydroperoxides- products of high molecular weight" In *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Edited by H.W.-S. Chan. London: Academic Press, pp 57.
16. Gutiérrez y Col., 1992. "Action of chlorophylls on the stability of virgen olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* N° 69, pp 866.
17. Heath, H.B. y Reineccius, G. A., 1986. "Flavor Chemistry and Technology, Westport, CT: AVI Publishing Co., pp 112-141.
18. Jamett F., A. Benavides, H. Troncoso y M. Astorga. 2007. caracterizacion de aceites de oliva en zonas de la región de Coquimbo. 68 p. Boletín INIA N° 161. Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA), Intihuasi. La Serena, Chile
19. Kiritsakis A.K. 1992. *El Aceite de Oliva*. Ed. Madrid.
20. Montedoro, G, Bertuccioli, M. y Anichini, F. 1978. "aroma analysis of virgin olive oil by head space (volatiles) and extraction (polyphenols) Techniques". In *flavor of foods and Beverages*. Pp 247- 281. Edited by G. Charalambous y G. E. Inglett New York: Academic Press.
21. Montedoro, G. et al. 1992 a. "Simple and hidrolizable phenolic compounds in virgen olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* N° 40, pp 1571 -1576.
22. Noor, N y Augustin, M.A. 1984. "Effectivenees of antioxidants on the stability of banana chips". *J. Sci Food Agric.* 35, pp. 805-808.
23. Reglamento (CE) n° 1989 / 2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003, que modifica el Reglamento (CEE) n° 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 (DOCE n° L295 de 13.11.03).
24. Romero, A.; J Tous; L Guerrero. 1999. «El Análisis Sensorial Del Aceite De Oliva Virgen», En: Sancho, J.; Bota, E.; Castro, J.J. (Eds.): *Introducción Al Análisis Sensorial De Los Alimentos*, Edicions Universitat De Barcelona, P. 183-198.
25. Rossel, J. B., 1987. "Measurement of rancidity in foods. Edited by J. C. Allen y R. J. Hamilton. London: Applied Science Publishers, pp 21-45.

26. Sanders, T. A. B. 1983. "Nutritional significance of rancidity" in Rancidity in Foods, edited by J.C. Allen y R. J. Hamilton. London: Applied Science Publishers. Pp 59-66.
27. Shahidi, F., Janitha, P. K. y Wanasundara, P.D. 1992. "Phenolic Antioxidants". Crit Rev Food Sci Nutr, 32 pp 67-103.
28. Solinas M, Giovocchino L, and Mascolo A.1978. "I polifenoli delle olive e dell' olio d' oliva. Nota III. Influenza Della temperatura e Della durata Della gramolatura sul contenimento in polifenoli degli oli". Riv Ital Sostanze Grasse. N° 55, pp19-23.
29. Solinas, M. y Cichelli, A. 1981. "Sulla determinazione delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva". Riv Soc Ital Sci Aliment. N° 10, pp 159-164.
30. Troncoso y Col. 2006. Guia experta de Aceite de Oliva, INIA – ULS. En digital Cd poket.
31. Tsimidou, M., Papadopoulos, G. y Boskou, D. 1992. "Analisi HRGC delle sostanze fenoliche di oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione e alla varietà delle olive". Food Chem, 44, pp 53-60
32. Uceda M. and Hermoso. 1999. La calidad del aceite de oliva. El cultivo del olivo. Mundi-Prensa. Tercera Edición. Madrid, España, 701 p.
33. Vázquez A.; Janer del Valle, C.; Janes del Valle, M.L. 1976. "Componentes fenólicos de la aceituna III. Polifenoles del aceite de oliva. Grasas y Aceites". 27, pp. 185-191
34. Vercellotti, J. R., St. Angelo, A. J. y Spainer, A. M. 1992. "Lipid Oxidation in food: an overview. In Lipid Oxidation in Foods, edited by A.J. St. Angelo. Washington, DC: American Chemical Society, pp- 1-11.
35. Viola Publio, 2004. El Aceite de Oliva y la salud. Publicaciones del Consejo Oleícola Internacional. Madrid.
36. Warner, K., Frankel, E. N. y Mounts, T. L. , 1989. "Flavor and oxidative stability of soybean, sunflower and low erúxico rapeseed oils". J Am Oil Chem Soc. N° 66, pp 558-562.



## ANEXOS TABLAS

**Tabla N° 3 : Valores de índice de Peróxidos medidos en los aceites de oliva para ambas variedades, aplicado el test de Schaal.**

T	Réplica	Meq O <sub>2</sub> / Kg de aceite	
		Arbequina	Frantoio
0	R <sub>1</sub>	19.43	19.72
0	R <sub>2</sub>	17.88	20.00
0	R <sub>3</sub>	24.37	20.00
12	R <sub>1</sub>	27.25	24.42
12	R <sub>2</sub>	21.51	23.83
12	R <sub>3</sub>	22.41	24.85
24	R <sub>1</sub>	24.81	22.06
24	R <sub>2</sub>	19.71	22.24
24	R <sub>3</sub>	16.43	23.56
36	R <sub>1</sub>	20.75	24.90
36	R <sub>2</sub>	24.40	23.24
36	R <sub>3</sub>	24.30	23.24
48	R <sub>1</sub>	19.22	28.02
48	R <sub>2</sub>	20.50	26.29
48	R <sub>3</sub>	20.69	26.54
60	R <sub>1</sub>	17.22	15.83
60	R <sub>2</sub>	19.91	15.05
60	R <sub>3</sub>	17.38	14.68
72	R <sub>1</sub>	19.07	17.16
72	R <sub>2</sub>	19.07	15.98
72	R <sub>3</sub>	13.86	17.68
84	R <sub>1</sub>	19.41	17.45
84	R <sub>2</sub>	19.41	18.64
84	R <sub>3</sub>	13.27	18.12
96	R <sub>1</sub>	12.06	18.98
96	R <sub>2</sub>	11.13	17.02
96	R <sub>3</sub>	11.44	21.04
108	R <sub>1</sub>	11.44	19.91
108	R <sub>2</sub>	11.14	21.13
108	R <sub>3</sub>	11.21	20.60

**Tabla N° 4: Valores de índice de Acidez medidos en los aceites de oliva para ambas variedades, aplicado el test de Schaal.**

T	Réplica	% de ácido oleico	
		Arbequina	Frantoio
0	R <sub>1</sub>	0.13	0.37
0	R <sub>2</sub>	0.13	0.35
0	R <sub>3</sub>	0.13	0.35
12	R <sub>1</sub>	0.12	0.36
12	R <sub>2</sub>	0.12	0.35
12	R <sub>3</sub>	0.13	0.36
24	R <sub>1</sub>	0.14	0.35
24	R <sub>2</sub>	0.13	0.35
24	R <sub>3</sub>	0.13	0.35
36	R <sub>1</sub>	0.14	0.35
36	R <sub>2</sub>	0.14	0.35
36	R <sub>3</sub>	0.13	0.36
48	R <sub>1</sub>	0.14	0.37
48	R <sub>2</sub>	0.13	0.37
48	R <sub>3</sub>	0.13	0.37
60	R <sub>1</sub>	0.13	0.36
60	R <sub>2</sub>	0.13	0.35
60	R <sub>3</sub>	0.13	0.34
72	R <sub>1</sub>	0.13	0.36
72	R <sub>2</sub>	0.12	0.36
72	R <sub>3</sub>	0.13	0.36
84	R <sub>1</sub>	0.13	0.36
84	R <sub>2</sub>	0.12	0.34
84	R <sub>3</sub>	0.13	0.35
96	R <sub>1</sub>	0.13	0.34
96	R <sub>2</sub>	0.13	0.35
96	R <sub>3</sub>	0.14	0.35
108	R <sub>1</sub>	0.13	0.36
108	R <sub>2</sub>	0.15	0.35
108	R <sub>3</sub>	0.16	0.35

**Tabla N° 5 : Resultados prueba espectrofotométrica medidos en los aceites de oliva para la variedad Arbequina, aplicado el test de Schaal.**

<b>Horas</b>	<b>K232</b>	<b>K266</b>	<b>K270</b>	<b>K274</b>	<b>ΔK</b>
0	1,56	0,17	0,16	0,15	0,16
0	1,57	0,16	0,15	0,15	0,16
0	1,6	0,16	0,15	0,14	0,15
12	1,61	0,17	0,16	0,15	0,16
12	1,68	0,22	0,21	0,21	0,22
12	1,64	0,23	0,22	0,22	0,23
24	1,63	0,19	0,18	0,17	0,18
24	1,49	0,18	0,17	0,16	0,17
24	1,63	0,21	0,2	0,2	0,2
36	1,65	0,19	0,18	0,18	0,19
36	1,88	0,22	0,21	0,2	0,21
36	1,59	0,19	0,18	0,18	0,19
48	1,65	0,19	0,18	0,17	0,18
48	1,71	0,22	0,21	0,2	0,21
48	1,74	0,24	0,23	0,23	0,24
60	1,94	0,19	0,18	0,17	0,18
60	1,64	0,22	0,22	0,21	0,22
60	1,68	0,24	0,23	0,22	0,23
72	1,99	0,25	0,24	0,23	0,24
72	1,7	0,24	0,23	0,22	0,23
72	1,64	0,2	0,19	0,19	0,2
84	1,82	0,28	0,27	0,26	0,27
84	1,77	0,23	0,22	0,22	0,23
84	1,75	0,27	0,26	0,25	0,26
96	1,83	0,27	0,26	0,25	0,26
96	1,74	0,25	0,25	0,24	0,25
96	1,66	0,21	0,2	0,19	0,2
108	1,64	0,18	0,17	0,16	0,17
108	1,72	0,19	0,18	0,17	0,18
108	1,71	0,2	0,19	0,19	0,2

**Tabla N° 6 : Resultados prueba espectrofotométrica medidos en los aceites de oliva para la variedad Frantorio , aplicado el test de Schaal.**

n° M

<b>K232</b>	<b>K266</b>	<b>K270</b>	<b>K274</b>	<b>ΔK</b>	
0	1,53	0,19	0,18	0,18	0,19
0	1,71	0,17	0,17	0,16	0,17
0	1,53	0,2	0,2	0,19	0,2
12	1,56	0,19	0,19	0,18	0,19
12	1,56	0,2	0,19	0,19	0,2
12	1,52	0,18	0,17	0,17	0,18
24	1,53	0,17	0,17	0,16	0,17
24	1,59	0,19	0,19	0,18	0,19
24	1,53	0,18	0,17	0,17	0,18
36	1,54	0,16	0,16	0,15	0,16
36	1,58	0,17	0,16	0,16	0,17
36	1,58	0,2	0,19	0,19	0,2
48	1,6	0,2	0,19	0,19	0,2
48	1,58	0,19	0,19	0,18	0,19
48	1,56	0,15	0,15	0,14	0,15
60	1,56	0,16	0,15	0,15	0,16
60	1,62	0,22	0,22	0,21	0,22
60	1,62	0,22	0,22	0,21	0,22
72	1,66	0,23	0,22	0,22	0,23
72	1,6	0,18	0,17	0,17	0,18
72	1,6	0,18	0,17	0,17	0,18
84	1,71	0,23	0,22	0,21	0,22
84	1,67	0,21	0,21	0,2	0,21
84	1,68	0,21	0,21	0,2	0,21
96	1,61	0,19	0,19	0,18	0,19
96	1,65	0,22	0,22	0,21	0,22
96	1,63	0,21	0,2	0,19	0,2
108	1,69	0,2	0,19	0,18	0,19
108	1,59	0,17	0,17	0,16	0,17
108	1,75	0,22	0,22	0,21	0,22

**Tabla N° 7 : Resultados polifenoles totales medidos en los aceites de oliva para la variedad Frantoio y Arbequina , aplicado el test de Schaal.**

Prueba de estabilidad	Polifenoles Totales	
	(valores promedio 3 réplicas)	
	Mg de ác. Cafeico / Kg de aceite	
Horas transcurridas	Variedad Frantoio	Variedad Arbequina
0	31	27
12	24	32
24	20	26
36	26	27
48	30	27
60	26	29
72	25	27
84	21	27
96	25	29
108	23	29