



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



ESTUDIOS DE MIGRACIÓN EN ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA ENVASADOS EN PET

**PRESENTADA POR:
ALFREDO ESCUDERO PÉREZ**

**DIRIGIDA POR:
Dra. NATIVIDAD RAMOS MARTOS
Dra. M^a DOLORES LA RUBIA GARCÍA
Dr. RAFAEL PACHECO REYES**

JAÉN, julio de 2019

ISBN



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Dña. MARÍA DOLORES LA RUBIA GARCÍA, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales, miembro del Grupo de Investigación Bioprocesos (TEP-138) de la Universidad de Jaén y Tutora de **D. ALFREDO ESCUDERO PÉREZ**.

INFORMA:

Que el trabajo recogido en la presente Memoria, titulado: ***Estudios de migración en aceites de oliva virgen extra envasados en PET***, ha sido realizado por D. Alfredo Escudero Pérez, en los laboratorios de los Departamentos de Química Física y Analítica, y de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. Dña. Natividad Ramos Martos, D. Rafael Pacheco Reyes y Dña. M^a Dolores La Rubia García, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén.

Jaén, julio de 2019

Fdo.: Natividad Ramos Martos Fdo.: M^a Dolores La Rubia García Fdo.: Rafael Pacheco Reyes

Memoria de Tesis presentada por D. Alfredo Escudero Pérez, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén.

Jaén, julio de 2019

Fdo.: Alfredo Escudero Pérez

Quiero expresar mi entera gratitud a los Doctores Dña. Natividad Ramos Martos, Dña. María Dolores La Rubia García y D. Rafael Pacheco Reyes; quienes, siendo mis Directores de Tesis -con lo que ello implica en cuanto a aportación desinteresada de experiencia, guía y maestría, que todos atesoran- me han enseñado cómo la pretensión de alcanzar la excelencia en el trabajo, en el estudio y en la investigación se puede completar y enriquecer con el cultivo del compañerismo y de la amistad.

Gracias Nati, Rafa, Dores..., por haber confiado en mí y por ayudarme a que este trabajo, aun con todos los contratiempos que han ido jalonando su devenir, se haya hecho posible, se haya publicado. Gracias por no haberme hecho sentir solo, en todos estos años de odisea. Gracias.

Agradecimiento formal, al grupo de investigación "Bioprocesos" (TEP-138). Y a todos los que de algún modo me han ayudado en los rutinarios días de laboratorio, de ensayos y análisis.

*A Julia y a Guillermo, mis hijos.
A mi compañera de tantas aventuras, Begoña.
A ellos, a los que tantas horas debo.*

Y a mi abuelo, Pascasio Pérez, en el recuerdo.

I. ÍNDICES

I.I ÍNDICE GENERAL.....	V
I.II. ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
I.III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
I.IV. ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XXI

I.I. ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1. OLIVAR, ACEITUNAS Y ACEITE.....	11
2.1.1. Cultivo del olivo.....	11
2.1.1.1. Prácticas culturales	12
2.1.2. Variedades de aceituna. Zonificación	15
2.1.2.1. Características	16
2.1.2.2. Zonas de la España olivarera	22
2.1.3. Aceites de oliva	24
2.1.3.1. Sin transformación industrial	24
2.1.3.2. Con transformación industrial	25
2.1.4. Composición química de los aceites de oliva.....	26
2.1.4.1. Fracción saponificable o mayoritaria	26
2.1.4.2. Fracción insaponificable o minoritaria	28
2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA.....	35
2.2.1. Sistemas de autocontrol	39
2.2.1.1. Aspectos generales.....	40
2.2.2. Planes generales de higiene	41
2.2.2.1. Plan general de higiene tipo de una almazara.....	41
2.2.3. Plan de trazabilidad	42
2.2.4. Plan de análisis de peligros y puntos críticos de control	46
2.2.4.1. Siete principios de obligado cumplimiento en el APPCC.....	47
2.2.5. Implantación del sistema APPCC en una almazara.....	49
2.2.6. Buenas prácticas de elaboración del aceite de oliva virgen	53
2.3. CONTROL DE CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	59
2.3.1. Criterios de calidad y pureza	59
2.3.1.1. Parámetros de calidad	59
2.3.1.2. Parámetros de pureza.....	63
2.3.2. Organismos reguladores del aceite de oliva virgen	70
2.3.3. Legislación de los aceites vegetales comestibles	75
3. PRESENCIA DE METALES TRAZA EN ALIMENTOS. INTERACCIÓN ENVASE-ALIMENTO ..	81
3.1. CONTAMINANTES QUÍMICOS EN ALIMENTOS	85
3.1.1. Metales presentes en alimentos.....	86
3.1.2. Toxicidad	89
3.2. CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR INTERACCIÓN CON EL ENVASE.....	95
3.2.1. Envasado de alimentos y tipos de materiales de envasado.....	95
3.2.2. El polietiléntereftalato como envase de alimentos.....	101
3.2.2.1. Estructura del PET.....	103
3.2.2.2. Catalizadores más comunes en la fabricación del PET	107
3.2.2.3. Aditivos más comunes en la fabricación del PET	108
3.2.3. Procesos de interacción PET-alimentos. La migración en alimentos envasados	111
3.2.3.1. Procesos de interacción PET-alimento	112
3.2.3.2. Migración en alimentos envasados en PET	113
3.3. LEGISLACIÓN	117
3.3.1. Legislación de metales pesados	117
3.3.2. Legislación de materiales en contacto con alimentos y migración.....	120
3.4. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN ALIMENTOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	125

4.- OBJETIVOS	141
5.- PARTE EXPERIMENTAL	145
5.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	149
5.1.1. Materiales	149
5.1.2. Reactivos.....	149
5.2. EQUIPOS.....	151
5.2.1. Estufas, congeladores y otros.....	151
5.2.2. Digestor asistido por microondas	152
5.2.3. Espectrofotómetro de absorción de UV-V.....	153
5.2.4. Espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier	154
5.2.5. Cromatógrafo de gases.....	155
5.2.6. Cromatógrafo de líquidos (HPLC)	156
5.2.7. Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inducido	157
5.3. MUESTRAS Y TRATAMIENTOS. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS	159
5.3.1. Muestras	159
5.3.2. Tratamientos	160
5.3.2.1. Tipo de tratamientos.....	160
5.3.2.2. Digestión de aceites y de envases de polietilentereftalato (PET)	161
5.3.3. Codificación de muestras	162
5.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	165
5.4.1. Medida de la calidad y pureza.....	165
5.4.1.1. Propiedades físico-químicas	165
5.4.1.2. Análisis sensorial	167
5.4.1.3. Ácidos grasos.....	171
5.4.2. Componentes minoritarios.....	172
5.4.2.1. Pigmentos.....	173
5.4.2.2. Polifenoles	173
5.4.2.3. α -Tocoferoles.....	174
5.4.3. Análisis estadístico	175
5.4.4. Determinación de Sb en los AOVE y en los envases PET. Determinación de trazas de otros tóxicos (As, Cd, Pb).....	175
5.4.4.1. Condiciones para el análisis por ICP-MS	176
5.4.5. Análisis del polietilentereftalato	176

6.- RESULTADOS	179
6.1. DEGRADACIÓN DEL PET	183
6.1.1. Muestras de PET sometidas a degradación térmica	186
6.1.2. Fotodegradación	199
6.2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD Y COMPONENTES MINORITARIOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA, EN CONDICIONES EXTREMAS DE ALMACENAMIENTO	205
6.2.1. Parámetros de calidad	205
6.2.1.1. Grado de acidez	206
6.2.1.2. Índice de peróxidos	207
6.2.1.3. Valores de los coeficientes de extinción K_{232} y K_{268}	209
6.2.2. Análisis sensorial	211
6.2.3. Perfil de ácidos grasos	216
6.2.4. Componentes minoritarios	218
6.2.5. Análisis estadístico. Influencia del tiempo y la temperatura	221
6.3. CONTAMINANTES Y METALES TRAZA	223
6.3.1. Calibración y parámetros analíticos	223
6.3.1.1. Rango dinámico lineal (RDL)	223
6.3.1.2. Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método	223
6.3.1.3. Precisión del método	225
6.3.1.4. Exactitud del método	226
6.3.2. Análisis de antimonio	227
6.3.2.1. Efecto del almacenamiento prolongado	227
6.3.2.2. Efecto de los tratamientos Temperatura-tiempo sobre la migración del Sb	230
6.3.2.3. Efecto de la exposición solar en la migración del Sb	236
6.3.2.4. Comparación con migración de Sb en otros alimentos	238
6.3.3. Análisis de As, Cd y Pb	241
6.3.3.1. Análisis del arsénico	242
6.3.3.2. Análisis del cadmio	243
6.3.3.3. Análisis del plomo	244
7.- CONCLUSIONES	251
8.- BIBLIOGRAFÍA	257
9.- CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS	283
9.1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS	285
9.2. CONTRIBUCIÓN A CONGRESOS	299

ANEXOS DE TABLAS Y FIGURAS	349
1. ANEXO DE TABLAS	351
2. ANEXO DE FIGURAS	359
ANEXO 2.1. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL GRADO DE ACIDEZ.....	361
ANEXO 2.2. FIGURAS DEL ESTUDIO DE PERÓXIDOS.....	363
ANEXO 2.3. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN K_{232}	365
ANEXO 2.4. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN K_{268}	367
ANEXO 2.5. FIGURAS DEL ESTUDIO DE ÁCIDOS GRASOS.....	369
ANEXO 2.6. FIGURAS DEL ESTUDIO DE COMPONENTES MINORITARIOS.....	371
Anexo 2.6.1. Fenoles.....	371
Anexo 2.6.2. Pigmentos (clorofilas, carotenoides).....	372
Anexo 2.6.3. α -Tocoferoles.....	376

I.II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Variedades de aceitunas de producción de aceite en España	14
Tabla 2.2. Diagrama de un árbol de decisiones	50
Tabla 2.3. Cuadro de gestión del envasado	52
Tabla 2.4. Parámetros de calidad y pureza de aceites de oliva vigentes. Anexo 1, DOUE nº 338 (17/12/13)	67
Tabla 2.5. Legislación sobre aceites vegetales vigente en España	77
Tabla 3.1. Elementos minerales en la tabla periódica.....	87
Tabla 3.2. Datos técnicos del PET.....	102
Tabla 3.3. Tipos de Xileno, según ebullición y solidificación	103
Tabla 3.4. Grupos de aditivos y sus características.....	109
Tabla 3.5. Legislación sobre metales pesados aplicable en España.....	118
Tabla 3.6. Límites máximos de residuos (LMR) en aceites vegetales y agua.....	119
Tabla 3.7. Límites máximos de residuos (LMR) en aceites de oliva	120
Tabla 3.8. Legislación sobre materiales en contacto con alimentos	121
Tabla 3.9. Trabajos sobre presencia de metales traza y antimonio en alimentos sin tratamiento térmico.	130
Tabla 3.10. Trabajos sobre presencia de metales traza y antimonio en alimentos con tratamiento térmico	135
Tabla 5.1. Muestras según variedades	159
Tabla 5.2. Programa para la digestión de los aceites de oliva virgen.....	162
Tabla 5.3. Códigos de las muestras analizadas	164
Tabla 6.1. Picos identificados para el PET de la muestra Testigo A.....	186
Tabla 6.2. Parámetros de calidad.....	206
Tabla 6.3. Ácidos grasos.....	217
Tabla 6.4. Componentes minoritarios	218
Tabla 6.5. Análisis de varianza (ANOVA).....	221
Tabla 6.6. Rango dinámico lineal del método.....	223
Tabla 6.7. Límites de detección y cuantificación	225
Tabla 6.8. Precisión del método para la determinación de metales mediante ICP-MS.....	226
Tabla 6.9. Estudio de recuperación del método.....	226
Tabla 6.10. Incremento de migración de Sb por aceites entre Testigo y Almacén	228
Tabla 6.11. Incremento de migración de Sb por variedades entre Testigo y Almacén.....	229
Tabla 6.12. Incremento de migración de Sb por variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 40°C).....	233

Tabla 6.13. Incremento de migración de Sb por variedades (diferentes tiempos y Exposición térmica de 60°C).....	234
Tabla 6.14. Incremento de migración de Sb por variedades (40 y 60°C, durante 2 semanas).....	235
Tabla 6.15. Incremento de migración de Sb por variedades (40 y 60°C, durante 3 semanas).....	236
Tabla 6.16. Incremento de migración de Sb por variedades (exposiciones a luz solar)	238
Tabla 6.17. Almacenamiento a temperatura ambiente. Incremento de migración de Sb.....	239
Tabla 1. Presencia de antimonio en el aceite de oliva, en $\mu\text{g/kg}$, expresado como valor medio $\pm$ desviación típica.....	353
Tabla 2. Presencia de metales pesados en el aceite de oliva, en $\mu\text{g/kg}$ expresado como valor medio $\pm$ desviación típica.....	355
Tabla 3. Parámetros de calidad y componentes minoritarios del AOVE (resultados expresados como valor medio $\pm$ desviación típica)	356
Tabla 4. Ácidos grasos en el AOVE (resultados en % expresados como valor medio $\pm$ desviación típica)	357
Tabla 5. Análisis sensorial. Defectos y virtudes de los aceites de oliva B, C, E y H	358

I.III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Diferentes marcos de plantación de olivar	14
Figura 2.2. Detalle de las diferentes variedades de aceitunas consideradas.....	21
Figura 2.3. Mapa de España de las regiones olivareras	22
Figura 2.4. Estructura de los triglicéridos.....	27
Figura 2.5. Estructuras de hidrocarburos terpénicos	29
Figura 2.6. Estructura de α -tocoferol	30
Figura 2.7. Estructura de las clorofilas	32
Figura 2.8. Estructura de la luteína, carotenoide principal.....	33
Figura 2.9. Estructuras básicas de distintos compuestos fenólicos	34
Figura 2.10. Diagrama de flujo de la producción de AOVE (Sistema de dos fases).....	53
Figura 2.11. Centrifugadoras verticales	56
Figura 3.1. Símbolo comercial con el significado de “Hecho en PET”	103
Figura 3.2. Reacción del etilenglicol	104
Figura 3.3. Proceso de esterificación	104
Figura 3.4. Esquema de esterificación y policondensación del PET	105
Figura 3.5. Estructura de la polimerización por esterificación directa	106
Figura 3.6. Granulado PET	106
Figura 3.7. Esquema de las interacciones envase-alimento	113
Figura 3.8. Límites de detección típicos para las principales técnicas espectroscópicas.....	126
Figura 3.9. Intervalos de trabajo analítico para las técnicas espectroscópicas atómicas	126
Figura 3.10. Coste de los instrumentos de Espectroscopía Atómica	127
Figura 3.11. Porcentaje de distintas técnicas analíticas de determinación de metales en alimentos (2009-2019)	128
Figura 3.12. Porcentaje de las diferentes técnicas analíticas reflejadas en el estudio de antecedentes ...	138
Figura 3.13. Porcentaje de los alimentos en los que se determina antimonio, (2009 - 2019)	139
Figura 5.1. Congelador de -86°C.....	152
Figura 5.2. Digestor por microondas	153
Figura 5.3. Espectrofotómetro UV-V.....	154
Figura 5.4. Espectrómetro FT-IR. Unidad IR y Raman / UV-visible	155
Figura 5.5. Cromatógrafo de gases.....	156
Figura 5.6. Cromatógrafo de líquidos.....	157
Figura 5.7. Espectrómetro ICP-MS.....	158

Figura 6.28. Evolución del antimonio según variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 40°C)	232
Figura 6.29. Evolución del antimonio según variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 60°C)	233
Figura 6.30. Migración del antimonio según variedades (40 y 60°C, durante 2 semanas)	234
Figura 6.31. Migración del antimonio según variedades (40 y 60°C, durante 3 semanas)	235
Figura 6.32. Migración del antimonio según variedades y exposición a luz solar	237
Figura 6.33. Índices de carbonilo del PET y Sb en el aceite, expuestos a la luz solar	238
Figura 6.34. Concentraciones de As en Testigo y Almacén.....	242
Figura 6.35. Valores medios de las concentraciones de As para Testigo y Almacén	243
Figura 6.36. Concentraciones de Cd en Testigo y Almacén.....	243
Figura 6.37. Valores medios de las concentraciones de Cd para Testigo y Almacén	244
Figura 6.38. Concentraciones de Pb en Testigo y Almacén	245
Figura 6.39. Valores medios de las concentraciones de Pb para Testigo y Almacén	245
Figura 6.40. Intervalos de concentración de metales pesados (As, Cd y Pb) detectados en los trabajos consultados, frente a los LMR de UE y Codex Alimentarius...	247
Figura 1. Comparativa para el grado de acidez en Testigos, sin tratamiento térmico	361
Figura 2. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 40°C durante 2 semanas	361
Figura 3. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 40°C durante 3 semanas	361
Figura 4. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 60°C durante 2 semanas.....	362
Figura 5. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 60°C durante 3 semanas.....	362
Figura 6. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico.....	363
Figura 7. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas.....	363
Figura 8. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas.....	363
Figura 9. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas.....	364
Figura 10. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas.....	364
Figura 11. Gráfica comparativa de los K_{232} en Testigos, sin tratamiento térmico.....	365
Figura 12. Comparativa de los K_{232} en estufa a 40° durante 2 semanas	365
Figura 13. Comparativa de los K_{232} en estufa a 40° durante 3 semanas.....	365
Figura 14. Comparativa de los K_{232} en estufa a 60° durante 2 semanas.....	366
Figura 15. Comparativa de los K_{232} en estufa a 60° durante 3 semanas.....	366
Figura 16. Comparativa de los K_{268} en Testigos, sin tratamiento térmico	367
Figura 17. Comparativa de los K_{268} en estufa a 40° durante 2 semanas	367

Figura 18. Comparativa de los K_{268} en estufa a 40° durante 3 semanas	367
Figura 19 Gráfica comparativa de los K_{268} en estufa a 60° durante 2 semanas	368
Figura 20. Gráfica comparativa de los K_{268} en estufa a 60° durante 3 semanas	368
Figura 21. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE B	369
Figura 22. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE C	369
Figura 23. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE E	370
Figura 24. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE H	370
Figura 25. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico	371
Figura 26. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 40°C y 2 semana	371
Figura 27. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 40°C y 3 semanas	371
Figura 28. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 60°C y 2 semanas	372
Figura 29. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 60°C y 3 semanas	372
Figura 30. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico	372
Figura 31. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas	373
Figura 32. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas.....	373
Figura 33. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas.....	373
Figura 34. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas.....	374
Figura 35. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico.....	374
Figura 36. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas	374
Figura 37. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas.....	375
Figura 38. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas	375
Figura 39. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas	375
Figura 40. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico.....	376
Figura 41. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas	376
Figura 42. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas	376
Figura 43. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas	377
Figura 44. Gráfica comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas	377

IV. ÍNDICE DE ECUACIONES

(3.1).	$Velocidad\ de\ difusión = \frac{\delta m}{\delta t} = -DS \frac{\delta c}{\delta t}$	114
(5.1).	$\%componente\ i = \frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$	172
(5.2)	$C = \epsilon \frac{V}{\epsilon_0 P} \times 10.000$	173
(5.3)	$Índice\ de\ carbonilo = \frac{Absorbancia\ 1715\ cm^{-1}}{Absorbancia\ 974\ cm^{-1}}$	177
(6.1)	$Índice\ de\ carbonilo = \frac{Absorbancia\ 1715\ cm^{-1}}{Absorbancia\ 974\ cm^{-1}}$	197
(6.2)	$X_L = X_B + K * \sigma_B$	224
(6.3)	$C_L = \frac{X_L - X_B}{m}$	224
(6.4)	$C_L = \frac{K * \sigma_B}{m}$	224
(6.5)	$X_Q = X_B + K *$	224
(6.6)	$C_Q = \frac{(K * \sigma_B)}{m}$	225
(6.7)	$DER = \frac{\sigma_{n-1}}{\bar{X}} * 100$	225

1. RESUMEN

El trabajo que se describe en esta Memoria, da cuenta de las tareas llevadas a cabo y de los resultados obtenidos durante el periodo de investigación que ha constituido la realización de la Tesis Doctoral titulada “Estudios de migración en aceites de oliva virgen extra envasados en PET”, que se enmarca dentro del Programa de Doctorado en Aceites de Oliva de la Universidad de Jaén, en la línea de investigación de la Tecnología Agroalimentaria, y se ha desarrollado desde el Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales y Química Analítica.

El plan de investigación de este trabajo aborda, en el marco de la seguridad alimentaria, uno de los problemas actuales y de mayor interés relacionados con el envasado, la migración desde los materiales que conforman los envases a los alimentos que los contienen. Se ha elegido como material, por el gran desarrollo de su uso experimentado en las últimas décadas, el envase de polietilentereftalato (PET); y el aceite de oliva virgen extra –de las variedades *Picual*, *Arbequina* y *Hojiblanca*- como alimento receptor de la posible migración, debido a las escasas aportaciones de resultados científicos sobre este tipo de fenómeno para esta grasa tan saludable.

En la elaboración de dicho plan de investigación, se ha realizado una revisión bibliográfica para conocer el estado actual de la investigación científica sobre el fenómeno de la migración de los envases PET a los alimentos, originada por el almacenamiento bajo determinadas condiciones de influencia, y con especial mención a la migración del antimonio (Sb), elemento más comúnmente utilizado como catalizador en la síntesis del PET.

Los estudios entonces, se han desarrollado considerando condiciones extremas de temperatura, tiempo y exposición a luz, simulando modos de conservación, almacenamiento o transporte que pudieran realizarse en países de clima cálido. Las temperaturas empleadas en los tratamientos térmicos en estufa han sido 40, 60 y 80°C, y el tiempo empleado de dos y tres semanas. En el tratamiento de almacenamiento, las condiciones han sido de dieciocho meses a temperatura ambiente; y la exposición a la luz se ha realizado durante una, dos, tres y cuatro semanas.

Dentro de las sustancias susceptibles de migrar, la investigación se ha centrado en el Sb, empleado como catalizador en la fabricación del PET y que, por su gran toxicidad, pueden llegar a poner en peligro la salud de los consumidores. También, se

han analizado otros elementos de interés legislativo, como son arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb). De forma simultánea además, se ha analizado la influencia de los tratamientos en el deterioro de las cualidades físico-químicas y organolépticas de dichos aceites, así como del material plástico (PET) de los envases muestreados.

En los estudios de degradación del PET, se ha empleado la Espectroscopía Infrarroja FT-IR y el software de análisis Essential-FTIR, con el que se han calculado los índices de carbonilo de las distintas muestras. La caracterización físico-química de los aceites de las distintas variedades, se hizo siguiendo los ensayos para la caracterización de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva establecidos por la normativa del COI, o el reglamento de la UE. La evaluación sensorial ha sido llevada a cabo por el Panel de Cata, del Centro Tecnológico del Olivar y Aceite de oliva (CITOLIVA), de acuerdo con los métodos de análisis oficiales de la UE. Por último, la determinación de As, Cd, Pb y Sb se ha realizado mediante Espectrometría de Masas por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

Los resultados de este trabajo de investigación, se han expresado como el valor medio de tres medidas, con su correspondiente desviación típica, la precisión del método analítico se ha verificado mediante el parámetro estadístico de la desviación estándar relativa (DER), y la exactitud se ha comprobado mediante estudio de recuperación. Para ambas propiedades analíticas, los resultados han sido satisfactorios.

En los distintos apartados del capítulo 6 de esta Memoria, se han ido mostrando parte de estos resultados, bien en forma de tabla o de gráfica, para su interpretación y discusión. El resto, por su elevado número, se encuentran en el apartado de Anexos del índice general.

La discusión de los resultados se ha desarrollado atendiendo a los distintos apartados del índice, y estableciendo, en cada caso, un estudio comparativo con la legislación correspondiente, para poder evaluar principalmente la calidad de los aceites, la migración del Sb, así como el deterioro de los envases de PET, y la presencia de los metales pesados, As, Cd y Pb.

También se ha considerado interesante la comparación de los resultados de los cuatro analitos As, Cd, Pb y Sb, con las concentraciones encontradas en los trabajos de

la revisión bibliográfica, con condiciones de trabajo similares a los considerados en el plan de investigación de esta Memoria.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el almacenamiento prolongado de las distintas variedades de aceite de oliva a altas temperaturas afecta a sus cualidades organolépticas, aunque apenas a las físico-químicas. No obstante, estas variaciones, en algunos casos, dan lugar a una modificación de la categoría de los aceites. También, que existe variación en la migración del Sb conforme aumenta la temperatura y el tiempo de almacenamiento, así como la exposición a temperatura y a la luz solar; y que se pueden superar en algunos casos los límites máximos de residuos establecidos para este elemento en distintas legislaciones. Dicha migración además, está relacionada con la degradación observada en las distintas muestras de PET mediante la evolución que presentan los índices de carbonilo. Completando el estudio, se han determinado las cantidades de As, Cd y Pb, que en algunos casos también han superado los límites de residuos permitidos.

Por último, se ha elaborado el capítulo de Bibliografía, con las distintas fuentes de información consultadas, libros, artículos científicos, legislación y digital.

2. ANTECEDENTES

En este capítulo de la presente Tesis Doctoral, se trata sobre el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen, con vistas a la consecución de un producto de calidad, que cumpla con los estándares de seguridad alimentaria que se precisan para un mercado destinado al gran consumo.

Con este propósito expositivo, se parte primero del conocimiento generalizado del olivar y de las distintas variedades de aceituna empleadas comúnmente en esta industria. Se sigue, a continuación, con un análisis detallado de la composición química del aceite. Luego se profundiza en los conceptos de calidad y de seguridad alimentaria, específicos para este producto. Por último, se completa con una definición de los parámetros de control; deteniéndose a relacionar los organismos internacionales encargados de la supervisión, a conocer la legislación que actualmente es aplicable a la materia, y a indicar cuáles son los criterios de calidad y pureza exigidos.

2.1. OLIVAR, ACEITUNAS Y ACEITE

El aceite de oliva virgen es un producto natural que se obtiene al extraer por procedimientos mecánicos el aceite que se encuentra principalmente en la pulpa, en la semilla y en el hueso de la aceituna. Este aceite, que puede ser “virgen extra”, se distingue del aceite de oliva virgen, que también se comercializa como producto natural, al poseer una acidez menor de 0,8 grados y carecer de los diferentes defectos organolépticos que pueden enmascarar, con sabores y olores propios de una mala obtención, elaboración y manipulación, sus tres atributos principales reconocidos: amargo, frutado y picante.

Debido a la saludable composición química del aceite de oliva virgen, el mercado de esta grasa natural, hasta ahora muy localizada por su producción y uso en los países del entorno del Mediterráneo, está experimentando un considerable aumento, e incluso se está extendiendo dicha producción a otras partes del mundo donde, hasta ahora, ha predominado el consumo de otras grasas, tanto vegetales como animales.

Las 9 kcal/g de sus ácidos grasos lo hace un alimento muy energético. Dichos ácidos grasos están formados principalmente por ácido oleico, cuyo porcentaje sobre el total, que oscila entre el 68% y el 81%, la convierten en la grasa mono-insaturada por excelencia y, por tanto, muy beneficiosa para la salud.

Su composición varía según diferentes factores, como son: la variedad de la aceituna, las condiciones agronómicas de la comarca en la que se desarrolla el cultivo, el momento de la recolección y las características del proceso extractivo (Barranco *et al.*, 2017). Dependiendo de las variedades de aceituna, las características físico-químicas y sensoriales del aceite virgen extra obtenido pueden variar, creando un universo de sabores que, cada vez más, están siendo explotados culinariamente.

2.1.1. Cultivo del olivo

Como se ha apuntado, aunque el área tradicional de cultivo del olivo está centrada en la cuenca del Mediterráneo, el significativo aumento del uso del aceite de

oliva en la dieta mundial ha conseguido que aquel se extienda a otros territorios, la gran mayoría situados entre las latitudes 30° y 45° (Lucena *et al.*, 2017), en ambos hemisferios, y en regiones climáticas similares a la mediterránea, con veranos secos y calurosos; desde el continente americano hasta el continente asiático, incluyendo Australia.

Según el Análisis Internacional sobre Costes de Producción del Aceite de Oliva (COI, 2015), la superficie de cultivo de olivar en el mundo, distribuida entre los actuales 47 países productores, es de más de 11 millones de hectáreas, encontrándose en torno al 98% en el área mediterránea. De esa cantidad de aceitunas, según datos referentes a la campaña 2014/15 recogidos y analizados por el COI, se consiguieron 2.458 millones de toneladas de aceite en todo el mundo.

En cuanto al consumo, decir que son los países productores los principales consumidores (COI, 2018). Así, la Unión Europea destaca tanto por su producción, 1.752 millones de toneladas en la campaña 2016/17 (un 68,39% del total mundial), como por su consumo, 1.402 millones de toneladas (un 51,43% del total mundial según datos del COI de noviembre de 2018).

2.1.1.1. Prácticas culturales

Un porcentaje altísimo de la superficie de olivar se cultiva en secano, aunque los rendimientos son mucho mejores con el riego, por lo que la extensión del regadío está aumentando exponencialmente. El sistema más adecuado e implantado es el de riego localizado por goteo.

De modo tradicional, se han ido realizando laboreos periódicos para controlar las malas hierbas, originándose problemas de erosión y de pérdida de fertilización del suelo. También ha incidido en el problema de la erosión, aumentándolo, la aplicación generalizada, en las últimas décadas, de la técnica del no laboreo y uso de herbicidas para la eliminación de las malas hierbas. Pero el manejo novedoso que ha surgido en los últimos años, para frenar el grave problema de erosión generado por los anteriormente descritos, es el de implantación de cubiertas vegetales controladas,

mediante siega mecánica o con aplicación selectiva de herbicida (Alcántara, *et al.*, 2017).

En cuanto al tratamiento de la poda cabe decir, que tradicionalmente la de formación ha estado orientada a conseguir árboles de tres o cuatro pies, pero esta tendencia, con vistas a la mayor automatización de la recolección, ha ido cambiando, siendo actualmente la más común la que persigue formar árboles con un solo pie en producción. En cuanto a las podas de regeneración, éstas son cada dos años, quedando desaconsejada las actuaciones severas. Además, con la intención de minimizar la vecería característica del olivar, suele realizarse una poda el año anterior al que, por alternancia, se le presume una alta producción, y un aclareo de frutos recién cuajados, para modular y uniformizar, en la medida de lo posible, las producciones entre cosechas.

Dependiendo del lugar y de las costumbres predominantes, de las condiciones agroclimáticas y de si el cultivo es de nueva implantación o no, las formas de gestionar el olivar son distintas. Un reflejo de esta variabilidad se halla en la gran diversidad de marcos de plantación existentes. Así, los hay rectangulares que permiten una mayor densidad de plantación y el desarrollo de setos, los hay cuadrados o “reales” para promover el desarrollo individual del árbol, también existen hexagonales o “a tresbolillo” para optimizar el aprovechamiento del terreno, y en formación “cinco de oros”, utilizados para aumentar la densidad de los instalados inicialmente en marco real.

Las densidades de plantación (Figura 2.1) varían entre las más escasas del marco tradicional extensivo y las del marco intensivo por un lado, que fomentan el desarrollo en copa y producción del árbol, y las del marco en seto o superintensivo por otro, que persiguen la mecanización de las labores y, principalmente, la optimización de la más costosa de éstas, la recolección (Caballero y Del Río, 2017).

a) Superintensivo, en seto (hasta 2.000 olivos/ha).

Fuente: Rallo, L.



b) Intensivo (200-400 olivos/ha).

Fuente: Sensaove



c) Extensivo (hasta 100 olivos, con 3-4 pies/ha).

Fuente: Sensaove



Figura 2.1. Diferentes marcos de plantación de olivar

Ahora bien, considerando las nuevas tendencias hacia la protección del medio ambiente y generalizando en este sentido, actualmente cohabitan tres tipos de sistemas de cultivo del olivar. Uno es el convencional, otro es el ecológico y un tercero, mixto, que se reconoce como integrado. Mientras que el primero persigue el mayor

rendimiento productivo, sirviéndose de técnicas agronómicas agresivas para el medio, el ecológico consigue materias primas naturales, libres de residuos y aplicando técnicas de cultivo armoniosas con el medio, aun a costa de una merma en el rendimiento. En cuanto al integrado, a medio camino entre uno y otro, aunque evitando en la medida de lo posible el mayor daño al ambiente y a los consumidores, se debe indicar que es el que mayor aumento está experimentando al considerarse como destino de adaptación lógico para el convencional.

En general, el olivar es un cultivo robusto, resistente a plagas y enfermedades, que soporta muchos tipos de suelo y puede desarrollarse en condiciones de sequía y calor en los periodos veraniegos. No obstante, es vulnerable al frío pues no resiste heladas de menos de 10°C bajo cero. Aunque, dependiendo de la variedad, esta resistencia puede ser mayor o menor. La variedad además, va a condicionar el manejo agronómico, bien sea porque de ella va a depender la época de maduración, o porque mostrará diferentes resistencias a las diferentes enfermedades.

Unas variedades son aptas para la recolección mecánica, lo que condiciona a su vez la elección entre los diferentes tipos de producción, la intensiva o superintensiva frente a las extensivas. Otras son de entrada precoz en producción, otras para producción de aceite, otras de cosechas abundante, etc.

2.1.2. Variedades de aceituna. Zonificación

En España se cultivan doscientas sesenta y dos variedades de olivo (Barranco, 2017), tanto de mesa como de producción de aceite. Y estas se clasifican en:

- Principales*. Con grandes superficies de cultivo, predominan en al menos una comarca.
- Secundarias*. No dominan en ninguna comarca, son base en plantaciones regulares.
- Difundidas*. Como árboles aislados en varias comarcas.
- Locales*. Como árboles aislados en una sola comarca.

De entre las principales hay un total de veinticuatro variedades, de las cuales diecinueve son exclusivamente para obtención de aceite, tres de uso mixto y dos sólo de mesa. Por la mayor extensión de cultivo se pueden destacar *Picual*, *Lechín de Sevilla*, *Hojiblanca* y *Cornicabra*. Para la investigación que se presenta, se han utilizado aceites envasados, etiquetados como vírgenes extra, de las variedades de aceituna *Picual*, *Arbequina* y *Hojiblanca*. No obstante, aunque estas variedades son las comercialmente más extendidas en la producción de aceites, existen otras que alcanzan en nuestro país - también referidas a producción de aceite- una cuota de mercado distinguible. Todas se relacionan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Variedades de aceitunas de producción de aceite en España (Barranco, 2017)

<i>Variedad</i>	<i>Superficie (Ha)</i>	<i>Zona</i>
<i>Picual</i>	960.000	Jaén, Córdoba y Granada
<i>Cornicabra</i>	269.000	Ciudad Real y Toledo
<i>Hojiblanca</i>	257.000	Córdoba, Sevilla y Málaga
<i>Lechín de Sevilla</i>	105.000	Sevilla y Cádiz
<i>Morisca</i>	74.000	Badajoz
<i>Arbequina</i>	115.000	Lérida, Tarragona, Andalucía
<i>Picudo</i>	60.000	Córdoba y Granada
<i>Farga</i>	45.000	Castellón y Tarragona
<i>Lechín de Granada</i>	36.000	Almería, Granada y Murcia
<i>Verdial de Huevar</i>	34.000	Sevilla y Huelva
<i>Verdial de Badajoz</i>	29.000	Cáceres y Badajoz
<i>Morrut</i>	28.000	Castellón y Tarragona
<i>Sevillenca</i>	25.000	Castellón y Tarragona
<i>Villalonga</i>	24.000	Valencia
<i>Castellana</i>	22.000	Cuenca y Guadalajara
<i>Verdial de Vélez-Málaga</i>	20.000	Málaga
<i>Blanqueta</i>	17.000	Valencia y Alicante
<i>Changlot Real</i>	5.000	Valencia
<i>Alfara</i>	4.000	Valencia y Albacete

2.1.2.1. Características

A continuación, se relacionan y describen las principales variedades de aceituna de almazara utilizadas en España, junto con las características más destacables de los

aceites que de éstas se obtienen.

-Hojiblanca. Llamada así por el color característico del envés de las hojas de sus árboles, es una variedad proveniente de Lucena (Córdoba), cuyo cultivo se viene asentando en Andalucía, cultivándose mayoritariamente en las provincias de Córdoba, Málaga y, en menor superficie, en las de Sevilla y Granada, ocupando en torno a un 16% de la extensión total del olivar de la comunidad autónoma. Las aceitunas de la variedad *Hojiblanca*, también conocida como *Lucentina*, proporciona un rendimiento bajo en aceite, que viene a oscilar entre un 17 y 19%. Su fruto es oblongo, de tamaño medio, presentando una relación pulpa/hueso grande.

Se recolecta desde finales de noviembre hasta finales de diciembre, cuando ya ha alcanzado su punto de maduración óptimo. Si el trabajo de recogida en el campo conlleva siempre una laboriosa tarea, esta variedad aumenta dicha dificultad, pues es especialmente resistente a desprenderse del árbol.

En cuanto a su composición, se obtiene un aceite virgen extra muy equilibrado en ácidos grasos, con ácidos saturados relativamente más bajos que en aceites de otras variedades.

Para mantener la calidad óptima de un aceite virgen extra de la variedad de oliva *Hojiblanca*, es fundamental cuidar su almacenamiento, pues se trata de un aceite de oliva sin gran estabilidad ante la oxidación. Así, debe protegerse de la luz y evitar una excesiva oxigenación.

Presenta una inmensa gama de gustos, aunque predominan los sabores vegetales. Sus rasgos más característicos son su leve amargor, con recuerdos de fruta verde, con ligero sabor a manzana, poco amargo y, en ocasiones, picante y dulce. Con gusto final e boca a almendra hecha (Uceda *et al.*, 2000).

-Arbequina. Aunque es una variedad muy cultivada en el noreste de la península, en tierras catalanas, su área se está extendiendo cada vez más por Andalucía, siendo ya un referente de los distintos aceites de oliva vírgenes que se producen en esta comunidad autónoma del sur de España.

Suele ser un árbol pequeño, de poco vigor, con brotes poco ramificados y largos, que entra en producción entre los 10-15 años de vida. Por estas características es considerada como una variedad apta para plantaciones de alta densidad, a lo que se une su poca vecería y alta productividad (Barranco, 2017). La hoja es acanalada y ensanchada por el ápice. Su aceituna es de tamaño pequeño y poco peso, aunque su rendimiento en aceite es mucho más elevado que el de muchas variedades comunes.

Su aceite se caracteriza por ser suave, con sabores intensos a frutos secos, a almendras dulces, pero también a frutos maduros, aunque sin dejar apenas amargor y picor. No obstante, sus buenas características organolépticas contrastan con su cierta inestabilidad para la conservación.

-*Picual*. Es la variedad por excelencia en superficie cultivada del mundo, pues se extiende por más de un 20% del total de hectáreas plantadas, superando el 50% si nos centramos tanto en España como en Andalucía, donde cubre la casi totalidad de las comarcas olivereras de Jaén, y buena parte de las de Córdoba y Granada.

Los árboles, de pronta implantación, son muy rústicos y, por tanto, muy adaptables a clima y suelo, tolerando tanto heladas como suelos con alta humedad. Suelen alcanzar un porte grande, vigoroso, con un gran desarrollo foliar –su hoja es alargada– que da abundantes cosechas. Los frutos, elipsoidales con ápice apuntado, son los que le dan el nombre a la variedad. Su relación pulpa-hueso varía de media a alta y su rendimiento graso es más que aceptable, llegando a alcanzar hasta un 27%.

Tiene el aceite *Picual* una excelente composición en ácidos grasos y una gran cantidad de antioxidantes naturales. Los aceites de la variedad *Picual* poseen el mayor índice de ácido oleico, superando en casi un 10% a los otros aceites. El ácido oleico es uno de los que más se asocia su consumo con la reducción en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y hepáticas. Son aceites muy estables. De gran fuerza y cuerpo, en su degustación aparecen sabores a madera fresca e higuera (Uceda *et al.*, 2009), siendo un poco picantes y más generosos en el amargor. Así, culinariamente hablando, son catalogados como vírgenes extra de gran “personalidad”.

-*Cornicabra*. También conocida como aceituna de *Cornezuelo de Mora de Toledo*, después de la variedad *Picual* es la que forma aceites más estables. El cultivo se extiende

por toda la zona central de la Península, concretamente por las provincias de Toledo, Ciudad Real y Madrid. Árboles de vigor moderado, forman ramos de mediana longitud y escasa formación de brotes.

La hoja es alargada, lanceolada, y el fruto es también largo, curvo y asimétrico, adoptando su vientre una forma característica de cuerno. Las tonalidades de sus aceites tienden del amarillo verdoso al oro. Y su sabor, frutado y fresco, se complementa con el de aromas a hojas verdes, almendra y tomate (Uceda *et al.*, 2009).

-*Lechín de Sevilla*. Se distribuye por las provincias de Sevilla y Córdoba, principalmente. El árbol es vigoroso con ramos cortos y copa espesa de porte abierto. La hoja es corta y casi plana y el fruto es elipsoidal y algo abombado por el dorso. Pocas flores en inflorescencias cartas. Hojas planas, elíptico-lanceolada de tamaño medio. Y frutos de peso medio, ovoides y asimétricos, diámetro transversal máximo centrado. La base está truncada, el ápice está redondeado, sin pezón, con muchas y pequeñas lenticelas.

Se adapta bien a suelos y clima, resiste bien tanto el frío como la sequía. Es un árbol de maduración temprana, de cuyas aceitunas se saca un aceite algo inestable, con un aroma medio, algo equilibrado, y un sabor amargo.

-*Picudo*. Esta variedad también es conocida como *Carrasqueña de Córdoba* y es cultivada, además de en las comarcas penibéticas de Córdoba, en el norte de las provincias de Granada y, algo menos, en las de Jaén y Málaga. El árbol tiene gran vigor y densidad mediana en un porte abierto. Hojas anchas y planas, de tamaño medio y de forma elíptica. Sus frutos tienen gran peso, son asimétricos y con forma de ovoide (Gómez-Escalonilla y Vidal-Hernández, 2006).

De ápice apuntado y con pezón, tienen muchas y pequeñas lenticelas. De maduración tardía, desde la cuarta semana de noviembre hasta final de diciembre, las aceitunas se destinan tanto a aceite como a mesa. Con buena resistencia a frío y humedad, esta variedad, con un rendimiento graso alto aunque sin llegar a los valores de una *Picual*, produce un excelente aceite.

El aceite de la variedad *Picudo*, muy dulce, ofrece ligeros sabores y aromas que recuerdan a frutas exóticas, a manzana y a almendra (Uceda *et al.*, 2009). Su

composición en ácidos grasos provoca su pronta oxidación, por lo que se suelen utilizar para obtener aceites “coupage” junto con otras variedades más resistentes.

-*Empeltre*. Es la variedad más comúnmente extendida en las comarcas del Bajo Aragón. Árbol de vigor medio, con un porte erguido y de copa espesa, se ve afectado por las heladas. Madura temprano y su producción es tan constante como abundante. Las hojas tienen forma elíptico-lanceolada, son de anchura y longitud medias y no presentan curvatura. Sus inflorescencias, aunque no muy densas, son alargadas.

La *Empeltre* es asimétrica y alargada. Con buen rendimiento graso, sus aceites son de muy buena calidad, de un color oro viejo, pajizo, y un sabor suave y dulce.

-*Blanqueta*. Es una variedad extendida en Alicante y en el sur de Valencia. El árbol es bajo, erguido y con copa de densidad media. La hoja corta, elíptica y con curvatura hiponástica, y el fruto, algo ovalado y ligeramente asimétrico, es pequeño, con un redondeado simétrico y de poco peso (Gómez-Escalonilla y Vidal-Hernández, 2006).

Es un cultivo que resiste el frío y la sequía. Es de floración tardía y de productividad elevada y constante. Los aceites que proporciona son de tonalidad verde hoja, con aromas muy frutados y con notas de ligero sabor a manzana. Muy fluido en boca, tiene una ligera astringencia (Uceda *et al*, 2000).

-*Farga*. Se cultiva en las provincias de Castellón, Tarragona y Lérida. Es un árbol de vigor elevado, con porte abierto y copa espesa. Las inflorescencias son largas, pero pobres en flores. De hojas cortas y de forma elíptica, planas y de anchura media. La aceituna, de peso medio, es alargada y un poco asimétrica. El ápice no tiene pezón y es redondeado, presentando el fruto abundancia de pequeñas lenticelas.

Es una variedad de gran vigor y resistencia al frío, de pronta madurez y con productividad elevada. Los frutos proporcionan bastante aceite. Éste, es de un frutado de intensidad media-alta, con predominio de aromas agradables entre los que destacan las frutas exóticas, los tonos ahumados, tallo y piel de plátano. Da valores bajos de amargor y picante, siendo equilibrado y con un perfil suave y elegante.

En la Figura 2.2 se incluyen fotografías ilustrativas de las variedades descritas.



Figura 2.2. Detalle de las diferentes variedades de aceitunas consideradas. Fuente: Zefiro-Japan.

2.1.2.2. Zonas de la España olivarera

A continuación, se consideran las zonas de producción de las distintas variedades de aceitunas destinadas a uso de mesa, a almazara o de doble uso.

El cultivo del olivar en nuestro país está dividido en diez grandes zonas, según se estableció por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Puerta de la *et al.*, 1972), cuya delimitación geográfica, incluyendo las variedades más representativas de cada una de ellas, se describen a continuación y se muestran en la Figura 2.3.

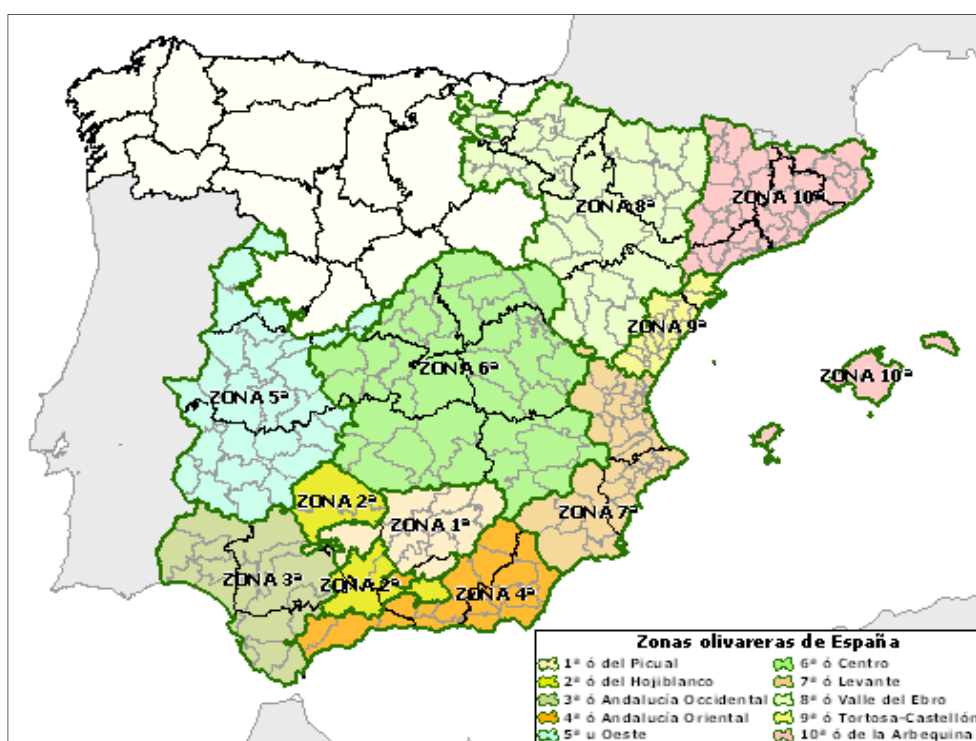


Figura 2.3. Mapa de España de las regiones olivareras. Fuente: Ministerio de Agricultura, 1972.

-Zona 1ª o *Picual*. Comprende la provincia de Jaén y las comarcas de Iznalloz (Granada) y Bujalance (Córdoba). Aquí, la variedad predominante es *Picual*, siendo utilizada típicamente para almazara.

-Zona 2ª u *Hojiblanca*. Contiene a la provincia de Córdoba, a excepción de las comarcas de Bujalance y La Carlota, y las comarcas de Estepa (Sevilla), Loja (Granada) y Antequera (Málaga). La variedad más representativa es *Hojiblanca*, que se cultiva tanto

para mesa como para aceite.

-Zona 3ª o de *Andalucía Occidental*. Incluye a la provincia de Sevilla, salvo la comarca de Estepa que se ordena en la Zona 2ª antes descrita, la comarca cordobesa de La Carlota y las provincias de Huelva y de Cádiz. Aquí, las variedades que coexisten son muchas, pues junto a las de almazara, como la *Verdial de Huévar* y *Lechín de Sevilla*, destacan las típicas de mesa, como la *Manzanilla* y la *Gordal sevillana*.

-Zona 4ª o de *Andalucía Oriental*. Se centra en las provincias de Málaga, de la que exceptuaremos la comarca de Antequera perteneciente a la Zona 2ª, de Granada, menos sus comarcas de Iznalloz y Loja, y la provincia de Almería. Junto a *Picual* y *Hojiblanca*, cada vez más extendidas, se destacan las variedades de almazara *Verdial de Vélez-Málaga* y *Picual de Almería*; mientras que de doble aptitud se cultiva la *Aloreña*. De esta última variedad, se debe remarcar que es la primera aceituna de mesa en España con Denominación de Origen Protegida, que se produce en una parte de la comarca del Guadalhorce, en la provincia de Málaga.

-Zona 5ª, *Oeste*. Es amplia, se extiende desde Badajoz y Cáceres hasta las comarcas productoras de Ávila, Salamanca y Zamora. Es muy heterogénea en variedades. Mientras que en Cáceres predomina la *Cacereña*, apta para mesa, en la comarca de Barros, en Badajoz, se cultiva para aceite la *Morisca*, para mesa la *Carrasqueña* y, de doble aptitud, *Verdial de Badajoz*.

-Zona 6ª o *Centro*. Está ocupada principalmente por el cultivo, para aceite, de la variedad *Cornicabra*. Otras que también se cultivan son la *Castellana*, la *Alfafara* y la *Gordal de Hellín*. Se extiende su territorio por las Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha y Madrid.

-Zona 7ª, de *Levante*. Comprende las provincias de Alicante y Valencia, además de la Región de Murcia. Zona de muchas variedades, la mayoría autóctonas, destacan las variedades *Villalonga*, *Changlot real* y *Blanqueta*.

-Zona 8ª, del *Valle del Ebro*. Comprende Aragón, La Rioja, Navarra y Álava. La variedad más extendida es la *Empeltre*, y, en contadas comarcas, la *Farga*.

-Zona 9ª, o de Tortosa-Castellón. Comprende el sur de Tarragona y de la provincia de Castellón. La gran mayoría de variedades son autóctonas. Así, nos encontraremos la *Farga*, la *Sevillenca* y la *Morrut*.

-Zona 10ª, o *Arbequina*. Abarca las Comunidades Autónomas de Cataluña y de las Islas Baleares. Complementando a la variedad predominante, *Arbequina*, que en estos últimos años se ha empezado a extender a otras zonas olivareras por la calidad de sus aceites, aparecen otras más locales, como *Verdiell*, *Empeltre* y *Argudell*.

2.1.3. Aceites de oliva

El aceite de oliva es un líquido oleoso que se extrae de las aceitunas en su estado de madurez, utilizando para ello procedimientos mecánicos bien establecidos y reglamentados. Los aceites de oliva se clasifican conforme a lo aprobado en el Reglamento (CE) 2.568/1991 (texto consolidado a fecha 4/12/2016) que hace referencia a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, a sus métodos de obtención y a sus análisis. Así, existen diferentes clasificaciones que se considerarán a continuación, ordenadas dependiendo de si requieren o no de un proceso industrial de transformación (Reglamento (CE) 1.513/2001).

2.1.3.1. Sin transformación industrial

Los aceites de oliva obtenidos de una transformación que usa únicamente procedimientos mecánicos, no industrializados, son:

-*Aceite de oliva virgen extra*. Es el obtenido por procedimientos mecánicos conocidos y que son: el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Y siempre se deben abordar en unas condiciones térmicas aceptables para la no alteración de sus características físicas, químicas y organolépticas. Para distinguirlo del aceite de oliva virgen y del lampante, que se obtienen de igual modo, el producto resultante deberá mantener una acidez libre expresada en ácido oleico menor a 0,8 g/100 g y no contener defectos organolépticos (COI, 2016).

-*Aceite de oliva virgen*. Debe mantener una acidez entre 0,8 y 2 g/100 g, pudiendo contener defectos organolépticos, que le impiden ser catalogado como extra.

-*Aceite de oliva virgen lampante*. Se trata de un aceite de oliva virgen que debido a su fuerte sabor y alto índice de acidez, mayor a 3,3 g/100 g, no es apto para el consumo directo, siendo necesario su refinado.

-*Aceite de oliva virgen corriente*. Entre la catalogación de virgen y de lampante, existe otra denominada internacionalmente como “virgen corriente”, con una acidez libre expresada en ácido oleico que oscila entre los 2 y los 3,3 g/100 g. Aunque es apto para el consumo, su calidad es mucho menor a la del oliva virgen (COI, 2016).

2.1.3.2. Con transformación industrial

Los diferentes aceites de oliva obtenidos mediante transformación industrial se relacionan a continuación.

-*Aceite de oliva refinado*. Es un producto obtenido –como su propio nombre indica- tras el refinado de los aceites vírgenes, principalmente lampantes. Con el refinado se consigue eliminar aquellas características organolépticas y físico-químicas que lo hacen no apto para el consumo, sin alterar su estructura glicerídica inicial, siendo su acidez libre como máximo de 0,3 g/100 g.

-*Aceite de oliva*. El aceite de oliva refinado, al mezclarlo a modo de encabezado con una pequeña proporción de aceites de oliva vírgenes o vírgenes extra, pasa a ser comercializable bajo la denominación de aceite de oliva. Estos aceites de oliva que llegan al mercado, poseen una acidez libre de 1 g/100 g como máximo, un sabor y olor suaves, un aspecto limpio, claro y tienen una marcada estabilidad frente a la oxidación, por lo que son muy aptos para la fritura.

-*Aceites de orujo de oliva crudo*. Proceden de los orujos resultantes del proceso de obtención de los aceites de oliva vírgenes. Son obtenidos con disolventes y deben ser sometidos al proceso de refinado, para hacerlos aptos para el consumo.

-*Aceite de orujo de oliva refinado*. Es el obtenido a partir del refinado del aceite de orujo crudo, sin alteración de su estructura glicerídica inicial. No podrá tener una acidez superior a 0,3 g/100 g. Este aceite, para poder comercializarse se mezcla con aceites de oliva vírgenes y pasa a catalogarse como aceite de orujo de oliva.

- *Aceite de orujo de oliva*. Está compuesto de aceites de orujo de oliva y aceites de oliva vírgenes, cuya acidez expresada en ácido oleico no debe superar 1 g/100 g.

2.1.4. Composición química de los aceites de oliva

Las grasas y los aceites, son triglicéridos de ácidos grasos y glicerina en general. Su composición se amolda al esquema que hace distinción entre fracción saponificable y fracción insaponificable (Lozano *et al.*, 2009).

2.1.4.1. Fracción saponificable o mayoritaria

La fracción saponificable del aceite de oliva está compuesta mayoritariamente por triglicéridos, una parte menor de glicéridos parciales (diglicéridos y monoglicéridos) y ácidos grasos libres.

a) Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres que se pueden hallar en el aceite de oliva son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0). La proporción de estos ácidos fluctúa según la variedad de aceituna de la que se elabore la grasa, destacando -por característico- el porcentaje de ácido oleico (56-84%) y de linoleico (3-21%) sobre el resto (Lozano *et al.*, 2009).

Al ser el ácido oleico un ácido monoinsaturado, el aceite de oliva virgen se diferencia de otros aceites por su alto contenido. El siguiente en proporción sería el

linoleico, ejemplo de ácido poliinsaturado. De este modo, con el consumo de aceites de oliva vírgenes se eleva beneficiosamente el consumo de ácidos grasos monoinsaturados - sobre todo - sin que aumente apreciablemente el de los saturados y garantizando un consumo apropiado de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, lo que mejora el perfil lipídico previniendo posibles patologías cardiovasculares. Por tanto y al ser beneficioso para la salud, los aceites de oliva vírgenes se pueden catalogar como alimento funcional.

La composición de ácidos grasos de los aceites de oliva vírgenes, y por extensión de los “vírgenes extra”, difiere dependiendo de la latitud y condiciones climáticas del cultivo, de la variedad y del momento de madurez del fruto en la recolección (Aguilera *et al.*, 2017). A modo de ejemplos, los aceites del Sur de Europa tienen un mayor contenido en ácido oleico que el de los aceites provenientes del Norte de África; o la variedad *Picual*, que ofrece, como característica propia, un mayor contenido también de dicho ácido oleico frente a otras variedades de producción de aceite.

No obstante, aunque tal incidencia es pequeña en la citada composición de ácidos grasos, sí influye sobre la fracción insaponificable que más adelante se define, traducándose en aceites de diferentes características sensoriales (Tous *et al.*, 1997).

b) Triglicéridos

Los triglicéridos son ésteres resultantes de la unión de trialcohol glicerina y tres ácidos grasos, siendo los componentes mayoritarios de la fracción insaponificable (Figura 2.4). Dicha composición triglicéridica sigue un patrón tal que los ácidos grasos que se sitúan, por lo general, en la posición 2 o central de la molécula de glicerol son insaturados, posibilitando la creación de diferentes composiciones, siendo la más abundante la de tres moléculas de ácido oleico.

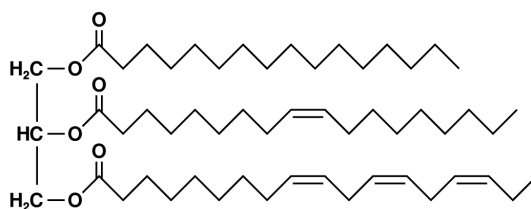


Figura 2.4. Estructura de los triglicéridos. Fuente: Castaños, E., 2015.

c) Monoglicéridos y Diglicéridos

La concentración de monoglicéridos en el aceite de oliva virgen no supera el 0,25%, y la de diglicéridos se sitúa entre el 1 y el 2,8%. Tanto uno como otro, son considerados glicéridos parciales, consecuencia principalmente de la hidrólisis del aceite.

2.1.4.2. Fracción insaponificable o minoritaria

Aunque tan solo hace referencia a un 2% del peso total del aceite, esta fracción engloba a una gran cantidad de compuestos químicos que hacen distinguir y caracterizar a los aceites de oliva vírgenes frente a cualquier otra grasa. La gran variedad de compuestos químicos de esta fracción minoritaria, muchos de los cuales son de difícil determinación, se dividen según sean derivados de ácidos grasos o no.

a) Derivados de los ácidos grasos

A continuación se relacionan los diferentes derivados de ácidos grasos existentes en el aceite de oliva.

-*Ésteres de esteroides*. Pueden hallarse de forma libre o esterificada. Dicha esterificación se produce entre sus grupos hidroxilo y los ácidos grasos libres en el aceite.

-*Ceras*. Se producen mediante esterificación entre alcoholes y ácidos grasos libres del aceite. La velocidad de la reacción de esterificación aumenta al incrementarse el contenido de ácidos grasos libres, circunstancia que está estrechamente relacionada con la hidrólisis de los triglicéridos. La cantidad máxima permitida que puede estar presente en el aceite de oliva virgen extra es de 150 mg/ kg. (COI, 2016)

-*Fosfolípidos*. En los aceites de oliva vírgenes se llegan a alcanzar cantidades de 40-135 mg/kg de aceite. Su estructura está ocupada mayoritariamente por el ácido oleico. Los que se han encontrado son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol, y la fosfatidilserina (Lozano *et al.*, 2009).

b) No derivados de los ácidos grasos

A continuación se refieren los componentes de la fracción minoritaria no derivados de los ácidos grasos que se hallan en los aceites de oliva.

-*Hidrocarburos*. Los hidrocarburos en el aceite de oliva pueden ser:

- *Hidrocarburos terpénicos*. Entre estos se encuentran el escualeno, el de mayor proporción en la fracción insaponificable con hasta un 40% de su peso total (Serrano y Lezcano, 2005) y el β -caroteno, que contrasta con el anterior por su escasa proporción de entre 0,5 y 4 mg/kg. La esquematización de sus estructuras se muestra en la Figura 2.5.

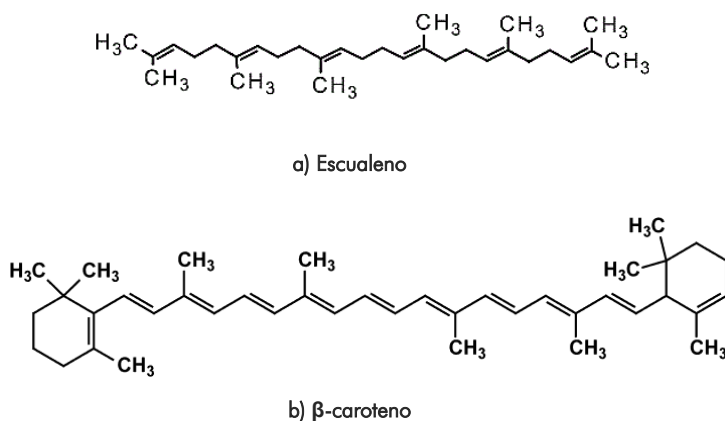


Figura 2.5. Estructuras de hidrocarburos terpénicos. Fuente: Merck, 2019a.

- *Hidrocarburos esteroides*. Aparecen en los procesos de refinado, por la deshidratación de los esteroides. El más característico es el estigmastadieno. Puesto que en los aceites vírgenes es imposible que existan, salvo en mínimas proporciones, si se detectaran en cantidades superiores a 0,15 mg/kg sería motivo de sospecha de mezcla con aceites refinados. Actualmente, el límite máximo para los criterios de pureza se establece en 0,05 mg/kg (COI, 2016).
- *Hidrocarburos policíclicos aromáticos*. Se encuentran en cantidades insignificantes, desde 1 μ g/kg hasta 700 μ g/kg, debido a la contaminación. Algunos aromáticos son el naftaleno, el fenantreno o el fluorantreno.

-*Alcoholes grasos*. Los distintos alcoholes grasos pueden ser lineales, también llamados alifáticos, o triterpénicos. Los primeros suelen estar en el entorno de los 350 mg/kg de concentración en el aceite; y los segundos entre los 1.000 y 1.500 mg/kg (Lozano *et al.*, 2009)

-*Dialcoholes triterpénicos*. Los más abundantes son el eritrodíol y el uvaol. Como se hallan en mayor proporción tanto en el hueso como en la piel de la aceituna se hacen más presentes en los aceites de orujo que en los aceites de oliva vírgenes.

- *Esteroles*. Los esteroides en el aceite suelen situarse en el entorno de 1.130 a 2.650 mg/kg, coincidiendo los valores altos con cantidades elevadas de ácidos libres. Pueden de forma libre o esterificada con los ácidos grasos. Los más significativos en el aceite de oliva son el β -sitosterol, que es el más abundante en proporción al resto de esteroides llegando a situarse entre el 75 y el 90% (Lozano *et al.*, 2009), y, en mucha menor proporción, el campesterol, el estigmasterol y el Δ -5 avenasterol entre otros.

-*Tocoferoles*. Están presentes en los aceite de oliva sólo en su forma no esterificada o libre. Las formas α de tocoferol, homólogas de la vitamina E, se hallan en un porcentaje próximo al 95% del total de tocoferoles; las formas β no alcanzan el 10%, y las formas δ conforman muy bajas proporciones. Todos ellos tienen grupos metilos y fenólicos en vez de un núcleo cromato, y una cadena lateral saturada de 16 átomos de carbono más tres estructuras de isopropeno.

Es destacable mencionar, que existe una relación positiva entre el contenido de vitamina E de los aceites y su grado de insaturación. La estructura molecular de α -tocoferol, por ser el más abundante, se muestra en la Figura 2.6.

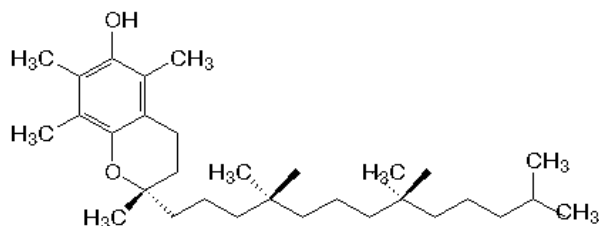


Figura 2.6. Estructura de α -tocoferol. Fuente: Pacheco de Oliveira, A., 2013.

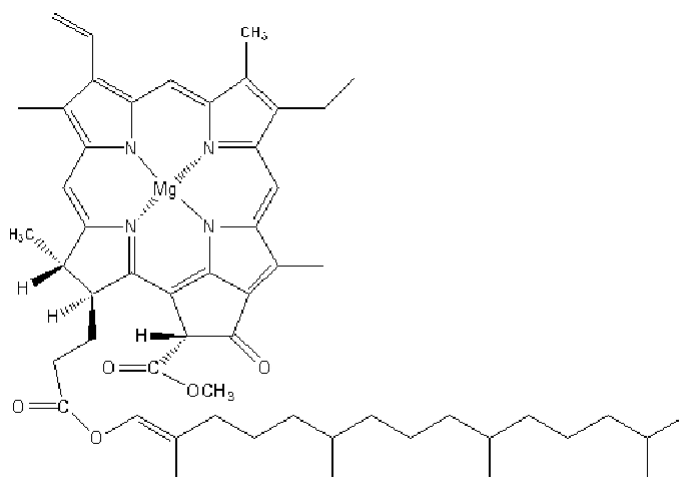
En cuanto al gran poder natural antioxidante de los aceites de oliva vírgenes cabe decir, que esta cualidad les proporciona mucha estabilidad, siendo el aporte de α -tocoferol la principal causa de ello. La concentración de α -tocoferol se extiende desde los 5 a los 300 mg/kg, estando por encima de los 100 en los vírgenes considerados de buena calidad (Lozano *et al.*, 2009). Cuando el contenido es muy inferior a lo marcado como característico, al ser muy alterable frente a tratamientos térmicos, se toma como indicio de adulteración, delatando probables refinados (la etapa de desodorización del refinado es la que más afecta al contenido final de α -tocoferol).

Un consumo diario recomendado de unos 40-50 g de aceite de oliva virgen podría llegar a aportar entre 6,75 y 10 mg de vitamina E al organismo, lo que llegaría hasta 84-100% de las recomendaciones establecidas para dicha vitamina (Serrano y Lezcano, 2005).

-*Pigmentos*. Son los responsables del color del AOVE, que puede variar desde el verde al dorado, siendo un parámetro importante de calidad a tener en cuenta. Así, las clorofilas influyen hacia colores verdosos, y los carotenoides, en cambio, a tonos dorados y amarillos. Se dividen en dos grupos, las *clorofilas* y *feofitinas*, y los *carotenoides*.

- *Clorofilas y Feofitinas*. Tienen carácter hidrofóbico, y su contenido puede encontrarse en los “vírgenes extra” entre 1-20 mg/kg. Tanto las clorofilas, de las que se puede apreciar en la Figura 2.7 su estructura, como las feofitinas, pueden ser de tipo **a** o **b**. Mientras que la **a** posee un grupo metilo en el carbono 3, la **b** tiene un grupo formilo. Sus estructuras moleculares tienen cuatro grupos pirrólicos, estando con un átomo de magnesio la clorofila, y con dos átomos de hidrógeno la feofitina (Lozano *et al.*, 2009).

a) Clorofila a



b) Clorofila b

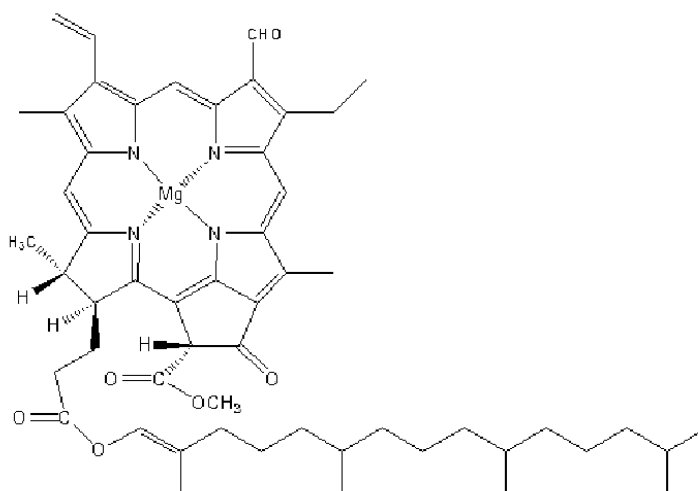


Figura 2.7. Estructura de las clorofilas. Fuente: Yahia, E.M., 2012.

- **Carotenoides:** La cantidad de carotenoides varía en los aceites de oliva vírgenes desde 1 a 20 mg/kg, siendo el componente mayoritario la luteína. Además de ésta, de la que se observa en la Figura 2.8 su estructura molecular, también se dan en estos aceites vírgenes de oliva el β -caroteno, la violaxantina y la neoxantina. Son terpenoides, y se consideran derivados del ácido mevalónico. Su contenido está especialmente influido por los sistemas de extracción empleados en fábrica (Lozano *et al.*, 2009), siendo mayor su contenido en los aceites obtenidos por centrifugación. También la variedad y la zona agronómica de producción son factores de influencia en el contenido de carotenoides.

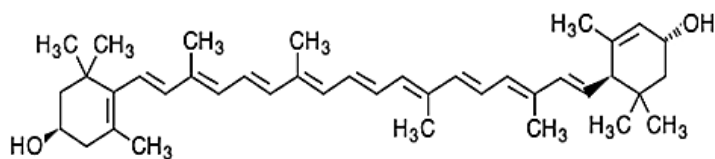


Figura 2.8. Estructura de la luteína, carotenoide principal.

Fuente: www.suplementaciónactiva.blogspot.com, 2013.

-*Polifenoles*. Son los componentes de la fracción insaponificable del aceite de oliva más importantes, tanto por su influencia beneficiosa para el sabor, como por el valor nutricional y la estabilidad del producto. La fracción fenólica en el aceite de oliva es por ello una mezcla diversa y original, pues no se dan en ningún otro aceite vegetal, de componentes provenientes del mesocarpio de la aceituna (Lozano et al., 2009).

Los aceites de oliva vírgenes contienen cantidades significativamente mayores de compuestos fenólicos que los aceites provenientes del refinado, o que los aceites provenientes de semillas, como los de girasol. También, dentro de los vírgenes, las cantidades varían dependiendo del tipo de fruto empleado en la elaboración, pues los frutos verdes dan aceites con mayor cantidad de fenoles que los aceites provenientes de aceitunas ya maduras, o con el envero sobrepasado en la recolección.

Los valores normales están comprendidos entre 50 y 800 mg/kg de polifenoles totales expresados en forma de ácido cafeico (Serrano y Lezcano, 2005), siendo los del aceite virgen de la variedad *Picual* los que mayores valores alcanzan. Por tanto, los datos de polifenoles también fluctúan según la variedad de aceituna.

Por otra parte, se debe indicar que existe una correlación entre el contenido de polifenoles y la estabilidad del aceite, siendo menor cuanto menor es dicha estabilidad a la oxidación.

Otro factor a tener en cuenta para el contenido de polifenoles en los aceites de oliva vírgenes, es el proceso extractivo. Así, los trabajos clásicos de extracción, al no servirse del aumento de temperatura, de la pasta molturada, para mejorar el rendimiento, ofrecen mejores datos de compuestos fenólicos en el aceite resultante.

Los compuestos fenólicos principales presentes en los aceites vírgenes de oliva se

consideran a continuación, mostrándose en la Figura 2.9 sus estructuras moleculares.

- *Flavonoides*. Se dividen a su vez en flavonas, flavonales, flavonones y flavanoles. su estructura forma anillos aromáticos que, unos, provienen del acetil-CoA, y otros de la L-fenilalanina.
- *Alcoholes Fenólicos*. Son el hidroxitirosol y etanol glucósido.
- *Ácidos Fenólicos*. Son metabolitos secundarios de plantas aromáticas, y se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.
- *Lignan*os. Dentro de la fracción fenólica de los lignanos se puede destacar la presencia de pinoresinol y acetoxipinoresinol.
- *Secoiridoides*. Proviene del metabolismo secundario de los terpenos y se caracterizan por la presencia de ácido elenólico en su estructura. Los más interesantes por su presencia en el AOVE son el ligustrósido y la oleuropina aglicona.

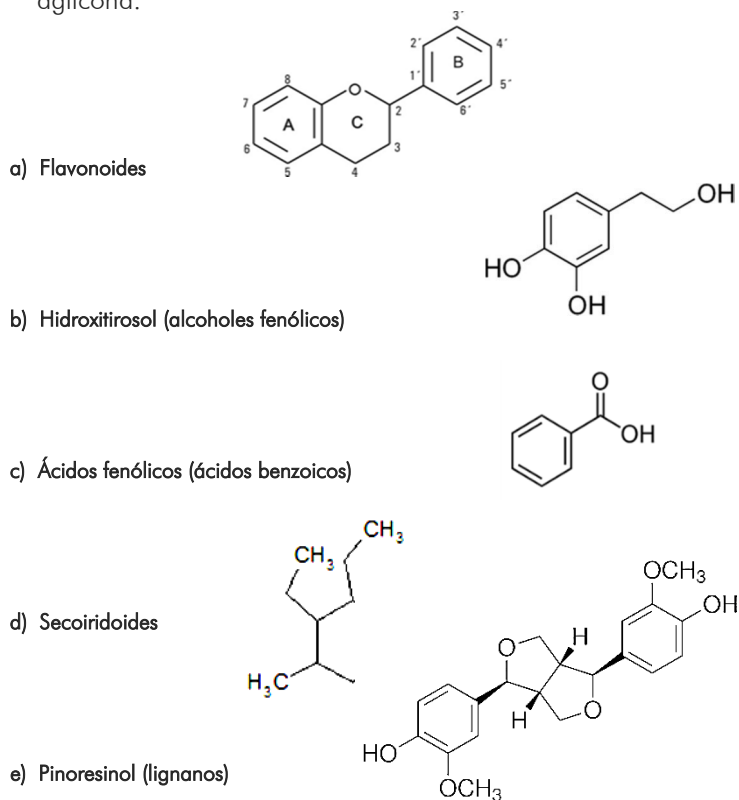


Figura 2.9. Estructuras básicas de distintos compuestos fenólicos
(Fuente a: Herrera, O., 2016) (Fuente b, c y d: Wikipedia) (Fuente e: Merck, 2019b)

2.2. SEGURIDAD ALIMENTARIA

En 1995 los países más avanzados en la producción y distribución de alimentos crearon la Organización Mundial del Comercio (OMC), para alcanzar las mayores cotas de seguridad alimentaria sin perjuicio de la flexibilización y libre circulación de mercado, modulando los proteccionismos nacionales y supranacionales (Ronda Uruguay, 1986-1994).

Ahondando en las premisas citadas, y encontrando justificación en las crisis alimentarias que se desarrollaron en los finales del siglo XX, bien con el escándalo de la encefalopatía espongiforme bovina o “mal de las vacas locas”, que provocó una gran alarma social con el diagnóstico del primer caso de contagio humano en el año 1995 en Reino Unido, bien con la contaminación de la carne de pollo por uso de piensos con dioxina en Bélgica a mediados de 1999, la Comisión Europea publica en el año 2000 el llamado Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria (COM, 1999).

El Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria es un documento en el que se describen un conjunto de acciones necesarias para completar y modernizar la legislación europea en materia de alimentación, para hacerla más coherente, comprensible y flexible, y para garantizar su aplicación, así como la transparencia y la seguridad alimentaria final. En ese documento general, se propuso la creación de un organismo alimentario independiente, que formulara dictámenes científicos sobre aspectos relacionados con la seguridad alimentaria, y que se encargara de la gestión de los sistemas de alerta rápida y de la comunicación de riesgos. De este modo, se concibió la creación de todo un marco jurídico, relacionado con los productos alimenticios, bajo la premisa de seguridad definida por la expresión “desde el campo a la mesa”. Se instó a la creación de sistemas de control alimentario nacionales y coordinados, y se plasmó el propósito de dialogo entre todas las partes implicadas.

Entre las nuevas normas legales, siguiendo las directrices del Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria, destacó el Reglamento 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero, donde se establecieron los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria europea, se fijaron procedimientos en materia de seguridad alimentaria y se creó, a modo de agencia independiente de las estructuras de la Unión, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority- EFSA).

La EFSA se funda, por tanto, para evaluar y asesorar científicamente sobre el riesgo a los estamentos y estados europeos, cubriendo los campos de seguridad de alimentos y piensos, nutrición, sanidad y bienestar animal, y protección de las plantas y sanidad vegetal. Los planteles científicos de EFSA se compusieron de expertos independientes en cada materia tratada, responsabilizándose de sus evaluaciones de riesgo y de sus trabajos de opinión. Así, el objetivo final de este organismo ha sido y es, llegar a ser la referencia máxima en la evaluación del riesgo en cada una de las áreas en que opera.

A modo de coordinación e implementación con la EFSA, los estados miembros han ido conformando organismos afines y autónomos para colaborar con las administraciones públicas en materia de seguridad alimentaria. Por ello, en nuestro país se creó, mediante la Ley 11/2001, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESA), que comenzó a operar en septiembre de 2002.

La AESA cambió su denominación por la de Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), mediante la Ley 44/2006. Posteriormente, AESAN se fusionó en 2014 con el Instituto Nacional de Consumo (INC), creándose mediante el Real Decreto 19/2014 la actual Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).

Funcionando como organismo autónomo, aunque adscrito a la Secretaría General de Sanidad y Consumo (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social), AECOSAN integra y desempeña, en el marco de las competencias de la Administración General del Estado, las funciones relacionadas con la promoción y el fomento de los derechos de los consumidores y usuarios en bienes y servicios, también con la seguridad alimentaria y con la nutrición saludable.

Además de lo hasta ahora expuesto, los planes de reformas legislativas que se apuntaron en el citado Libro Blanco, han trasladado la responsabilidad principal en la seguridad alimentaria a los explotadores de empresas del sector y de los piensos animales, mientras que la supervisión y control del sector de la alimentación se ha concedido a los estados miembros. Y la Comisión Europea, como garante final de esta estructura sectorial, ha asumido el papel de evaluador de las aptitudes y desempeños de esos estados miembros.

Completando el perfeccionamiento del sector en el ámbito de la seguridad alimentaria, la Comisión también propuso la implantación de guías de buenas prácticas de higiene y de sistemas de autocontrol de los procesos basados en el análisis de peligros y puntos críticos de control. Así, con el paso del tiempo se han ido creando un conjunto de normas en materia de calidad y seguridad alimentaria, tales como ISO 14.001, 17.025, o las más claramente basadas en el esquema del citado análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) como son las del tipo GlobalGAP, Food Safety System Certification 22.000 (FSSC 22.000), International Featured Standards (IFS), o British Retail Consortium Global Standard for Food Safety (BRC), todas éstas aceptadas por la fundación Global Food Safety Initiative (GFSI) que promueve la convergencia entre los diferentes estándares de seguridad. También, completando a esas normas de calidad y seguridad, se han ido desarrollando nuevas normas, éstas del ámbito de la seguridad en el trabajo, así como otras relacionadas con diferentes aspectos de protección del medioambiente.

Con los diferentes escándalos en materia de alimentos de estas dos últimas décadas, algunos de los cuales ya se han mencionado, se ha ido acrecentando la desconfianza del consumidor, por lo que en el momento actual la seguridad alimentaria es ya una necesidad de interés público (Ley 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición). Por ello, en las industrias del sector se han cambiado y se siguen cambiando los planteamientos de negocio, desde unos objetivos finales de eficacia y productividad, a los del valor añadido que supone la producción en calidad y seguridad. De este modo, una cadena alimentaria correctamente regulada y bien controlada, se ha convertido en la base para la conquista de la fidelidad en el competitivo mercado de los países desarrollados entre los que nos encontramos.

La seguridad alimentaria por tanto, está íntimamente ligada a la obtención de productos de calidad. Y en la industria agroalimentaria de los países desarrollados, las exigencias de calidad son sinónimo de exigencias en seguridad alimentaria. Dichas exigencias se han ido consolidando a la par que se ha ido desarrollando el contenido del Libro Blanco de los Alimentos, aprobado por la Comisión Europea ya citado. A tal compromiso, han ido contribuyendo los enfoques de las actuales leyes en materia de protección del consumidor final.

Esa calidad, exigida para el cliente externo y el interno, abarca a la composición intrínseca del alimento, a su valor nutritivo, a su grado de alteración, a su almacenamiento, distribución y venta, y también a la presentación. Para conseguir dicha calidad, se deben aplicar controles que velen por el cumplimiento de los objetivos propuestos y necesarios, desde una perspectiva de prevención y de reducción de costes.

La seguridad alimentaria es también el valor máximo de riesgos consentido desde la perspectiva sanitaria, industrial (inocuidad, alterabilidad), nutricional, informativa (idoneidad, autenticidad, cumplimiento de las especificaciones reglamentarias o recomendadas) y comercial, aplicable a los ámbitos de la elaboración, conservación, distribución, venta, expedición y consumo de alimentos para el colectivo consumidor definido por especificaciones globales o para los colectivos vulnerables, en su caso. (Declaración de Roma; Cumbre Mundial sobre la Alimentación; FAO, 1996) Es decir, que el principal objetivo de la seguridad alimentaria es proteger la salud de la población, garantizando la inocuidad de los alimentos frente a peligros biológicos, físicos y químicos.

Antiguamente, los productores de la industria agroalimentaria basaban la seguridad alimentaria en la mera inspección del producto acabado. Pero actualmente se han desarrollado numerosos principios científicos que rigen la elaboración de esos alimentos, que permiten a los operadores de la cadena alimenticia reaccionar con presteza ante cualquier riesgo que pueda producirse, sea en la fase de producción, envasado o transporte. De este modo, ahora los principales responsables por legislación de la seguridad alimentaria son las empresas del sector, las cuales deberán establecer un sistema de autocontrol eficaz (artículo 11, Ley 17/2011).

Si se acude a los organismos internacionales, la Food and Agriculture Organization (FAO) describió la seguridad alimentaria como: “El acceso físico y económico de todas las personas y en todo momento a suficientes alimentos, inocuos y nutritivos, para satisfacer las necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a alimentación, para llevar una vida activa y sana”. En cualquier caso, los conceptos de transparencia y de precaución han de entenderse como parte del objetivo general, la seguridad alimentaria, independientemente de cómo se haya pretendido definir a ésta. Ahondando más en la materia, el *Codex Alimentarius* estableció el Código Internacional

recomendado de Prácticas y Principios Generales de Higiene de los Alimentos (FAO, 2003). En éste código se incluyó el anexo denominado: “Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y Directrices para su Aplicación”.

Así, con el desarrollo de ese nuevo sistema, se permitiría identificar peligros específicos y medidas para su control, a modo de instrumento para evaluarlos, garantizando la inocuidad de los alimentos y estableciendo un sistema de control centrado en la prevención y no en el ensayo del producto final. Dicho sistema APPCC, con el paso del tiempo, se ha convertido en la base de la gran mayoría de sistemas de autocontrol puestos al uso en la industria agroalimentaria moderna.

2.2.1. Sistemas de autocontrol

Un sistema de autocontrol se define como un conjunto de actuaciones, procedimientos y controles que, de forma específica y programada, se realizan en la empresa del sector alimentario para asegurar que los alimentos, desde el punto de vista sanitario, son seguros para el consumidor (Ameyugo *et al.*, 2007).

La implantación de un programa de autocontrol, basado en este caso en el análisis de los peligros y puntos críticos de control (APPCC), es imprescindible para la consecución de unos valores adecuados de seguridad alimentaria, propios de una industria moderna. El APPCC, por tanto, es un método científico que permite identificar los peligros específicos de la actividad sobre el que se implanta, eliminando o disminuyendo hasta la aceptabilidad el riesgo inherente.

Pero dicha implantación conlleva la adopción de unos prerrequisitos, base sobre la cual desarrollar el sistema. Dichos prerrequisitos son el plan de higiene, el plan de buenas prácticas de elaboración y el plan de trazabilidad de producto.

Los planes de higiene han de abarcar todo el proceso y a todas las instalaciones. Los planes de buenas prácticas de elaboración, permitirán conseguir con seguridad un producto de calidad. Y el plan de trazabilidad de producto, rastreará tanto hacia delante o hasta el consumidor final, como hacia atrás o hasta los proveedores, hasta localizar

cualquier partida de producto elaborado, o de materia prima, en caso de alerta sanitaria.

2.2.1.1. Aspectos generales

Los aspectos generales a desarrollar en un sistema de autocontrol (Ameyugo et al., 2007) son:

-Identificación del documento. Se reflejará el nombre de la empresa. También, los datos de identificación tales como el titular de la empresa, domicilio social, domicilio industrial, teléfonos, fax, e-mail, etc. Se harán constar las actividades que se desarrollan en la empresa y luego, el ámbito de aplicación del sistema de autocontrol. Dicho documento contendrá un índice claro en el que ordenar capítulos y planes.

-Conformación del equipo de responsables. Donde relacionar los nombres y responsabilidades de las personas involucradas en la aplicación del sistema de autocontrol.

-Terminología de referencia. Se ordenarán y describirán los conceptos y términos empleados en el desarrollo y aplicación del sistema de autocontrol.

-Elaboración de fichas técnicas. Los productos a elaborar se describirán contando con los datos que hagan referencia a su denominación comercial, a su encaje en la legislación vigente, a su clasificación y categoría dentro del sector en el que se encuadran, y a su composición cualitativa y cuantitativa. También, han de incorporarse las reseñas que describan el procesado, que hacen referencia a su presentación, a las características del envase y al etiquetado según normativa.

Completando a toda esta información, se pueden agregar las condiciones de almacenamiento y del transporte, así como el nicho de consumidores al que está destinado el producto. Otros datos a incluir en las citadas fichas de producto son las características del n° de lote, si es o no de consumo preferente, las fechas de fabricación, envasado y caducidad, y el modo de empleo.

-Flujo de productos. La dirección del proceso de producción se debe reflejar documentalmente, indicando, sobre plano a escala apropiada, las dependencias, la maquinaria y la dotación para el manejo y manipulación de los alimentos tratados. El flujo de productos deberá ser apropiado para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada, o de carencias técnicas que pongan en peligro la seguridad alimentaria.

2.2.2. Planes generales de higiene

Los planes generales de higiene son un conjunto de programas y actividades preventivas básicas, a desarrollar en todas las empresas alimentarias para la consecución de la seguridad alimentaria. Recogen todos los aspectos que deben quedar resueltos con vistas a la obtención de los máximos estándares de salubridad de todas las instalaciones y en todos los procedimientos inherentes a una industria agroalimentaria.

Los planes generales de higiene conforman, por tanto, un prerequisite a adoptar antes de la implantación de un sistema de autocontrol. Y a modo de ejemplo, para el caso concreto de una almazara, se relacionan a continuación los programas de los que estaría formado.

2.2.2.1. Plan general de higiene tipo de una almazara

Un plan general de higiene tipo de una almazara podría incluir los siguientes programas de control:

-Programa de control del agua. El agua a utilizar en la industria almazarera, bien sea para procesado de producto, bien para limpieza de instalaciones, debe ser potable. Se debe tener en cuenta la procedencia de la dotación, y poseer un plano de las instalaciones relacionadas, es decir, puntos de captación o de entrada, conducciones, depósitos, etc. El agua debe estar potabilizada, existiendo distintas sustancias químicas para su desinfección (cloro, ozono, sales metálicas). Generalmente se hace mediante cloración y análisis de la existencia de patógenos o de residuos químicos si proviene de pozo o, en el caso de que provenga de red y pase a depósitos, mediante vigilancia de

su dosis. Y en el caso de proveerse de aguas de cisternas, cerciorarse del cumplimiento legal de todas las exigencias en materia de sanidad (estar en posesión de autorización preceptiva para cisternas móviles, protocolo de autocontrol y gestión actualizado, etc.) (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012).

-Programa de control de plagas. Se debe prevenir la presencia y desarrollo de plagas en las instalaciones de producción del aceite de oliva. Por lo cual, deben existir medidas preventivas de desratización y desinsectación combinadas con otras de estructuración funcional y mantenimiento de las instalaciones.

-Programa de limpieza y desinfección. Se desarrollarán con control, coordinación y regularidad las tareas que permitan tener las instalaciones y la maquinaria en perfectas condiciones higiénicas, evitando la interferencia en la asepsia pretendida del producto.

-Programas de mantenimiento. El mantenimiento correcto de instalaciones, equipos y maquinaria bajo un plan periódico de revisiones garantizará el funcionamiento correcto y constante de la fábrica, redundando en una prevención de posibles contaminaciones del producto final.

-Control de proveedores. Mediante la documentación y control de proveedores, y la supervisión de las especificaciones de producto se controlará que los envases que se adquieran cumplan con los requisitos de homologación exigibles para contener alimentos, de sanidad y de higiene.

-Programa de formación. La empresa deberá formar a sus trabajadores sobre conocimientos generales de higiene alimentaria, y de los que sean exigibles para el desempeño de sus puestos de trabajo específicos. Además, los trabajadores deberán poseer las titulaciones acordes para el desempeño de funciones propias de puestos técnicos y de control, cuando sea el caso.

2.2.3. Plan de trazabilidad

La trazabilidad o rastreabilidad en una industria agroalimentaria se identifica con la capacidad de seguir el movimiento de un alimento a través de las diferentes etapas

específicas de su producción. Dicha trazabilidad, a su vez, se puede clasificar dependiendo de hacia dónde se dirige su desarrollo. De este modo, existe una trazabilidad hacia atrás o de proveedores, para conocer qué productos entran en la empresa y de que fuente de suministro se consiguen. Se puede hablar de una trazabilidad interna o de proceso cuando se siguen los pasos en el procesado de los productos dentro de la empresa (independientemente de si se producen o no nuevos productos). Y, cuando se refiere a una trazabilidad hacia delante o de clientes, se materializa la posibilidad de saber de los productos que salen de la empresa y a hacia quién se han expedido (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición-AESAN, 2009).

La implantación de un plan de trazabilidad en una industria agroalimentaria persigue, por tanto, la perfecta identificación y localización a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento -en este caso los aceites de oliva vírgenes- de un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinados a ser incorporados en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo, tal y como se recoge en el artículo 3 del Reglamento CE 178/2002.

Por ello, el plan de trazabilidad debe considerarse una herramienta como tal, que consiga complementar la gestión de la empresa mediante procedimientos documentados de identificación de productos y de responsables de dichos productos, o proporcionar información que ayude al control y gestión de las distintas actividades desarrolladas, siendo capaz además de identificar los productos puestos en el mercado y la proveniencia de las materias primas utilizadas en el proceso de elaboración del producto, abarcando los distintos tipos de trazabilidades ya comentadas.

El procedimiento o sistema de trazabilidad que se adopte dentro de cada empresa deberá tener en cuenta los siguientes puntos:

1. La identificación por un medio único y sencillo del producto y de los datos del producto, tales como las materias primas, partes constituyentes del producto o mercancías que entran en cada empresa.
2. El modo de manejo, producción, transformación y presentación.
3. La procedencia y destino en las etapas anterior y posterior, junto con sus fechas y los controles de que ha sido objeto el producto.

4. La relación con el sistema de autocontrol.

No obstante, el aceite de oliva virgen es un producto de bajo riesgo alimentario, es decir, que en correctas condiciones de producción hay pocas probabilidades de generar peligros que provoquen riesgos sanitarios. Esto implica que con dicho sistema de trazabilidad correctamente implantado, ese pequeño riesgo de creación de alarma sanitaria, o, tan solo, de producto inseguro o con probabilidades de serlo, sería ínfimo si además se pudiera localizar fácilmente el “foco” de alteración.

Con la trazabilidad aplicada a la producción de aceite de oliva virgen, se va a poder conocer tanto las fases de producción como los elementos que intervienen en la elaboración del producto. En definitiva, hay que describir un sistema que correlacione la identificación del producto elaborado –aceite– con las materias primas –aceitunas– y los datos de producción, así como también con los destinatarios (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012).

Las fases del posible plan de trazabilidad de una almazara podrían ser:

1. Incorporación de un sistema de identificación de materias primas y otros materiales, como envases y etiquetas, o coadyuvantes tecnológicos, reflejando los datos de entrada de la materia prima, proveedor, fecha de entrada y cantidad.
2. Creación de un protocolo de identificación que relacione la entrada de la materia prima aceitunas para molino con el producto terminado y almacenado a granel, aceites de oliva vírgenes en nuestro caso. Es decir, con fecha y cantidad de entrada de la materia prima aceitunas, y con fecha y cantidad de salida de producto aceite de oliva virgen.
3. Desarrollo de un programa de gestión interna de producto terminado o envasado, apoyado en el concepto de lotes. El lote se identifica con un conjunto homogéneo de producto finalizado y listo para la venta. El lote del producto aceite de oliva virgen terminado, envasado o a granel, debe relacionarse con la proveniencia de la materia prima aceitunas de molino, recibida para su transformación.
4. Coordinación y correlación entre producto terminado y destinatario, identificando fechas de expedición, cantidades y clientes.

5. Implantación de un sistema de comunicación eficaz que permita la retirada de producto con éxito, tanto con proveedores como con clientes.
6. Instauración de planes de comprobación regular del sistema de trazabilidad, con ejercicios simulados de trazabilidad hacia delante, hacia atrás e interna, que permitan identificar los posibles fallos y mejoras aplicables.
7. Utilización de una herramienta eficaz para la gestión del plan de trazabilidad, que abarque todas las particularidades y que se apoye en una base tecnológica de gestión de la información tal, que permita de una manera solvente interrelacionar los datos y archivar todos los movimientos de materias primas, órdenes de trabajo y puntos de chequeo relacionados con la trazabilidad, generados durante todo el proceso de producción.
8. Trabajos archivísticos que ordenen y depositen, para su posible consulta y comprobación, albaranes, certificaciones de producto, diferentes registros del plan de trazabilidad, etc., durante el periodo mínimo exigible.

Para el objetivo de este trabajo, centrado en la investigación de posibles contaminaciones por migración del envase PET de un litro al aceite de oliva virgen extra, se debe centrar la gestión de la trazabilidad de la empresa productora en una parte concreta. Así, el primer registro de trazabilidad que se debe vigilar es el de proveedores de materiales de envasado, que en este caso particular es el referido polietilentreftalato (PET) tanto de botella de un litro de capacidad, como de tapones. De este modo, se pueden crear, en un modelo de gestión de trazabilidad informatizado, los distintos tipos de productos diferenciados, para su mejor control, como por ejemplo "Tapón verde PET", "Botella soplada de PET de un litro", también "Etiquetas", "Cartonaje", etc., para controlar estos productos auxiliares que se usan para envasar el aceite. Aunque bien es cierto que no será obligatorio trazar los materiales que no están en contacto directo con la materia prima (Alonso y Grocín, 2006). Y el segundo registro que se ha de controlar es el de formación de los lotes por envasado para venta.

Pero la trazabilidad del producto envasado, desde la perspectiva de este trabajo, no debería terminar en la empresa productora, pues es en la fase de distribución donde puede aumentar aún más el deterioro de la calidad y la cantidad de sustancias migrantes de los aceites de oliva vírgenes, en este caso de calidad extra. Por tanto, se hace necesaria la continuación del plan de trazabilidad en la empresa distribuidora. De

este modo, han de controlarse las fechas de recepción de los aceites vírgenes de oliva envasados, la fecha de incorporación de las botellas a los stand y el periodo medio de tiempo en el expositor.

2.2.4. Plan de análisis de peligros y puntos críticos de control

Como ya se ha indicado en el apartado 2.2, el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) apareció como anexo al Código Internacional recomendado de Prácticas y Principios Generales de Higiene de los Alimentos (FAO, 2003). En el preámbulo de ese anexo se indicó: “El sistema de APPCC, que tiene fundamentos científicos y carácter sistemático, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos. Es un instrumento para evaluar los peligros y establecer sistemas de control que se centran en la prevención en lugar de basarse principalmente en el ensayo del producto final. Todo sistema de APPCC es susceptible de cambios que pueden derivar de los avances en el diseño del equipo, los procedimientos de elaboración o el sector tecnológico. El sistema APPCC puede aplicarse a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor final, y su aplicación deberá basarse en pruebas científicas de peligros para la salud humana. Además de mejorar la inocuidad de los alimentos, la aplicación del sistema de APPCC puede ofrecer otras ventajas significativas, facilitar así mismo la inspección por parte de las autoridades de reglamentación, y promover el comercio internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos”.

El APPCC, por tanto, es un método científico reconocido internacionalmente como sistema de autocontrol de la industria agroalimentaria que permite identificar los peligros específicos de la actividad sobre el que se implanta, eliminando o disminuyendo hasta la aceptabilidad el riesgo. Está basado en siete principios definidos claramente que proporcionan a las empresas la herramienta necesaria para obtener un control fidedigno de todas las etapas de producción, aprovechando los recursos al máximo para reaccionar eficaz y rápidamente ante los imprevistos.

De este modo, el APPCC es actualmente catalogado como el medio más eficaz para alcanzar y mantener un elevado nivel de seguridad alimentaria. Es sinónimo de

inocuidad de los alimentos y se ha convertido en método oficial de lucha contra los peligros biológicos, químicos, físicos y de contaminación de alérgenos; sirviéndose de la evaluación de peligros y del establecimiento de sistemas de control basados en la previsión y la prevención. Particularmente para Europa, es la base de cualquier proyecto de empresa alimentaria: “Los operadores de empresa alimentaria deberán crear, aplicar y mantener un procedimiento o procedimientos permanentes basados en los principios del APPCC” (artículo 5, Reglamento (CE) 853/2004).

Previamente a su desarrollo, hay que tener en cuenta una serie de condiciones y prácticas imprescindibles para su implantación efectiva, definidas como prerequisites o requisitos previos del sistema. En su mayoría, están descritos en los Principios Generales de Higiene de los Alimentos de la Comisión del *Codex Alimentarius* y otros Códigos de Prácticas Correctas. Así y recordando lo ya apuntado en el apartado 2.2.1, el sistema de autocontrol, basado en los principios del sistema APPCC, requiere de la implantación de un procedimiento de trazabilidad, de un plan de higiene y de un plan de buenas prácticas de elaboración como prerequisites para garantizar su buen funcionamiento.

Una vez implantados los planes definidos, la estructura del sistema APPCC se ha de basar en cuatro fases preliminares y en los siete principios de obligado cumplimiento (se relacionan en el apartado siguiente) para que sea aplicado correctamente. Esas cuatro fases preliminares estarán identificadas con:

1. Creación del equipo de trabajo
2. Descripción de la actividad y los productos
3. Elaboración del diagrama de flujo
4. Verificación del diagrama de flujo

2.2.4.1. Siete principios de obligado cumplimiento en el APPCC

En cuanto a los siete principios, estos deben estar definidos claramente para que proporcionen a las empresas la herramienta necesaria de obtención de un control estricto de todas las etapas de producción, aprovechando al máximo los recursos para reaccionar eficaz y rápidamente ante los imprevistos. Dichos principios son:

-*Análisis de peligros.* Se debe realizar un análisis de peligros, enumerando previamente todos los posibles que puedan causar, al reflejarse sus consecuencias en el alimento, un efecto adverso para la salud del consumidor. El análisis de peligros incluye su clasificación (microbiológicos, químicos, por alérgenos o físicos), la determinación de su forma de aparición y su causa. Sobre estos peligros se evalúa el riesgo según su probabilidad, gravedad y posibilidad de no detección. Y finalmente se detectan, de existir, los peligros significativos inherentes al proceso de elaboración del alimento en cuestión.

-*Puntos de control crítico (PCC).* Se han de determinar cuáles son los PCC, de entre todos los peligros detectados como significativos. Se entiende por PCC a una fase del proceso de elaboración en la que se puede aplicar un control, el cual es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo hasta un nivel aceptable; este control debe ser continuo y eficiente, para que nos permita determinar la inocuidad del producto (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012).

-*Límites críticos.* Se marcarán límites críticos, o criterios que diferencien la aceptabilidad de la inaceptabilidad de un proceso. Esos límites críticos podrán estar referidos a estudios experimentales o científicos, recomendaciones del sector, a la propia experiencia o a valores legalmente establecidos, que en ningún caso deberán ser superados en su valor máximo.

-*Sistema de vigilancia de PCC.* Se deberá establecer un sistema de vigilancia de los PCC que permita la detección de una pérdida de control y la actuación inmediata para evitar la desviación. Cada PCC poseerá por tanto un sistema de vigilancia propio, que deberá estar claramente descrito, ser específico y conocido de las personas encargadas de gestionarlo.

-*Medidas correctoras.* Se relacionarán las medidas correctoras para PCC no controlado, con indicación del responsable de aplicarlas, de la identificación del producto afectado y de su destino, y de los pasos correctivos para volver a controlar el PCC.

-*Verificación del APPCC.* La verificación de buen funcionamiento del APPCC, se debe afrontar mediante un programa planificado de actividades que aseguren la eficacia.

-*Documentación y registro de procedimientos.* La documentación y registro de procedimientos, se hará describiendo los métodos empleados, las actividades seguidas y albergando esos registros de forma práctica, eficaz y precisa.

2.2.5. Implantación del sistema APPCC en una almazara

En el ámbito particular de la empresa de producción de aceites de oliva vírgenes se puede argumentar y exponer un procedimiento tipo que garantice la seguridad alimentaria, basándose en las numerosas publicaciones especializadas así como en las distintas guías de prácticas correctas de higiene (GPCH) elaboradas. Así, ajustándose a las definiciones y a los principios recogidos en la Guía de Gestión de la Calidad de la Industria del Aceite de Oliva, particularizada para las Almazaras (COI, 2006) y que hacen referencia a las medidas de higiene alimentaria en lo referente a instalaciones y equipamiento, a higiene y formación del personal trabajador, y a labores de gestión, mantenimiento y control, los prerequisites básicos aplicables antes de desarrollar el APPCC específico de una almazara son: el plan general de higiene, el plan de trazabilidad y el establecimiento de unas buenas prácticas de elaboración de los aceites de oliva vírgenes. De los dos primeros ya se ha escrito aprovechando los apartados 2.2.2 y 2.2.3 respectivamente; y sobre elaboración de los vírgenes de oliva se hará mención en el siguiente.

Para planificar las acciones propias de un sistema de APPCC, como ya se ha referido, se debe contar con el equipo de personas cualificadas, en este caso concreto directivos y operarios que conozcan perfectamente el funcionamiento de la industria de elaboración del aceite virgen de oliva, y el designio de un coordinador o jefe de equipo. Se debe describir también el producto sobre el que se va a implantar, en este caso el aceite de oliva virgen, y el alcance del sistema: “Recepción de aceituna, elaboración de aceite de oliva virgen, almacenamiento a granel, envasado en botella de PET y expedición, tanto a granel como envasado en cisternas a granel” (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012).

Por último, se debe elaborar y verificar *in situ* el diagrama de flujo o representación esquemática de todas las fases del procesado del alimento y las

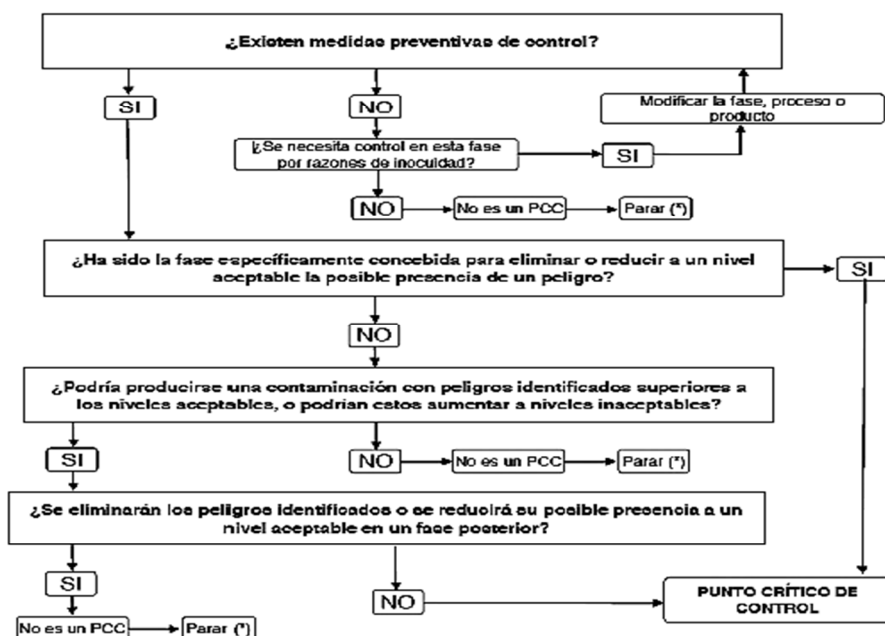
relaciones entre éstas, como se muestra en la Figura 2.10 del apartado 2.2.6.

Tras las etapas preliminares, se deben abordar los siete principios, ya relacionados en el apartado anterior, que conforman el sistema APPCC (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012). Sobre dichos principios, cabe decir que se deben aplicar con flexibilidad, puesto que en la industria del aceite de oliva virgen no se identifican tantos puntos críticos como pueden darse en otro tipo de industrias agroalimentarias, y que, como en nuestro caso, las prácticas higiénicas correctas pueden reemplazar el seguimiento de esos puntos críticos.

La base para el desarrollo de este sistema APPCC recae, por tanto, en la determinación de peligros y, de existir, en la fijación de sus consecuentes puntos de control crítico (PCCs).

De todos los peligros valorados significativamente se deberán identificar cuáles son puntos críticos de control (PCC) y cuáles no. La catalogación de PCC podrá desvelarse usando como método objetivo un árbol de decisiones (Tabla 2.2) a modo de cuestionario que, una vez resuelto, adjudicará o no a una etapa o proceso un punto crítico de control.

Tabla 2.2. Diagrama de un árbol de decisiones. Fuente: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012.



Hay que expresar por tanto, que muchos de los peligros identificados en ese análisis se podrán controlar con la aplicación correcta de los llamados planes de prerequisites, por lo que no será necesario llevarlos al árbol de decisiones al no considerarse, de antemano, PCCs. No obstante, podrán darse etapas sobre las que, aunque no constituyan un PCC, habrán de realizarse controles, siendo catalogadas en estos casos sólo como puntos de control (PC), como por ejemplo la inspección periódica de la temperatura en el batido de la pasta de aceituna.

En el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen dicho peligros, entendiendo como tales cualquier agente biológico, químico o físico que pueda pasar a formar parte del alimento, se controlarán gracias a los programas de plagas, de limpieza y desinfección, de mantenimiento, de control de proveedores, de formación; y también por las buenas prácticas en la elaboración, todos ellos indicados anteriormente como prerequisites a cumplir con vistas a la producción en calidad y con seguridad alimentaria. Así, el único peligro al que se le asociará un PCC, en la elaboración del aceite, estará focalizado sólo en la fase de envasado.

Finalmente, ese PCC asociado a la fase de envasado implicará la aparición de un control tipo para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad del aceite virgen producido. Así, se elaborará un cuadro de gestión que incluirá los siete principios del sistema APPCC, tal y como se recoge en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Cuadro de gestión del envasado. Fuente: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012.

CUADRO DE GESTIÓN: ENVASADO									
Datos de la empresa:									
PELIGROS IDENTIFICADOS	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC	LÍMITE CRÍTICO	VIGILANCIA				MEDIDAS CORRECTORAS	REGISTROS
				¿Qué?	¿Cómo?	¿Quién?	¿Cuándo?		
FÍSICO Y/O QUÍMICO Contaminación del aceite envasado a causa de: • Rotura de botellas de vidrio • Presencia de residuos dentro de las botellas, tapones, garrafas...	Controlar visualmente el buen estado del material de envasado y limpiar/soplar adecuadamente botellas, tapones, garrafas...	Sí	Ningún envase en mal estado	Ausencia de grietas en los envases utilizados	Observando visualmente cada botella	Personal encargado	Cuando sea necesario, dependiendo del sistema de envasado	Sustituir los envases defectuosos o en mal estado	Registro del control del material de envasado
	Cumplir con las especificaciones de envasado del Plan de control de proveedores y con el Plan de mantenimiento de instalaciones, equipos y maquinaria			Inexistencia de materiales en mal estado	Observando visualmente	Personal encargado	Antes de envasar	Revisar y analizar las causas del incumplimiento del Plan de control de proveedores y actuar Si se rompe una botella, se deben derivar las botellas que puedan tener vidrios en el interior	
Versión:		Fecha:		Aprobado por:		Firma:			

2.2.6. Buenas prácticas de elaboración del aceite de oliva virgen

Para que existan unas buenas prácticas de elaboración de los oliva vírgenes debe existir un plan general de higiene. Es decir, que las medidas de higiene que se han definido en el apartado 2.2.2 deben completarse con las propias de unas buenas prácticas de elaboración.

Las fases de elaboración del virgen se adaptan al diagrama de flujo representado en la Figura 2.10' que es la base para el desarrollo del sistema de APPCC de una almazara, ya considerado en el apartado anterior.

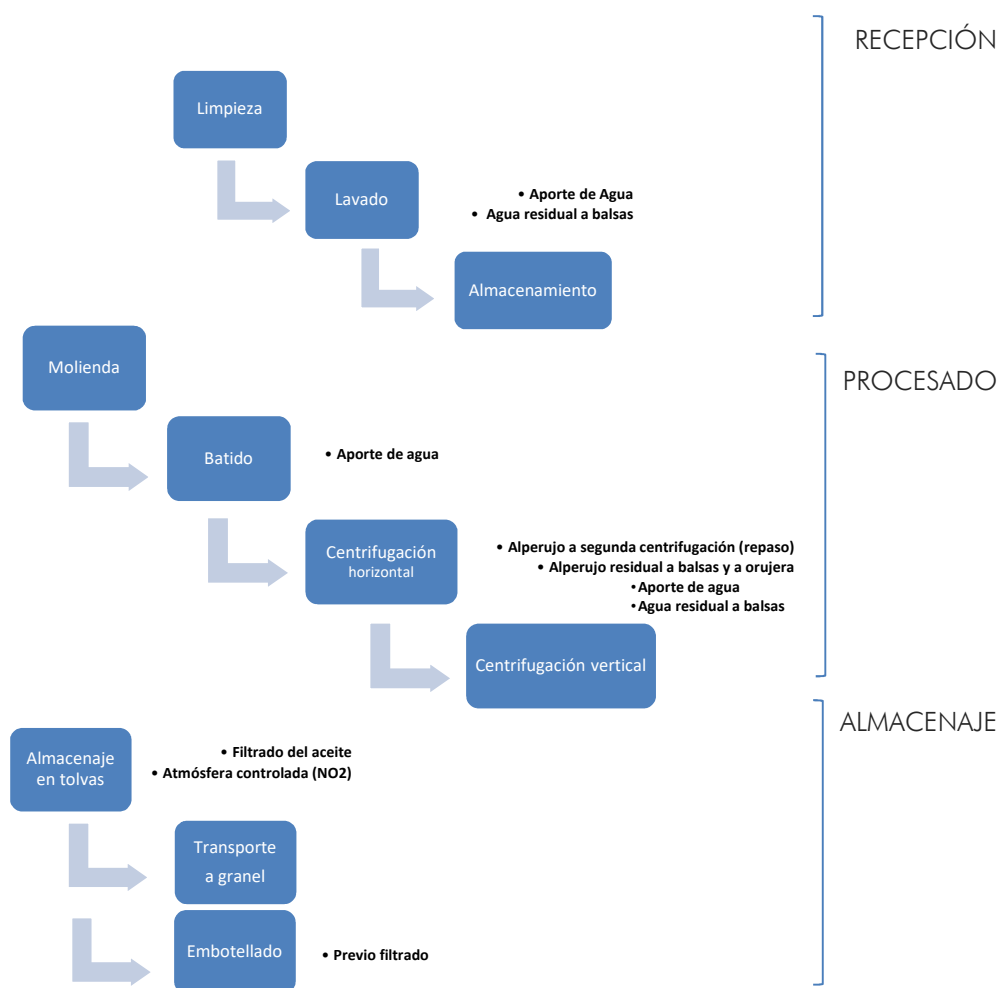


Figura 2.10. Diagrama de flujo de la producción de AOVE (Sistema de dos fases)

Fuente: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012.

En dicho diagrama se plasma el desarrollo de un sistema de producción continuo, llamado de dos fases, que es el más extendido en el territorio donde hemos adquirido las muestras. Este sistema de dos fases está implantado en España en la gran mayoría de las almazaras existentes a día de hoy. Siguiendo las indicaciones del citado diagrama de flujo, las buenas prácticas de elaboración del aceite de oliva virgen, especialmente del “extra”, serán para las distintas labores las siguientes:

-*Recepción.* En la recepción de la materia prima han de tomarse datos de entrada con vistas a la trazabilidad del producto. Así, se identifica al oleicultor, se cuantifica el porte, y detalles como variedad, día y hora de entrega y parcela de origen, y se recaba la conformidad técnica con los buenos usos de productos fitosanitarios y con el respeto de los plazos de seguridad según la legislación. También, se hace conveniente la exigencia tanto del uso de cajas, palés o remolques adecuados, como de su estado higiénico óptimo.

Las aceitunas se deben inspeccionar visualmente por un técnico de patio cualificado, y clasificar según su calidad, procediendo a su retirada en el caso de no cumplir unos mínimos requisitos de conservación. Y las que se admitan han de pasar un análisis de residuos de pesticidas, siendo preceptiva la retirada de homologación al oleicultor que de positivo en dicho análisis.

En relación con los planes de trazabilidad mencionados en el apartado 2.2.4 y antes de seguir con la definición de los siguientes procesos de la elaboración del virgen de oliva, se ha de apuntar que en esta fase de recepción de la aceituna en la que, como se ha expresado, hay que identificar correctamente al oleicultor y catalogar la calidad del género presentado a la almazara, se podría implementar y mejorar los controles de esa trazabilidad mediante la aplicación de tecnologías aplicadas a la información geográfica (SIG-TIC), tanto para ir hacia el lugar de procedencia de la materia prima como para seguir “hacia delante”, al casar posteriormente esos datos georreferenciados de parcelas con los obtenidos en los procesos de extracción, almacenamiento y envasado-expedición (Jaenes, 2007).

Retomando la exposición sobre las buenas prácticas de elaboración de los aceites de oliva vírgenes, los elementos de la maquinaria que estén en contacto con las aceitunas, que nos van a facilitar la recogida, limpieza y transporte hasta las tolvas de

recepción, deben estar supervisados por el correspondiente programa de limpieza y desinfección, dentro del plan general de higiene. Así, el agua utilizada para dicha limpieza tiene que ser potable y gestionada según un plan de control específico de supervisión de su estado y de planificación de su recambio (como parte del programa de control del agua del apartado 2.2.2). En cuanto a la eliminación de la hoja, se considera obligatoria en los sistemas de recogida mecánica, pues éstas afectan a las características químicas y organolépticas del aceite (Cerretani *et al.*, 2009a).

-Almacenamiento de las aceitunas. En el almacenamiento previo a la molienda, las tolvas han de estar incluidas en el citado programa de limpieza y desinfección, procediendo a dicha limpieza cada vez que se vacíen o, al menos, cada 48 horas. Se deberán controlar visualmente para detectar cualquier indicio de contaminación, indicio que, de confirmarse, obligará a desprenderse de la materia contaminada para evitar que continúe en el proceso afectando al resto de materia prima.

-Molienda. La molienda se ha de hacer como máximo 48 horas después de haber cosechado la aceituna (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2012). No obstante, se aconseja que se realice dentro de las 24 horas siguientes a la recolección, para así evitar cualquier principio de deterioro o atrojado del fruto en la tolva, lo que supondría trasladar al aceite resultante defectos organolépticos que le impidan la catalogación de virgen o virgen extra. Es importante regular correctamente la criba, pues debe triturarse tan fino como para romper todas las celdas que contienen el aceite, pero no tanto como para provocar emulsiones. No hay que olvidar, que en este parte del proceso se tiene que seguir aplicando el programa de control del agua que se adiciona, en este caso potable y sin cloro.

-Batido. El batido correcto de la pasta de aceituna se efectúa a una temperatura inferior a los 27°C, si es que el aceite se va a etiquetar con la denominación “extracción en frío”. Si no fuera así, no se deben sobrepasar los 35°C, pues se alterarían por oxidación las cualidades del aceite. Por esto, hay que revisar al menos dos veces al día la temperatura de actuación de las batidoras. Además, el agua utilizada en esta fase también debe seguir el programa de control al uso, tanto para adición como para limpieza. En cuanto a la práctica habitual de incorporar coadyuvantes a las pastas difíciles, para facilitar la extracción del aceite, se debe controlar su adecuada

dosificación y su registro sanitario, que ha de permitir su uso alimenticio y para la obtención de los aceites vírgenes de oliva.

-Extracción del aceite. La extracción del aceite de oliva virgen se suele realizar de forma más común en nuestro país mediante los sistemas continuos de dos y de tres fases, métodos que se basan en la diferencia de densidad del aceite y del agua que permite su separación por centrifugación. El sistema de dos fases es el más extendido, siendo el que requiere de menos aporte de agua. En éste, se produce una fracción de aceite con pequeñas impurezas formadas de alpechín y residuos sólidos, y otra fracción de alpeorujo en una proporción aproximada de 78 kg por cada 100 kg de aceitunas (Cerretani *et al.*, 2009a). Así, tras el paso por los decanter horizontales, el aceite, gracias a esa centrifugación a que se somete, es separado del alpeorujo o mezcla de agua y residuos de la aceituna. Luego, en una segunda centrifugación, operación que requiere del aporte de agua y que se consigue en las llamadas centrifugas verticales (Figura 2.11), se procede a la eliminación de humedad, sólidos finos e impurezas.



Figura 2.11. Centrifugadoras verticales. Fuente: Pieralisi Gruppo.

-Almacenamiento. El aceite resultante de las centrifugas verticales, pasa a almacenarse en las bodegas de las almazaras. De este modo, el almacenamiento se realiza en una zona separada físicamente de la de elaboración que debe reunir una serie de requisitos constructivos que disminuyan al máximo o eliminan los efectos de las oscilaciones de la temperatura ambiente y de la luz, y que permita un fácil mantenimiento higiénico del producto (COI, 2006).

Si el objetivo es un aceite de oliva virgen extra de alta gama, los mejores resultados se obtendrán con un filtrado tras la centrifugación, con filtros de placas y un posterior almacenamiento en bodega con depósitos de acero inoxidable de volúmenes bajos (entre 5 t y 15 t) y en atmósfera inerte. Si en cambio se prioriza la cantidad a la calidad, tras una decantación dinámica se podrá realizar un almacenamiento directo, con un solo filtrado previo a la venta para aceites de calidad inferior. Y si se pretende alcanzar una calidad media, se aplicarán filtros verticales de gran capacidad para un posterior almacenamiento en bodega.

-Envasado. Para el envasado, el aceite virgen almacenado en esos depósitos debe pasar por un filtrado, filtrado denominado de abrillantamiento que evitará cualquier traza de humedad y la formación de pequeños depósitos en el fondo del envase. Este proceso se suele servir de filtros de tierras de diatomeas, o de celulosa, o de placas de papel filtrante. Finalmente, los envases, fabricados en vidrio, metal o PET reciben el aceite en perfectas condiciones, un producto final con una presentación adecuada para su utilización. Se usan envases de distintos tamaños, homologados, que reúnen los requisitos dictados en la legislación aplicable, que influyen en la conservación dependiendo de su permeabilidad al aire, del grado de protección y de su hermeticidad. Porque el oxígeno del aire y la radiación luminosa favorecen el enranciamiento, la oxidación y la pérdida de los colorantes naturales.

Las cadenas de envasado están automatizadas, lo que permite depositar el aceite en el interior del envase elegido con fiabilidad, su encabezamiento con gas inerte para evitar contacto alguno del aceite con el oxígeno, su precintado y su etiquetado según la normativa (Reglamento de Ejecución (UE) nº 29/2012, de la Comisión). La etiqueta recoge la denominación genérica y específica del aceite, así como los demás parámetros físico-químicos según legislación vigente, debiendo reflejar el valor máximo que pudiera alcanzarse en la fecha de duración mínima. Se detalla el contenido neto, en peso o en volumen, la identificación del envasador, fabricante, distribuidor y país de origen, y en este último caso además, de poseerla, la indicación geográfica protegida (IGP) o la denominación de origen protegida (DOP). Los lotes quedan identificados, como resultado de la aplicación del correspondiente plan de trazabilidad, con el mes y el año en que se envasaron y la fecha límite de consumo preferente (Reglamento (CE) 1.019/2002, de la Comisión).

2.3. CONTROL DE CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Son diferentes y variadas las causas que pueden influir en los factores de calidad alimentaria de los aceites de oliva virgen. Entre dichos factores habrían de destacarse los que afectan a la pureza e integridad, y los relacionados con las distintas formas de contaminación, bien procedente del entorno inmediato de producción (fertilizantes, productos fitosanitarios, manipulación en almazara, o trasiego y transporte del aceite) bien por migración del envase. Y también, los que influyen en la calidad sensorial por alteración de sus cualidades organolépticas.

Generalizando, el concepto de calidad del aceite de oliva virgen está relacionado con los valores de los parámetros establecidos legal e internacionalmente para adquirir la catalogación de “virgen extra”, que hacen referencia a sus características físicas, químicas y organolépticas.

2.3.1. Criterios de calidad y pureza

Los criterios de calidad de los aceites de oliva se obtienen de sus parámetros físico-químicos y del análisis sensorial. Los parámetros físico-químicos, principalmente analizados, son los parámetros de acidez, índice de peróxidos, coeficiente de extinción molar K_{268} y K_{232} , humedad y materias volátiles e impurezas insolubles en éter de petróleo. Y el análisis sensorial de sus características organolépticas, se consigue mediante cata realizada por un panel test de expertos acreditados.

En cuanto a criterios de pureza se refiere, los principales testigos se consiguen con un análisis rutinario de triglicéridos, ácidos grasos, ceras, esteroides, eritrodioleína, alcoholes alifáticos, estigmastadienos, monopalmitatos, y disolventes halógenos.

2.3.1.1. Parámetros de calidad

El aceite de oliva puede clasificarse en distintas categorías, como ya se ha

descrito en el apartado 2.1.3. Y existe una gran diferencia en calidades y, por tanto, en precios de compra/venta. De este modo, se ha hecho imprescindible establecer unos criterios analíticos, que permitan diferenciar cada tipo de aceite en función de sus características organolépticas y de sus parámetros físico-químicos.

La calidad de un aceite de oliva se detalla gracias a la combinación de factores ambientales que hacen referencia al lugar geográfico y climático de producción, a factores agronómicos que optimizan los resultados del cultivo, a factores propios de la elaiotecnica como proceso de elaboración del aceite y al factor genético que es la variedad de la aceituna. De este modo, el patrón de calidad máxima, que se corresponde con el de un aceite de oliva virgen extra, exige unas aceitunas en perfecto estado provenientes de un olivo en perfectas condiciones fitopatológicas, recogidas en el envero y entregadas frescas a la molturación; y a unos procesos de extracción, primero, y de almacenamiento después, limpios y que no alteren la naturaleza química y las cualidades organolépticas del zumo oleoso obtenido.

Por tanto, el deterioro que puede sufrir el aceite, desde que se recolecta la aceituna en el campo hasta que, una vez producido, se almacena en la almazara, y que va a condicionar su calidad y catalogación tiene dos orígenes: la hidrólisis o reacción producida entre los triglicéridos y el agua en presencia de agentes enzimáticos que dan lugar a la formación de ácidos libres; o las reacciones de oxidación que rompen las cadenas de ácidos grasos para formar alcoholes, cetonas y aldehídos que provocan el enranciamiento del producto (Cerratani *et al.*, 2009b).

a) Acidez

La acidez es una medida del contenido de ácidos grasos libres, expresado en porcentaje de ácido oleico. De este modo, si la acidez es alta el contenido de ácidos grasos libres es alto, lo que perjudica su calidad.

El método empleado normalmente consiste en una valoración ácido-base, sirviéndose de una disolución etanólica de hidróxido potásico en presencia de fenolftaleína como indicador.

b) Índice de peróxidos

El índice de peróxidos proporciona el grado de oxidación de un aceite, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa.

El método empleado de forma oficial se basa en una volumetría que valora el yoduro formado por oxidación del yoduro potásico echado en el aceite, sirviéndose de una disolución de concentración exacta de tiosulfito sódico.

c) Coeficiente de extinción molar K_{232} y K_{268}

El coeficiente de extinción molar a 268 y 232 nm, se usa para detectar la presencia de compuestos anormales tales como dienos y trienos conjugados, productos de la oxidación secundaria del aceite. Este método se apoya en la medida espectrofotométrica ultravioleta del coeficiente de extinción específica a las longitudes de onda de 232 y 268 nm.

La transparencia en la región de los 268 nm se ve afectada en el proceso de autooxidación, y también como resultado de determinados procesos industriales. Con ello se justifica que el coeficiente de extinción específica a 268 nm se tome como criterio de calidad, que puede modificarse a través del tiempo influido por las condiciones de conservación de la materia grasa.

En cuanto al coeficiente de extinción molar a 232, se utiliza para ver la presencia de hidroperóxidos y dienos conjugados. Dicho de otra forma, se hace una estimación de la oxidación inicial del aceite.

d) Análisis sensorial

El sabor y el aroma, son los parámetros básicos sobre los que se ha de estimar la calidad de los aceites de oliva vírgenes. Y aunque es cierto que la estimación del color puede ser de interés para el estudio en las preferencias de consumo, no se considera aún parámetro obligado de análisis como los anteriores. Esos parámetros se consiguen medir mediante el análisis sensorial en pruebas de panel o panel de cata, que son ensayos organolépticos hechos en condiciones controladas por un grupo de catadores previamente seleccionados y entrenados en técnicas preestablecidas.

El panel de cata de aceites, para evaluar características organolépticas y clasificar los aceites en función de las mismas, debe cumplir los requisitos establecidos en la legislación europea que regula estos productos y en concreto: el Anexo XII del Reglamento (CEE) N° 2.568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, en su última versión; y el Anexo V del Reglamento de Ejecución (UE) n° 1.348/2013 de la Comisión, del 16 de diciembre de 2013.

En nuestro país, existen 21 paneles acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) para este tipo de pruebas. Cada año además, el Comité Oleícola Internacional (COI), en el que están representados la práctica totalidad de los países productores o consumidores de aceites de oliva, otorga su reconocimiento a los paneles de cata que demuestran su competencia en la participación de ensayos periódicos de control.

Los paneles de cata para evaluar aceites de oliva lo forman grupos de entre 8 y 12 personas dirigidos por el jefe de panel. Los catadores analizan las muestras por separado en cabinas, sin interacción ni intercambio de información entre ellos, y, una vez completados los análisis sensoriales individuales, se recogen todos los datos y se obtiene la mediana de cada parámetro a medir como evaluación del panel de cata. Los matices detectados por los catadores se agrupan según sean atributos positivos o atributos negativos (Carrasco *et al.*, 2009).

-Atributos positivos. Dentro de los atributos positivos se consideran los siguientes:

- *Frutado.* Es el conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de las aceitunas, procedentes de frutos sanos y frescos, verdes o maduros y percibidos por vía directa o retronasal.
- *Amargo.* Es el sabor característico que se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual y que se corresponde con el aceite obtenido de aceitunas verdes o en envero.
- *Picante.* Crea una sensación táctil de picor, que se percibe especialmente en la garganta, y que es propio de aceites obtenidos al comienzo de la campaña.

-*Atributos negativos.* Como atributos negativos se tienen en cuenta:

- *Atrojado/borras.* Es el flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas o almacenadas en condiciones que han generado un avanzado grado de fermentación anaerobia, o del aceite en contacto con los lodos de decantación que también han sufrido fermentación anaerobia en trujales y depósitos.
- *Moho-Humedad.* El atributo de moho-humedad hace referencia a un flavor propio de aceites obtenidos de frutos que han desarrollado abundantes hongos y levaduras al haber permanecido amontonados y con humedad durante algunos días.
- *Avinado-avinagrado/ácido-agrio.* Es el flavor que recuerda al vino o vinagre. Provocado por un proceso fermentativo de aceitunas o de los restos de pasta de aceitunas en capachos que no han sido limpiados adecuadamente, que da lugar a la formación de ácido acético, acetato de etilo y etanol.
- *Metálico.* El atributo negativo “metálico” es propio de aceites en contacto prolongado con superficies metálicas durante los procesos de molienda, batido, prensado o almacenamiento.
- *Rancidez.* El atributo negativo “rancio” se detecta en aceites que han sufrido un proceso oxidativo.

Por tanto, un aceite de oliva virgen, para catalogarse como extra, deberá no contener ningún atributo negativo de los aquí relacionados, además de cumplir con todos los parámetros químicos propios de los vírgenes.

2.3.1.2. Parámetros de pureza

El aceite de oliva también es apreciado por sus cualidades nutritivas y sus efectos beneficiosos para la salud. Por ello, su precio en el mercado varía mucho dependiendo de si es un “virgen extra” o es un “refinado”, por ejemplo. Así, en muchas ocasiones se ha tratado de adulterar mezclándolo con aceites de inferior calidad y, por tanto, más baratos, llegando incluso a poner en peligro la salud de los consumidores. Por esto,

organismos internacionales como el COI, o la Comisión del *Codex Alimentarius*, han establecido una relación de métodos de control de la pureza de los aceites de oliva comercializados, métodos de análisis que se han incorporado a la legislación europea y, por tanto, también a la legislación española:

a) Análisis de la fracción insaponificable

Previamente al análisis es necesario saponificar la materia grasa, añadiendo un patrón interno con disolución etanólica de hidróxido potásico, para luego extraer la fracción insaponificable con éter dietílico.

-*Composición de esteroides*. Es específica de cada tipo de aceite, es uno de los parámetros de pureza tenidos en cuenta. Así, en el aceite de oliva virgen el β -sitosterol es el principal esteroide además del campesterol, por lo que si se apreciara otros esteroides quedaría indicada la adulteración posible por mezcla con otras grasas. También, el esteroide total es mucho más elevado en los aceites de oliva vírgenes, lo cual es motivo de distinción entre uno puro y otro mezclado con refinados, que tendría menor contenido de dichos esteroides totales.

-*Presencia de eritrodioleína y uvaol*. Su presencia en un aceite de oliva virgen demuestra la mezcla con aceites de orujo de oliva, pues estos últimos poseen una mayor proporción de esos compuestos (Quirantes *et al.*, 2009).

-*Análisis del contenido de ceras*. Las ceras son ésteres grasos que encontramos en la aceituna de forma natural, en la piel y también en las hojas. El aceite de oliva virgen las adquiere, en cantidades mínimas, en el proceso de extracción, durante el batido de la pasta (batidora). El análisis del contenido de ceras mediante análisis cromatográficos, debe arrojar contenidos en el aceite de oliva virgen menores a 250 mg/kg. Entonces, al aumentar la temperatura por encima de los 27°C facilitamos la extracción de las ceras incorporadas al aceite de oliva. Pero en cantidades superiores a esos 250 mg/kg hacen pensar en la presencia por adulteración de aceites de orujo.

-*Determinación de estigmastadienos*. También, con la determinación o presencia de estigmastadienos se enriquecen, completándose, los métodos basados en el estudio de la fracción insaponificable para la detección de posibles adulteraciones del aceite de

oliva virgen. Los estigmastadienos en el aceite de oliva virgen han de estar en cantidades inferiores a los 0,10 mg/kg. Si no, es síntoma de anomalías de adulteración con aceites provenientes del refino, donde las altas temperaturas de los procesos de refinado, de decoloración o de desodorización provocan que los datos de este elemento para dichos aceites sean superiores a esos 0,10 mg/kg.

b) Análisis de la fracción saponificable

Estos tipos de determinaciones son más complejas que las necesarias para determinar los parámetros de calidad, por lo que se requiere de una mayor sofisticación en las técnicas analíticas, recurriendo a cromatografías de gases, a cromatografías líquidas de alta resolución o a la electroforesis capilar.

-Análisis de la composición de los ácidos grasos. Los ácidos grasos forman parte de la fracción saponificable del aceite. Suelen ser sus componentes fundamentales y mayoritarios. Dichos ácidos grasos no suelen encontrarse libres, sino formando ésteres, habitualmente con la glicerina, para dar lugar a los glicéridos (mono, di y triglicéridos) y fosfátidos. Hay que observar, que la composición de la fracción de ácidos grasos varía mucho según las variedades de aceituna, sobre todo en los ácidos grasos mayoritarios (palmítico, oleico y linoleico). Y también, que son los ácidos grasos minoritarios (mirístico, hexadecanoico, hexadecenoico, linolénico, araquídico, eicosenoico, behénico y lignocérico) los que determinan la posible adulteración de los aceites de oliva.

Centrando por tanto el análisis en la fracción saponificable del aceite, y atendiendo en este caso a la composición específica de esos ácidos grasos característicos, se puede detectar por ejemplo la adulteración con aceites de ésteres sintéticos. Concretamente, quedaría probada dicha adulteración si la proporción de ácidos grasos saturados en la posición 2 del glicerol en el aceite fuera inusualmente mayor, puesto que en dicha posición deben estar los ácidos grasos insaturados.

-Valoración del contenido de triglicéridos con ECN42. Observando la diferencia entre contenido real y contenido teórico en triglicéridos con ECN42 se averiguan las posibles adulteraciones con aceites de semilla. Los triglicéridos totales se obtienen sumando ácidos grasos saturados, poliinsaturados y monoinsaturados. Valores superiores indican presencia de aceites de semillas en el aceite de oliva virgen.

En la Tabla 2.4 se recogen los parámetros en vigor que la Comisión Europea ha legislado para estas determinaciones de calidad y pureza en los aceites de oliva y orujo de aceituna.

Tabla 2.4. Parámetros de calidad y pureza de aceites de oliva vigentes. Anexo 1, DOUE nº 338 (17/12/13)

ANEXO I

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) mg/kg (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos mg/kg (†)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (‡) (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	FAEEs ≤ 40 (campaña 2013-2014) (‡) FAEEs ≤ 35 (campaña 2014-2015) FAEEs ≤ 30 (campañas posteriores a 2015)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (†)	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (‡)	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 si el % total de ácido palmítico es > 14 %							

Tabla 2.4. (cont.)

Categoría	Ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEs) mg/kg (*)	Acidez (%) (*)	Índice de peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadienos mg/kg (†)	Diferencia: ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (‡) (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ o K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación organoléptica Mediana del frutado (Mf) (*)
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 si el % total de ácido palmítico es ≤ 14 % ≤ 1,0 si el % total de ácido palmítico es > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350 (¶)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(†) Total de isómeros que han podido (o no han podido) separarse con columna capilar.

(‡) El aceite de oliva debe estar en conformidad con el método establecido en el anexo XX bis.

(§) Este límite se aplica a los aceites de oliva producidos a partir del 1 de marzo de 2014.

(¶) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodil y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

(§) O cuando la mediana de los defectos es superior a 3,5 o la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.

(¶) Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de orujo de oliva crudos si el contenido total de alcoholes alifáticos es superior a 350 mg/kg y si el contenido de eritrodil y uvaol es superior al 3,5 %.

Categoría	Composición de ácidos grasos (†)						Sumas de los isómeros transoleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinoleicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodil y uvaol (%) (¶)
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocénico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol (‡) (%)	Estigmasterol (%)	β-sitosterol aparente (%) (‡)	Delta-7-estigmatenol (‡) (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (¶)
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

Tabla 2.4. (cont.)

Categoría	Composición de ácidos grasos ⁽¹⁾						Sumas de los isómeros transoleicos ⁽²⁾	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinolenicos ⁽²⁾	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) ^(**)
	Mirístico (%)	Linolénico (%)	Araquídico (%)	Eicosenoico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol ⁽³⁾ (%)	Estigmasterol (%)	β -sitosterol aparente (%) ⁽⁴⁾	Delta-7-estigmastenol ⁽⁵⁾ (%)		
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva crudo	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁶⁾
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; heptadecanoico: ≤ 0,30; heptadecenoico: ≤ 0,30; esteárico: 0,50-5,00; oleico: 55,00-83,00; linoleico: 3,50-21,00.

⁽²⁾ Véase el apéndice del presente anexo.

⁽³⁾ β -sitosterol aparente: delta-5,23-estigmastadienol + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

⁽⁴⁾ Se considera que los aceites con un contenido de ceras entre 300 mg/kg y 350 mg/kg son aceites de oliva lampantes si el contenido total de alcoholes alifáticos es inferior o igual a 350 mg/kg o si el contenido de eritrodiol y uvaol es inferior o igual al 3,5 %.

⁽⁵⁾ Los aceites con un contenido de ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es superior al 3,5 %.

Notas:

- Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica. La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.
- Es suficiente con que una sola de las características no se ajuste a los valores indicados para que el aceite cambie de categoría o se declare no conforme en cuanto a su pureza, a efectos del presente Reglamento.
- Las características indicadas con un asterisco (*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente: - en el caso del aceite de oliva lampante, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes; - en el caso de los aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de al menos uno de estos límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificándose en una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.
- Las características indicadas con dos asteriscos (**) implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.

2.3.2. Organismos reguladores del aceite de oliva virgen

A continuación, se van a considerar los principales organismos internacionales encargados de la regulación de los aceites de oliva, de mayor a menor importancia según su especialización en dicho producto.

a) Consejo Oleícola Internacional (COI)

Es el único organismo internacional dedicado exclusivamente al aceite de oliva, aceites de orujo de oliva y aceitunas de mesa. Fue creado en Madrid (España) en 1959 con la protección de las Naciones Unidas. El COI trabaja de forma influyente en el desarrollo responsable y sostenible del olivar y se constituye en un foro mundial de debate sobre políticas a adoptar y donde se discute y se alumbran los nuevos retos del sector.

Las principales encomiendas del COI empiezan con la promoción en un entorno de cooperación técnica internacional, gracias al fomento de proyectos de investigación y de actividades docentes y formativas, o de transferencias de tecnología. También, se asumen los retos organizativos necesarios y tendentes a la expansión del comercio internacional del aceite de oliva, del aceite de orujo de oliva y de las aceitunas de mesa, contribuyendo a la creación de marcos normativos comerciales y de calidad aplicables a dichos productos del olivar, como por ejemplo la Norma COI COI/T.15/NC n°3/Rev. 1, de 5 de diciembre de 2003, norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva.

Otra faceta admitida en el plan de trabajo del COI, más novedosa y que entronca directamente con las tendencias políticas y sociales más sensibles con el futuro del planeta, persigue la aplicación de mejoras que minimicen el impacto ambiental tanto del cultivo del olivar como de la industria transformadora olivarera.

Entrando en el campo de la divulgación, El COI no cesa en la promoción del consumo internacional del aceite de oliva, mediante campañas que, no solo intentan afianzar su consumo en los países cuya cultura culinaria contiene esta grasa como referente, sino que pretenden la introducción en otras sociedades que no la conocen, aprovechándose de sus demostrados beneficios para la salud y de la buena disposición

y aceptación como posible alimento saludable dentro de la marca “dieta mediterránea”.

La difusión de información y estadísticas fiables sobre el mercado mundial del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa, es otra de las líneas de trabajo del COI. También, la responsabilidad de organizar encuentros periódicos entre representantes institucionales, expertos y empresarios para afrontar los problemas y pretensiones del sector.

Entre sus actuales miembros se cuentan los principales países productores e importadores mundiales de aceite de oliva y de aceitunas de mesa, hasta tal punto que abarcan casi el 100% de la producción mundial de aceituna, producción que se desarrolla principalmente en la región mediterránea.

En 2005 se negoció en Ginebra, con la protección de Naciones Unidas, el Convenio Internacional del Aceite de Oliva y de las Aceitunas de Mesa. Tal convenio fue aceptado tanto por nuestro país como en el resto de países miembros del COI (BOE nº 268, de 8 de noviembre de 2007). En éste convenio, se previeron nuevas herramientas de apoyo a la labor del COI, con vistas a su adaptación a los diferentes retos del sector. La apuesta por la calidad del producto fue esencial en este nuevo marco, para así poder equilibrar oferta y demanda y, a su vez, intentar promocionar mejor el producto. Además, se persiguió la protección y conservación del medio ambiente gracias a la promoción del establecimiento de diversas medidas tendentes a la minimización del impacto medioambiental de la muy contaminante industria olivarera.

El convenio de 2005 fue prorrogado en 2014, y se mantuvo en vigor hasta el 31 de diciembre de 2016. El nuevo convenio ha entrado en vigor el 1 de enero de 2017 (Naciones Unidas, 2015), para marcar, según el texto aprobado, los objetivos principales de trabajo en las siguientes materias:

-Normalización e investigación

-Cultivo del olivo, tecnología oleícola y cooperación técnica

-Promoción de productos oleícolas, divulgación de información-economía oleícola.

b) Organización de la Alimentación y la Agricultura (FAO)

La Food and Agriculture Organization (FAO) es una organización intergubernamental cuya sede central está en Roma (Italia), y posee también delegaciones en 130 países. La conforman a modo de miembros 194 naciones, además de otras dos como asociadas y de una organización miembro, la Unión Europea. Sus empleados provienen de diferentes ámbitos culturales y son expertos en los múltiples campos de actividad que abarca. La FAO genera, desarrolla y adapta herramientas y directrices existentes y proporciona apoyo a la gobernanza de los distintos países que la forman, orientando y proporcionando recursos a través de su red de oficinas. La FAO se compone de seis departamentos: Agricultura y Protección del Consumidor; Desarrollo Económico y Social; Pesca y Acuicultura; Silvicultura; Servicios corporativos y Cooperación técnica y de gestión de programas.

Los objetivos actuales de trabajo de la FAO se centran en ayudar a eliminar el hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición, hacer más productivas y sostenibles la agricultura, la silvicultura y la pesca, reducir la pobreza rural, permitir que los distintos sistemas agrícolas y alimentarios sigan siendo eficientes y no desaparezcan por el peso de la globalización, y ayudar en la capacidad de respuesta de los medios de vida y producción de la población ante crisis sobrevenidas (FAO-Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria, 2009).

En 1963 la FAO impulsó, mediante una Comisión de trabajo, el *Codex Alimentarius* o "Código de Alimentos", que fue establecido junto a la Organización Mundial de la Salud (OMS) para desarrollar normas alimentarias internacionales armonizadas, que protegieran la salud del consumidor y promovieran unas prácticas equitativas en el comercio de alimentos. Así, el *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 2015) o "Código Alimentario" es el resultado de la labor de dicha Comisión y de sus comités técnicos, que son aproximadamente 20, tratándose de un compendio de normas alimentarias, directrices y códigos de prácticas concertados internacionalmente.

Las normas del *Codex*, que en la mayoría de los casos se aprueban por consenso, están basadas en los mejores conocimientos científicos y técnicos disponibles. El *Codex* es el único foro internacional que reúne a científicos, expertos técnicos, autoridades gubernamentales de reglamentación, y organizaciones internacionales de consumidores y de la industria. En muchos países se celebran reuniones públicas para

recibir observaciones sobre los proyectos de textos del Codex y preparar las posiciones nacionales.

Dentro del Codex existe normativa específica para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva (Codex Stan 33-1981), que ha sido revisada en los años 1989, 2003, 2015 y 2017, y enmendada en 2009 y 2013. No obstante, los textos del Codex son de aplicación voluntaria y no vinculante.

En las controversias comerciales internacionales es posible citar las normas y directrices del Codex como textos de referencia de la Organización Mundial del Comercio (OMC). Mediante la promulgación de leyes y reglamentos coherentes con las normas y directrices del Codex, los gobiernos pueden reducir el riesgo de que se les plantee una reclamación ante un grupo especial de solución de diferencias de la OMC. Así, un gobierno puede adoptar su propio nivel de protección, superior o inferior al establecido por el Codex. Si elige un nivel de protección más elevado, en caso de controversia comercial se le podrá pedir que justifique con argumentos científicos, sanitarios, o por otros motivos legítimos la adopción de medidas sanitaria coherentes con el nivel de protección que ha adoptado. Por esto, en muchos países la mayor parte de la legislación alimentaria ya está en armonía con el Codex.

c) Federación de Asociaciones de Aceites, Semillas y Grasas (FOSFA)

La FOSFA es, además de asociación internacional profesional, cuerpo arbitral que concierne exclusivamente al comercio mundial de semillas oleaginosas, aceites y grasas, y cuenta con 1.103 miembros en 89 países. Estos miembros incluyen productores y procesadores, transportistas y distribuidores, comerciantes, corredores y agentes, superintendentes, analistas, armadores, agentes marítimos, empresas de almacenamiento del tanque, árbitros, consultores, abogados, compañías de seguros y otros, que prestan servicios a los comerciantes.

FOSFA cuenta con una amplia gama de formas estándar de contratos relativos a mercancías cargadas para la soja, semillas de girasol, de colza y otros, los aceites de pescado y grasas (aceites y grasas refinadas) de todas las zonas comerciales del mundo, para diferentes métodos de transporte y diferentes relaciones de intercambio. Internacionalmente, el 85% del comercio mundial de aceites y grasas se comercializa

bajo contratos FOSFA, que incorporan un procedimiento de controversia relacionada con el arbitraje de personas con experiencia dentro del comercio.

d) Organización Mundial del Comercio (OMC)

La OMC debe su existencia y basa sus actuaciones en las premisas surgidas de las negociaciones mantenidas en el período 1986-1994, la llamada Ronda Uruguay, y de anteriores negociaciones en el marco del Acuerdo General sobre Aranceles Aduaneros y Comercio (GATT). Actualmente, proyecta su trabajo inspirada en el “Programa de Doha para el Desarrollo”, iniciado en 2001.

La labor de la OMC no se centra sólo en la apertura de los mercados, también a veces sus normas permiten mantener obstáculos comerciales, por ejemplo para proteger a los consumidores o para impedir la propagación de enfermedades.

Constituyen el núcleo de la OMC los denominados Acuerdos de la OMC (Ronda Uruguay, 1986-1994), negociados y firmados por la mayoría de los países que mantienen intercambios comerciales. Esos documentos establecen las normas jurídicas fundamentales del comercio internacional. Son en lo esencial contratos que obligan a los gobiernos a mantener sus políticas comerciales dentro de límites convenidos. Son negociados y firmados por los gobiernos, pero su finalidad es ayudar a los productores de bienes y servicios, a los exportadores y a los importadores - de entre todos ellos, a los que se centran en el comercio de los aceites y grasas comestibles - a desarrollar sus actividades, si bien permitiendo que los gobiernos alcancen objetivos sociales y ambientales.

Entonces, el propósito principal es contribuir a que el comercio fluya con la mayor libertad posible, porque eso es importante para el desarrollo económico y el bienestar; y ello conlleva, en parte, la necesidad de eliminar obstáculos. También requiere asegurarse de que particulares, empresas y gobiernos, conozcan cuáles son las normas que rigen el comercio en las distintas partes del mundo, de manera que puedan confiar en la seguridad jurídica y política.

Los acuerdos, incluidos los negociados laboriosamente en el sistema de la OMC, tienen muchas veces que ser interpretados. Y la forma más armoniosa de resolver estas

diferencias es mediante un procedimiento imparcial basado en un fundamento jurídico convenido. Ese es el propósito del sistema de solución de diferencias integrado en los Acuerdos de la OMC.

Por ejemplo y centrándonos en el comercio de los aceites comestibles, en 2008 la OMC dio la razón a la Unión Europea frente a México en una disputa por la imposición de aranceles a las exportaciones europeas hacia dicho país, pues se violaban las reglas internacionales del comercio, e instó a este último a eliminar los aranceles que imponía al aceite de oliva europeo (Diferencia DS-341-México, 2008).

La UE es miembro de pleno derecho de la OMC, además de cada uno de sus Estados miembros. Cualquiera que pretenda incorporarse a la organización deberá sentarse a negociar aportando representantes a un grupo de trabajo. Si el resultado es positivo, se formalizará mediante contrato de adhesión, aprobado por el CG o la Conferencia, que deberá aceptar el nuevo estado miembro con las condiciones en materia económica y política que se exijan en su caso.

2.3.3. Legislación de los aceites vegetales comestibles

La legislación alimentaria genérica está relacionada con la seguridad, y avanza desde una concepción global hacia los diferentes subsectores específicos y sectores especiales. En primer lugar, se parte de aspectos generales de la legislación tales como la higiene alimentaria, el etiquetado, los aditivos, la trazabilidad, el registro general sanitario o los materiales en contacto con alimentos. Y desde estos aspectos genéricos se pasa a los aspectos específicos. Así, la legislación en vigor de Seguridad Alimentaria trabaja en un nivel horizontal o genérico, y un nivel vertical que regula las cuestiones más específicas.

Para cualquier producto que sea un alimento destinado al consumo humano existe una legislación horizontal que le es aplicable y que hace referencia a:

1. Almacenamiento, conservación y transporte
2. Comercio

3. Contaminantes en alimentos
4. Control oficial
5. Etiquetado y publicidad
6. Higiene general de los productos alimenticios
7. Materiales en contacto con los alimentos
8. Organismos y procedimientos
9. Residuos de plaguicidas
10. Seguridad alimentaria

En cuanto a la legislación particular para el producto “aceites de oliva vírgenes” le es de aplicación la que hace referencia a grasas y comestibles, y dentro de ésta la que específica sobre aceites vegetales comestibles. También, existen normas de calidad y guías de fabricación del sector, como por ejemplo la “Guía de Prácticas Correctas de Higiene para la Elaboración de Aceite de Oliva Virgen”, publicada por la Generalitat de Catalunya en 2012 y reconocida a su vez por las autoridades competentes en materia de seguridad alimentaria de Cataluña.

A este tipo de normativas se le unen los estudios al respecto que se publican por diferentes entidades divulgadoras o empresas del sector, como por ejemplo GEA Westfalia Separator Ibérica S.A. -Centro Internacional de Excelencia para Aceite de Oliva, que en 2013 editó un estudio recopilatorio multidisciplinar titulado “El Sector de Elaboración de Aceite de Oliva” (Parras *et al.*, 2013), con artículos, estudios y resúmenes de los aspectos novedosos y, al mismo tiempo, básicos para un entendimiento adecuado del olivar y del proceso de elaboración del aceite de oliva, su comercialización, sus variedades o su distribución.

La legislación alimentaria para aceites vegetales aplicable en nuestro país se considera a continuación, en la Tabla 2.5, indicando sus sucesivas modificaciones.

Tabla 2.5. Legislación sobre aceites vegetales vigente en España

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
<i>Reglamento (CEE) 2.568/91, de la Comisión, de 11 de julio (DOCE n° 248, de 5 de septiembre), relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis</i>	Reglamento (CE) 379/1999 de la Comisión, de 19 de febrero
	Reglamento (CE) 455/2001 de la Comisión, de 6 de marzo
	Reglamento (CE) 796/2002, de la Comisión, de 6 de mayo
	Reglamento (CE) 1.989/2003, de la Comisión, de 6 de noviembre
	Reglamento (CE) 702/2007 de la Comisión, de 21 de Junio
	Reglamento (CE) 640/2008, de la Comisión, de 4 de julio
	Reglamento (UE) 61/2011, de la Comisión, de 24 de enero
	Reglamento de ejecución (UE) 299/2013, de la Comisión, de 26 de marzo
	Reglamento de ejecución (UE) 1.348/2013, de la Comisión, de 16 de diciembre
	Reglamento Delegado (UE) 2015/1.830, de la Comisión, de 8 de julio de 2015, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis (DOUE L núm. 266, de 13 de octubre de 2015, páginas 9 a 13)
<i>Reglamento (CEE) 2.081/92, del Consejo, de 14 de julio, sobre la protección de las indicaciones geográficas y las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios</i>	<i>Reglamento (CE) 692/2003, del Consejo, de 8 de abril</i>
<i>Reglamento (CE) n° 2.815/98 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1998, relativo a las normas comerciales del aceite de oliva</i>	
<i>Reglamento 1.019/2002 (CE) de la Comisión, de 13 de junio, sobre normas de comercialización del aceite de oliva</i>	Reglamento (CE) 1.964/2002, de la Comisión, de 4 de noviembre
	Reglamento (CE) 1.176/2003 de la Comisión, de 1 de julio
	Reglamento (CE) 1.183/2008, de la Comisión, de 28 de noviembre

Tabla 2.5. (cont.)

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Reglamento (UE) 1.308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1.037/2001 y (CE) n° 1.234/2007. En su Anexo VII parte VIII, se establece las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Así mismo, establece los aceites que podrán comercializarse al por menor	
ESPAÑA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Decreto 2.484/1967, de 21 de septiembre, aprobando el Código Alimentario Español. Capítulo XVI-Grasas Comestibles, Sección 2ª- Aceites de Oliva	
Real Decreto 3.000/1979, de 7 de diciembre, sobre regulación de procesos industriales en el sector del aceite de oliva. (BOE n° 16 de 18 de enero de 1980)	
Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles	
	Real Decreto 2.813/1983, de 13 de octubre
	Real Decreto 259/1985, de 20 de febrero
	Real Decreto 1.043/1987, de 24 de julio
	Real Decreto 475/1988, de 13 de mayo
	Real Decreto 494/1990, de 16 de marzo
	Real Decreto 98/1992, de 7 de febrero
	Real Decreto 538/1.993, de 12 de abril
	Real Decreto 1.909/1995, de 24 de noviembre
<i>Orden de 13 de enero de 1986 por la que se aprueba la lista positiva de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso en la elaboración de aceites vegetales comestibles</i>	
Real Decreto 2.551/1986, de 21 de noviembre, de regulación de la elaboración y comercialización de aceites de orujo refinado y de oliva	
<i>Orden de 26 de enero de 1989 por la que se aprueba la Norma de Calidad para los Aceites y Grasas Calentados</i>	
Real Decreto 1431/2003, de 21 de noviembre, por el que se establecen determinadas medidas de comercialización en el sector de los aceites de oliva y aceite de orujo de oliva	

Tabla 2.5. (cont.)

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIÓN
Resolución de 27 de Octubre de 2003, de la Secretaría General de Agricultura y Pesca, sobre buenas prácticas en el sector oleícola de Andalucía para mejorar la calidad de sus producciones.	
Ley 5/2011, de 6 de octubre, del Olivar de Andalucía	

3. PRESENCIA DE METALES TRAZA EN ALIMENTOS. INTERACCIÓN ENVASE-ALIMENTO

En este tercer capítulo de la Tesis Doctoral se habla de los contaminantes químicos y de la toxicidad en alimentos, relacionando qué compuestos pueden llegar a ser tóxicos. Se hace mención a los distintos materiales de envasado, incluyendo el polietilentereftalato (PET), entre cuyos catalizadores utilizados para su fabricación se puede encontrar la fuente de toxicidad por migración al alimento, principalmente el antimonio.

Completando el capítulo, se relaciona la actual legislación sobre metales pesados en alimentos y aceite de oliva virgen, y sobre materiales en contacto con aquellos. Al mismo tiempo, se hace una revisión bibliográfica para la determinación de metales en alimentos y en particular, en aceites de oliva vírgenes, donde las muestras hayan estado sometidas a tratamientos térmicos, para su posterior comparación con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

3.1. CONTAMINANTES QUÍMICOS EN ALIMENTOS

Los contaminantes son sustancias que no han sido añadidas intencionadamente a los alimentos, pero que se encuentran en los mismos como resultado de las distintas etapas que se siguen a lo largo de toda la cadena alimentaria: producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, envasado, transporte y almacenamiento; o como consecuencia de la contaminación medioambiental (AECOSAN, 2016).

Las posibilidades de que un alimento se contamine, comienzan desde el momento de su cosecha y continúan hasta el momento en que es consumido. Aunque hay numerosas clasificaciones, como la que los agrupa por su estructura química, respuesta biológica y grupo de alimentos, o la que los diferencia por su origen; o bien la que hace distinción entre residuos en los alimentos y sustancias nocivas en los alimentos naturales, se ha creído más oportuno elegir por su sencillez la más general y clásica, la que habla de dos amplias categorías de contaminantes en alimentos: los contaminantes bióticos y los contaminantes abióticos (Ortega *et al.*, 2002).

-*Contaminantes bióticos*. Son por ejemplo, las bacterias, hongos, virus o parásitos. Esta categoría puede provocar tox infecciones alimentarias, es decir, síntomas más o menos graves en la mayoría de los casos en un tiempo corto.

-*Contaminantes abióticos*. Comprenden las sustancias químicas de origen natural (micotoxinas), los residuos de medicamentos de uso veterinario (antibióticos, hormonas), los metales pesados como el mercurio, y otros residuos tales como los pesticidas, introducidos de forma involuntaria o accidental en los alimentos durante su cultivo, su elaboración y su transporte o envasado.

El que un contaminante pueda suponer un riesgo para la salud o no, depende de muchos factores, entre ellos la absorción y la toxicidad de la sustancia, el nivel presente en el alimento, la cantidad de alimentos contaminados que se consumen y el tiempo de exposición a ellos.

Además, las personas tienen diferentes sensibilidades a estos compuestos químicos, y hay otros factores de la dieta que pueden influir en sus consecuencias

tóxicas. En interés de la salud pública, los contenidos en estos contaminantes deben mantenerse en niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico, y que sean compatibles con las prácticas profesionales correctas. Así, el Reglamento (CEE) n° 315/93 del Consejo, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios, constituye el marco legislativo actual en esta materia, determinando tres líneas principales de actuación:

- Salud pública. Se prohíbe la comercialización de productos alimenticios que contengan contaminantes en proporciones inaceptables respecto de la salud pública y en particular desde el punto de vista toxicológico.
- Buenas prácticas de fabricación. Los contaminantes deberán mantenerse al mínimo nivel posible mediante prácticas correctas en todas las fases de la cadena alimentaria, desde producción hasta el consumo.
- Salud pública y mercado interior. A fin de proteger la salud pública, se establecerán los límites máximos cuya tolerancia pudiese resultar necesaria por lo que respecta a determinados contaminantes.

Esos límites máximos se encuentran establecidos en el Reglamento 1.881/2006, de la Comisión Europea, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y constituyen una lista comunitaria no exhaustiva, ya que no se regulan todos los contaminantes en todos los alimentos, sino solo aquellos que puedan suponer un problema para la salud pública.

3.1.1. Metales presentes en alimentos

Los metales presentes en los alimentos proceden de forma natural de la disolución de las rocas, aunque algunos deben su presencia a las prácticas de cultivo que fomentan el uso de plaguicidas y fertilizantes. Estos metales se clasifican según su nivel de concentración en macroelementos, microelementos y elementos traza-ultratraza.

En la Tabla 3.1 se resaltan los minerales que, por ser deseables para nuestra dieta e imprescindibles para mantener la salud, se reconocen como nutrientes. Del resto,

como metales indiscutiblemente tóxicos para el organismo se consideran el plomo, el mercurio, el arsénico, el cadmio, el estaño y el aluminio.

Ahora bien, aunque un metal sea considerado como un nutriente beneficioso para el organismo, una cantidad inusual puede crear toxicidad o la generación de una patología grave en el caso de ingesta de los alimentos que lo contienen (Coultate, 2007).

Tabla 3.1. Elementos minerales en la tabla periódica (Coulatae, 2007)

H													B	C	N	O	F
Li	Be												Al	Si	P	S	Cl
Na	Mg												Ga	Ge	As	Se	Br
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn		In	Sn	Sb	Te	I
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd						

De entre esos minerales nutricionalmente deseables, sean macro, microelementos o elementos traza, los de menor peso molecular son los que más comúnmente forman parte de nuestra dieta. Estos son:

- Macro-elementos (g/kg) tales como el sodio, fósforo, potasio, magnesio, calcio y cloro.
- Micro-elementos (mg/kg), entre los que se destacan hierro, cobre, cinc, selenio y yodo.
- Elementos-traza u oligoelementos ($\mu\text{g/kg}$ o ng/kg). Aunque micro-elementos, son esenciales a menores cantidades para los procesos vitales. Son el boro, el silicio, el vanadio, cromo, manganeso, cobalto, níquel y molibdeno (Coulter, 2007). Algunos de ellos pueden ser tóxicos en cualquier concentración, y otros, siendo indispensables, sólo se consideran tóxicos al superar ciertos niveles (Calvo y Mendoza, 2012).

Los diferentes metales tóxicos pueden llegar a incorporarse a los alimentos por distintos medios, tales como:

- La tierra en la que crecen los productos que consumimos, o de los que se alimentan los animales. Así, unos altos niveles de plomo, cadmio, mercurio u otros metales son propios de zonas de actividad siderúrgica y de gran

extracción minera; también en las proximidades de centrales térmicas de carbón, o en las proximidades de grandes vías de comunicación, o en las cercanías a ciudades con gran concentración de automóviles.

- Los residuos de los fangos, o los fertilizantes y otros productos químicos que se utilizan en suelos agrícolas, conocidos como residuos agrícolas tóxicos. De este modo, la utilización no controlada de fertilizantes en agricultura, o el uso de purines como fertilizantes, también aportan al suelo algunos metales como el cobre, cadmio y cinc. Estos son absorbidos por las plantas, ingresando así en la cadena trófica. Además de los efectos tóxicos que por sí pueden producir, se conocen interacciones entre ellos. El cadmio por ejemplo, es capaz de interaccionar tanto con el cinc como con el cobre, hierro, manganeso o calcio (Calvo y Mendoza, 2012).
- El agua utilizada para beber, cocinar o procesar los alimentos. Por eso, las aguas residuales y sus lodos de depuración son estudiados para determinar la biología de esos lodos (microorganismos), los elementos traza (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, y Zn) y los micro-contaminantes orgánicos (pesticidas, hidrocarburos, disolventes clorados, detergentes, etc.). Entre los elementos traza, el mercurio, el plomo y el cadmio se conocen como “metales pesados” y presentan un riesgo eco-toxicológico al igual que otros elementos traza, pues no son biodegradables y se pueden acumular por tanto en el medio (Moll y Moll, 2006).
- La suciedad contaminante, como por ejemplo los restos de tierra de las hortalizas que no son lavadas correctamente.
- Los recipientes, utensilios y equipos utilizados en el procesado, almacenamiento o cocinado de los alimentos (Coulter, 2007). También, algunos envases que están en contacto con el alimento y que sirven para su comercialización pueden llegar a ser otra fuente de contaminación por metales pesados.
- El aire, es otro medio de transmisión de la contaminación. Es un hecho conocido que el contenido en metales pesados de los vegetales cultivados en zonas rurales es inferior al de los cultivados en parcelas cercanas a autopistas o carreteras muy transitadas.
- Los ríos y mares son también depositantes de contaminación, pues son receptores tanto de vertidos de aguas fecales mal depuradas, como de aguas

tratadas o utilizadas en la actividad industrial, principalmente químicas, aunque también del ramo de las agroalimentarias tales como entamadoras, macro-granjas porcinas, etc.

3.1.2. Toxicidad

La toxicidad es el grado de efectividad de una sustancia tóxica, según definición de la Real Academia Española de la Lengua (RAE, 2019). Se trata por tanto de una medida que se emplea para identificar al nivel tóxico de diversos fluidos o elementos, bien por su afección a un organismo en su totalidad (por ejemplo, el cuerpo del ser humano), o bien por su influencia en una subestructura (una célula). La toxicidad de algo depende de múltiples factores, como el tiempo de exposición a la sustancia en cuestión, el número de veces que se ha estado expuesto y la vía de ingesta o administración. Así, se habla de exposición aguda cuando un único contacto puede provocar un daño severo, mientras que la exposición crónica es aquella que involucra a una toxina afectando durante un tiempo extenso.

La intoxicación, o acción de un agente tóxico sobre un organismo vivo es un proceso modulado principalmente por el carácter tóxico del agente, el sistema biológico atacado, la vía o ruta de absorción del agente tóxico, el tiempo de incidencia del citado agente y la vía de excreción de los tóxicos (orina, leche, bilis, heces, sudor) (Valle y Lucas, 2000)

La clasificación de elementos traza, en tóxicos, se justifica para algunos como el plomo, el cadmio y el mercurio, por sus propiedades dañinas a concentraciones relativamente bajas. Esta clasificación, sin embargo, tiene un valor limitado puesto que todos los elementos traza son tóxicos o potencialmente tóxicos, si se ingieren o se inhalan en cantidades muy elevadas durante largos períodos de tiempo. Entonces, el progreso desde la carencia severa del metal traza hasta sus manifestaciones tóxicas y letalidad final pasa por varias etapas. (Marino, 2009). Este hecho permitió el desarrollo del concepto de nivel máximo de ingesta tolerable (UL) que considera la toxicidad potencial de los micronutrientes. El UL se define como “el nivel más alto de ingesta diaria de un nutriente, con menos probabilidad de riesgo de que se produzcan efectos

adversos a la salud, en la mayoría de los individuos aparentemente sanos y en los correspondientes grupos específicos de edad". Cuando el ingreso se incrementa por arriba del valor del UL, el riesgo potencial de efectos dañinos puede incrementarse (Marino, 2009).

Particularmente, para este estudio, se han querido analizar los elementos de la tabla periódica plomo, cadmio y arsénico, para contrastar con el nivel máximo de residuo aceptado para las grasas vegetales en el Codex Alimentarius. Además, se ha incluido el antimonio puesto que es un elemento migrante del envase PET. Y por último, el hierro y el cobre, por ser ambos elementos traza esenciales para la vida, aunque tóxicos a partir del nivel máximo de ingesta. Así, particularizando para cada uno de ellos, se pueden mostrar distintos grados de toxicidad e intoxicación.

-Plomo (Pb). Desde la época griega ya se conocía del riesgo de toxicidad que representaba para mineros y metalúrgicos. El tetraetilplomo, utilizado como combustible, es el compuesto orgánico derivado del plomo que más preocupa entre los contaminantes del medio ambiente (Coultate, 2007). Principalmente, esa contaminación suele deberse al tránsito de vehículos, de modo que en zonas de elevada intensidad el aporte de plomo al suelo es de unos 3 mg/kg en los primeros 50 m a ambos lados de la vía de circulación, siendo en esa franja colindante al vial donde se llega a producir la máxima contaminación de los cultivos que ahí vegeten (Calvo y Mendoza, 2012).

En los países industrializados, el consumo total de plomo procedente de bebidas y alimentos se ha estimado en torno a 250-300 µg/día en adultos (Calvo y Mendoza, 2012). No obstante, la escasa solubilidad de los diferentes compuestos del plomo en el agua frena la absorción intestinal y facilita su casi total excreción en adultos –no tanto en niños- mediante la orina, heces, sudor, pelo y uñas. Se cree que niveles séricos de plomo inferior a 40 µg por 100 mL no producen efectos nocivos. En niveles en torno a 40-80 µg por 100 mL, el organismo empieza a ser incapaz de hacer frente a esa carga excesiva de plomo. Y, para niveles superiores de 80 µg por 100 mL, lo que supone una intoxicación crónica por plomo, los síntomas evidentes se asocian con la anemia. Particularmente para la población infantil, las intoxicaciones por plomo se manifiestan en indicadores neurofisiológicos, tales como la inteligencia y el aprendizaje, en las distintas etapas del desarrollo.

Por último, indicar que, en general, los niveles excesivos de plomo en el organismo, cuando se dan, no están relacionados con la ingesta de alimentos y bebidas, sino con la inhalación del tetraetil-plomo proveniente de los gases de combustión de los vehículos de motor (Coultate, 2007).

-**Arsénico (As).** Está muy distribuido en la naturaleza en bajas y, probablemente, inocuas concentraciones. En el agua potable, en la mayor parte, hay alrededor de 0,5 µg/L de arsénico, mientras que en los alimentos, salvo los de origen marino, apenas se supera 1 mg/kg. La presencia en esos alimentos no marinos suele deberse a pesticidas o a la influencia por cercanía a áreas industriales (Calvo y Mendoza, 2012). De este modo, diariamente, se pueden llegar a asimilar hasta 0,5 mg de arsénico.

Respecto a la mención que se ha hecho de los alimentos de origen marino decir, que la mayor parte del arsénico se encuentra en forma de arsenobetaína (betaína de arsénico en los lípidos del pescado), compuesto que no es metabolizado por el ser humano (Coultate, 2007). En cuanto al arsénico blanco (As_2O_3 , trióxido de arsénico), se sabe que es absolutamente tóxico en grandes dosis, mientras que en pequeñas cantidades tiene un efecto estimulante, lo que se asocia con su uso como producto dopante (Baltes, 2007).

-**Cadmio (Cd).** Desde finales de los sesenta se cataloga como un grave contaminante metálico si se presenta en los alimentos. La ingesta de alimentos contaminados con cadmio, si se prolonga en el tiempo, puede causar la enfermedad del *itai-itai*, que provoca la desmineralización y fractura del esqueleto u osteomalacia asociada a la carencia de vitamina C, e insuficiencia renal. El término *itai itai* se traduce del japonés como *¡ay, ay!*, en clara alusión a los fuertes dolores en articulaciones y columna vertebral de los que la padecen. Se diagnosticó por primera vez en ese país, en 1912, donde se dieron numerosos casos por intoxicación con cadmio, tras la ingesta de arroz contaminado con concentraciones del metal de hasta 4,2 ppm (1 ppm se puede considerar el nivel máximo permisible). El causante fue la liberación de cantidades significativas a los ríos de la comarca, debido a actividades mineras en el entorno.

Una posible fuente de contaminación real y actual, se encuentra en la maquinaria que posee componentes recubiertos de cadmio, a su vez recubiertos o galvanizados con cinc, que pueden estar en contacto con el alimento durante el procesado. Aunque, el

cinc es inocuo, si se introducen alimentos ácidos en recipientes galvanizados de cinc, éste se disolverá y arrastrará trazas de cadmio (Coultate, 2007).

-Hierro (Fe). Quizá es el metal más importante para la nutrición de los seres vivos, y sobre el que más fácilmente se producen carencias dietéticas, como la anemia, el deterioro del sistema inmunológico, o del desarrollo cognitivo en la infancia, etc. El hierro es el metal de transición más importante en el organismo animal, donde se presenta exclusivamente en los pigmentos “hemo” que transportan oxígeno. Se encuentra en dos estados de oxidación, Fe^{+2} (ferroso) y Fe^{+3} (férico), actuando en reacciones de oxidación/reducción. La cantidad diaria recomendada es de 12 mg para el hombre y 18 mg para la mujer (Baltes, 2007), cantidades que se alcanzan normalmente con una alimentación equilibrada, pues el hierro abunda en la mayor parte de los alimentos de origen vegetal o animal (Coultate (2007), Fellows (2007)).

Algunas fuentes que pueden incrementar la cantidad de hierro presente en los alimentos están relacionadas con el uso de recipientes de hierro en la preparación de alimentos o con la utilización de envases metálicos recubiertos deficientemente con estaño (como los de frutas y hortalizas enlatadas). También, algunas aguas de bebida almacenadas en tanques de hierro, o que pasan a través de tuberías de hierro, pueden incrementar los niveles de presencia. Por último, indicar que el almacenamiento excesivo de hierro en el organismo puede provocar enfermedades cardíacas y aumentar el riesgo de cáncer (Coultate (2007), Fellows (2007)).

-Cobre (Cu). Es un oligoelemento importante, que se encuentra en el citocromo C y la tirosinasa (Baltes, 2007). Está ampliamente distribuido como nutriente esencial y componente de diversas enzimas. Se halla en todo tipo de alimentos, sobre todo vísceras, mariscos, frutos secos o semillas (Fellows, 2007). Los niveles normales se hallan entre los 0,1 y 0,5 mg por 100 g, no siendo frecuente su deficiencia. Hay alimentos, como la leche, que son pobres en cobre (menos de 0,2 mg por 100 g), y otros, como el hígado de los mamíferos, con tasas generosas del entorno de los 8 mg por cada 100 g. La ingesta recomendada diaria en adultos se encuentra entre 1 y 3 mg (Coultate, 2007).

El cobre no es muy tóxico, aunque dosis de 100 g pueden producir lesiones hepáticas y renales. Si se ingiere en cantidades de entre 10 y 15 mg puede provocar

diarreas y vómitos (Coultate, 2007) y (Baltes, 2007). En cantidades de 1-1,5 ppm, sustancias que contienen cobre pueden alterar el sabor de la leche, enranciar la mantequilla y activar la autooxidación de las grasas. En pequeñas concentraciones, puede destruir la vitamina C (Baltes, 2007). El consumo habitual de agua distribuida con tuberías de cobre es causa de altas ingestas de cobre, lo que puede ocasionar malestar gastrointestinal (Coultate, 2007).

-*Antimonio (Sb)*. Una de las especies inorgánicas más importantes que pueden migrar del envase de PET al alimento. El motivo principal por el que se halla en alimentos o bebidas, es porque el antimonio se utiliza como catalizador en la fabricación de PET.

Tras demostrarse la carcinogenicidad del trióxido de antimonio en animales de experimentación, el Instituto Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó el trióxido de antimonio como posible carcinógeno para los seres humanos (Grupo 2B). No obstante, el trióxido de antimonio aún sigue siendo el catalizador más utilizado en la fabricación de PET, concretamente como retardante de llama. El cloruro de antimonio es otra forma de encontrarse el antimonio como catalizador. Sobre este compuesto ya se estudió que posee una estrogenicidad débil (Choe *et al.*, 2003). Desde entonces, numerosos artículos publicados abordan estudios sobre la relación entre el antimonio del PET y los posibles efectos estrogénicos.

En cuanto a las plantas, existe tolerancia a la acumulación de antimonio, sin que se observe ningún efecto tóxico. No obstante, tal antimonio podría pasar a la cadena trófica si esas plantas son utilizadas como alimento para el ganado (Corrales *et al.*, 2014). Por último indicar, que algunos autores están de acuerdo en que la dosis letal media de ingesta antimonio se sitúa entre 10 y 11,2 mg/100 g. (Nordberg y Sunderman, 2001).

3.2. CONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR INTERACCIÓN CON EL ENVASE

Algunos envases, que están en contacto con el alimento, pueden ser fuente, para el mismo, de una contaminación por metales pesados. Aunque el envasado es necesario para evitar en lo posible su deterioro y descomposición, debido al calor, a la humedad, a la acción de los insectos o microorganismos, etc.; además, junto al embalaje, deberá de cumplir con una serie de normas de calidad sanitaria y de toxicología que lo hagan apto para recibir y contener a dicho alimento.

3.2.1. Envasado de alimentos y tipos de materiales de envasado

En la actualidad, los alimentos se presentan envasados de diferentes formas en envases fabricados de distintos materiales. Después del procesamiento del alimento, en el almacenamiento y uso por el consumidor, el envasado es parte fundamental de las estructuras y de los canales comerciales modernos. El envasado de los alimentos, se ha convertido en un área muy extensa de estudio integrada por varias disciplinas como son la química, la microbiología, la ciencia y tecnología de los alimentos y la ingeniería.

Los envases para productos alimenticios se presentan de muchas formas diferentes, en función de los requisitos técnicos a lo largo de la cadena de suministro, así como de las necesidades de marketing (identidad de la marca, información al consumidor, etc.) y de otros criterios.

La capa que está en contacto directo con el alimento o bebida se llama “material de contacto con el alimento” (Muncke, 2014). Concretamente, se denominan materiales en contacto con los alimentos a todos aquellos materiales y componentes destinados a entrar en contacto directo con aquellos, incluidos los materiales de envasado, y también los materiales que forman parte de las máquinas de procesamiento, utensilios, recipientes, etc. Dentro de esta amplia definición, son los envases alimentarios los que tienen una mayor relevancia debido a su uso tan extendido.

Según el Codex Alimentarius, el envase alimentario es “cualquier material de empaque que contiene alimentos para su entrega como un producto único”. Y además

se indica que “un envase puede contener varias unidades o tipos de embalajes cuando dicho envase se ofrece al consumidor”. Por tanto, hay diferentes tipos de envase, dependiendo de qué es lo que contenga, distinguiéndose entre envases de tipo primario, secundario y terciario (Escudero, S., 2015).

-*Envase primario*. Es un envase cuyo material, además de contener y proteger evitando alteraciones físicas, químicas y microbiológicas, va a estar en contacto directo con el alimento.

-*Envase secundario*. A modo de embalaje contendrá envases primarios, protegiéndolos durante el almacenamiento y transporte de daños físicos y agentes externos. Su estratégica posición, conteniendo lo que se ofrece al consumidor, lo conforma a modo de base publicitaria.

-*Envase terciario*. Es un envase diseñado para facilitar tanto el transporte como el almacenaje y la manipulación. Sus dimensiones y el material del que está fabricado servirán para englobar al resto de tipos de envases, es decir, el primario y el secundario. Este envase es desechado una vez que el alimento ha llegado al punto final del canal de comercialización.

La función esencial del envase es por tanto contener el producto y mantener su calidad intacta, en la medida de lo posible. Sin embargo, y ya centrándose en el envase primario, la característica más importante que se debe exigir, y que se aplica según legislación, es la de evitar que se produzcan interacciones con el contenido del mismo. Por ello, hay que asegurarse de que los materiales utilizados no sean tóxicos o susceptibles de influir en los alimentos que van a contener, liberando sustancias químicas a esos alimentos en cantidades que puedan ser perjudiciales para la salud humana (Artículo 3, Reglamento (CE) 1.935/2004). Pero una de las principales causas que dificultan ese objetivo es la complejidad de los envases actuales, formados de distintos materiales (plásticos, cartón, metal, etc.), con aspectos cada vez más sofisticados (adición de tintas, barnices, etc.) que tienden a favorecer los riesgos de migración de sustancias al alimento.

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), en su faceta de divulgación y apoyándose en la numerosa legislación

europea vigente, informa que los materiales que están aceptados para entrar en contacto con los alimentos son: materiales y objetos activos inteligentes, cerámica, corcho, adhesivos, caucho, vidrio, resinas de intercambio iónico, papel y cartón, metales y aleaciones, plásticos, tinta de imprenta, celulosa, silicona, productos textiles, barnices y revestimientos, ceras y madera. A continuación, se dan algunas características de los que, como materiales base, son más utilizados.

a) Papel y el cartón

Son unos de los materiales de envasado más antiguos y versátiles, que siguen siendo muy utilizados en el mercado hoy en día. Ambos están hechos a partir de fibras de celulosa obtenidas de astillas de madera, materia que es fácilmente renovable. Debido a las cada vez mayores preocupaciones ambientales de nuestra sociedad, el uso de material reciclado ha aumentado significativamente.

La celulosa pura está formada de largas cadenas de β -glucosa de peso molecular variable. En esta estructura lineal o fibrosa se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared de las células vegetales. Estas fibras se agrupan en haces que originan la fibra de papel, o de cartón cuando su densidad supera los 224 gr/m² (ILSI, 2000).

El embalaje con papel o cartón puede estar impreso y/o laminado con una capa de contacto con el alimento de, por ejemplo, revestimientos de polietileno o de antiadherentes. Se sabe que ese laminado aplicado al interior del papel/cartón puede migrar a los alimentos (Bradley *et al.*, 2013).

El papel y el cartón no pueden estar en contacto directo con los alimentos, deben tener otro material, generalmente una película de tipo plástico. Por ello, no existe una legislación específica, dentro de la Comunidad Europea, para este tipo de material de papel y cartón en contacto con alimentos. Aunque sí se ha redactado un informe de 2011 de la corporación científica de EFSA (European Food Safety Authority) donde se incluye un listado de sustancias utilizadas en materiales no plásticos en contacto con alimentos. Así, entre los varios tipos que se usan hoy en día de envases alimentarios de papel o cartón, por ser tanto sólidos como adaptables, prácticos y de fácil reciclado, se

encuentran envases de papel, de cartón y de cartón ondulado.

El envase de papel puede ser en estado natural o blanqueado, recubierto o asociado con otros materiales, y también en formato bolsa.

El envase de cartón corrientemente se utiliza para cajas de productos de pastelería o como recipiente. Es el envase más utilizado en productos dirigidos directamente al consumidor, o como recipiente para alimentos líquidos. Concretamente, el cartón ondulado, que puede encontrarse en color marrón o blanco, es el más resistente a la humedad y a la compresión.

b) Cartón laminado

Está conformado de diferentes capas que, unidas, dan una gran consistencia y, al mismo tiempo, un peso ligero al envase. Las capas, de dentro a fuera son:

1. Polietileno, para dar estanqueidad.
2. Polietileno, como capa de adherencia.
3. Aluminio, a modo de barrera contra oxígeno, olores y luz.
4. Polietileno, nuevamente como adherente.
5. Cartón, para conseguir rigidez en el envase.
6. Polietileno, nuevamente para proporcionar estanqueidad.

Una apreciable característica de este tipo de envase es que son fácilmente desechables. Además, son baratos y muy manejables en fábrica, pues se apilan plegados y se forman en la misma línea de envasado.

c) Materiales plásticos

Los envases de plástico quedan englobados en una amplia gama de diferentes materiales de envasado provenientes de polímeros. Son compuestos macromoleculares orgánicos obtenidos por polimerización, policondensación o poliadición, a partir de moléculas de peso molecular inferior o por modificación química de macromoléculas naturales. Su fórmula final se nutre tanto de los monómeros de partida, como de otros compuestos de bajo peso molecular adicionados en el proceso de fabricación, a modo de coadyuvantes o modificadores de características del producto final (filtros UV,

plastificantes, antioxidantes, colorantes, etc.).

Según sus características térmicas y mecánicas, los plásticos pueden clasificarse en termoplásticos o termoestables. Los materiales más típicos para su uso como envases son el polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), polietiléntereftalato (PET), cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS) y policarbonato (PC), que son todos termoplásticos. El tipo de material utilizado en cada caso dependerá de la aplicación final, pudiendo ser botellas, recipientes, películas o recubrimientos.

Los recubrimientos de envases también son materiales plásticos que complementan al material base y ayudan a proteger el producto envasado. Se aplican formando finas películas continuas que se extienden sobre el material base antes de darle forma al envase. Lo más extendido es el recubrimiento del interior de latas, para prevenir la reacción de los metales con los ingredientes del alimento enlatado.

d) Metal

El metal utilizado como material de envasado actualmente puede estar compuesto de hojalata, que es acero más una capa fina de estaño; o de aluminio y acero recubierto con algún tipo de laca. La hojalata impide la pérdida de color y sabor, así como la oxidación del producto, pero con el tiempo el estaño se disuelve en el alimento. Para proteger la comida de esa migración desde el material de envase, se han introducido las lacas, que, dependiendo del material que las forman, no están tampoco exentas de provocar fenómenos de migración a los alimentos.

El principal uso de los envases alimentarios de metal es el de contener bebidas, tanto para los refrescos carbonatados como los no carbonatados. Y también, la comida en conserva, que se ha envasado en latas de metal desde comienzos del siglo XX.

Las latas se consiguen por extrusión, y constan de dos o tres piezas que se unen mediante juntas. Incluso en latas no lacadas, se considera útil sellar las juntas de metal para proteger los alimentos de contaminantes desde fuera del material del envase.

e) Vidrio

Hacia el año 1500 a. de C. el vidrio ya se usaba en el antiguo Egipto en forma de botellas, aunque alcanzó su gran difusión en época del Imperio Romano, al difundirse las técnicas de soplado con caña. Es un líquido sub-enfriado y sin estructura cristalina, amorfo, que hace las veces de material duro, frágil y transparente.

Pero el uso de estos recipientes como envases, garantizando la conservación de alimentos y bebidas durante largo tiempo, y facilitando su transporte, es mucho más actual. Los llamados de primera fabricación son los envases más extendidos para contener alimentos y bebidas, y se obtienen por conformación del vidrio fundido, que es silicato de sodio y calcio.

Los envases de vidrio actuales son una combinación de diferentes materiales, pues además del recipiente de vidrio (proveniente del vidrio de sílice) existe un cierre que puede ser de vidrio, metal, corcho o plástico. Así, los alimentos que requieren esterilización después del llenado mediante la aplicación de calor y presión, se cierran con un sello tipo junta de goma y hermético al aire. Tales uniones se hacen típicamente con PVC, caucho o materiales alternativos (Catalá y Gavara, 2002).

f) Cerámicas esmaltadas

El uso de cerámicas esmaltadas en envases para conservar alimentos y bebidas es poco común, aunque la cerámica se utiliza sobre todo en los utensilios de cocina. Al conseguirse a partir de materiales naturales tales como arcilla, cuarzo y caolín, se da la posibilidad de migración de elementos pesados que en su origen los hayan contaminado. A diferencia de los envases de vidrio, la composición química de los esmaltes utilizados es muy variable y se emplean diferentes tecnologías de fabricación (Catalá y Gavara, 2002).

3.2.2. El polietiléntereftalato como envase de alimentos

El polietiléntereftalato, conocido también por el acrónimo PET, es un plástico de alta calidad, concretamente un termoplástico derivado del petróleo, razón por la cual es posible y fácil su reciclaje. Es un polímero de condensación producido mediante un proceso de polimerización en fase fundida continua, correspondiéndose su fórmula con la de un poliéster aromático. Se caracteriza además por su elevada pureza, alta resistencia y tenacidad. Posee propiedades de transparencia y resistencia química, no se estira y no es afectado por ácidos ni gases atmosféricos, es resistente al calor y absorbe poca cantidad de agua.

Existen diferentes grados de PET en función de su peso molecular. Así, los de menor peso molecular se conocen como “grado textil”. Este tipo se empezó a aplicar durante la Segunda Guerra Mundial, como sustituto de fibras naturales tales como el algodón o el lino. Tiene una alta resistencia a la deformación, estabilidad dimensional y un lavado y secado rápido. A los de peso molecular medio se les denomina “grado película”, y son los utilizados para la fabricación de films alimenticios. Y a los de mayor peso molecular se les conoce como “grado ingeniería”, que ofrecen gran resistencia contra agentes químicos, gran transparencia, ligereza, comodidad de manejo y bajos costes de fabricación.

El PET es procesable por soplado, inyección y extrusión. Es apto para la producción de botellas, películas, láminas, planchas y piezas, por lo que, su versatilidad demostrada, unida a su buen efecto barrera frente al CO_2 , al O_2 y a la humedad lo han convertido en un material de uso común en la industria agroalimentaria, sirviendo como soporte y embalaje de distintos alimentos. También, posee cualidades de transparencia, y admite coloraciones. Su alta resistencia química y térmica, soporta el desgaste y desarrolla óptimas propiedades mecánicas. La Tabla 3.2 recoge las principales propiedades del PET.

El PET puede ser esterilizado mediante los rayos gamma y el óxido de etileno, lo que supone una característica más a favor, junto a sus excelentes propiedades mecánicas, para su uso como material en contacto con alimentos. Además, por su resistencia química probada, su composición es estable frente a las grasas y aceites presentes en alimentos, a soluciones diluidas de ácidos minerales, al álcalis, a sales, a

jabones, a hidrocarburos alifáticos y a alcoholes.

El PET también puede ser reciclado, dando lugar al material conocido como RPET. No obstante, el RPET no puede emplearse como material de envase para industria alimentaria, debido a que las temperaturas implicadas en el proceso de reciclaje no son lo suficientemente altas como para asegurar la esterilización del producto. Ahora bien, para conseguir tal esterilización y, por tanto, la aplicación del RPET en la elaboración de envases de alimentos, se han ideado unos procesos especiales de alta limpieza (Richardson y Lokensgard, 2000).

Tabla 3.2. Datos técnicos del PET. Fuente: (Richardson y Lokensgard, 2000)

Propiedad	Valor
Densidad	1,34 – 1,39 gr/cm ³
Resistencia a la tensión	59 – 72 MPa
Resistencia a la compresión	76 – 128 MPa
Resistencia al impacto	0,01 – 0,04 J/mm
Dureza	Rockwell M94 – M101
Dilatación térmica	15,2 – 24 · 10 ⁻⁴ / °C
Resistencia al calor	80 – 120 °C
Resistencia dieléctrica	13.780 – 15.750 V/mm
Constante dieléctrica (60 Hz)	3,65
Absorción de agua (24 h)	0,02 %
Velocidad de combustión	Consumo lento mm/min
Efecto luz solar	Se decolora ligeramente
Calidad de mecanizado	Excelente
Calidad óptica	Transparente a opaco
Temperatura de fusión	244 – 254°C

Entre los múltiples usos dados al PET, sobresale el de la fabricación de envases de bebidas carbonatadas y de packs de alimentos. Y es que, gracias a las características que ya se han descrito anteriormente, es un material que no deteriora los productos alimenticios, es duradero, estable, impermeable a los gases e inalterable a la humedad.

Actualmente, se encuentran disponibles envases para llenado a temperaturas normales y para llenado en caliente. También se desarrollan envases muy pequeños, desde 10 mililitros, hasta garrafas de 19 litros. Todos estos envases llevan el distintivo que se recoge en la Figura 3.1.

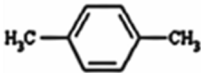
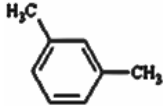
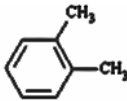


Figura 3.1. Símbolo comercial con el significado de "Hecho en PET"

3.2.2.1. Estructura del PET

El dimetilbenceno, también conocido como xileno, es un compuesto químico industrial utilizado para la obtención de ácido tereftalático puro (PTA), incoloro, inflamable y con un olor parecido al del tolueno. El xileno se usa en la reacción de polimerización, produciéndose una larga familia de poliésteres. El polietiléntereftalato (PET) es uno de ellos, que da su comienzo con los isómeros del xileno. Los tres isómeros del xileno se denominan orto, meta y para-xileno, se separan cuando se llega a sus distintos y característicos puntos de ebullición. Sus estructuras resultantes se exponen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Tipos de Xileno, según ebullición y solidificación. Fuente: (Richardson y Lokensgard, 2000)

Isómeros	Punto de ebullición	Punto de solidificación	
Para-xileno	(137-138)°C	(13-14)°C	
Meta-xileno	139,3°C	-47,4°C	
Orto-xileno	144°C	-25°C	

El primer paso se centra en recuperar, del petróleo crudo, el para-xileno utilizado para la producción de polímeros. Dicho para-xileno se obtiene gracias a la conversión de reacciones, y es uno de los compuestos necesarios en la síntesis del PET. El otro compuesto necesario es el etileno, que también se extrae con la misma refinación. El

etileno se trata con oxígeno en presencia de plata como catalizador, produciéndose óxido de etileno, que a su vez reacciona con agua en presencia de un ácido, obteniéndose etilenglicol, que es uno de los monómeros necesarios para la producción de PET. La fórmula química de dicha reacción se presenta en la Figura 3.2.



Figura 3.2. Reacción del etilenglicol. Fuente: (Richardson y Lokensgard, 2000)

El para-xileno debe oxidarse para así obtenerse el ácido tereftálico (TPA) que es posteriormente esterificado a tereftalato de dimetilo (DMT). Esto puede lograrse mediante una secuencia de dos pasos en donde la oxidación se consigue gracias a un catalizador de cobalto en presencia de metanol. La esterificación es el proceso por el cual se sintetiza un éster, que es un compuesto derivado de la reacción química entre un oxácido y un alcohol (Figura 3.3).

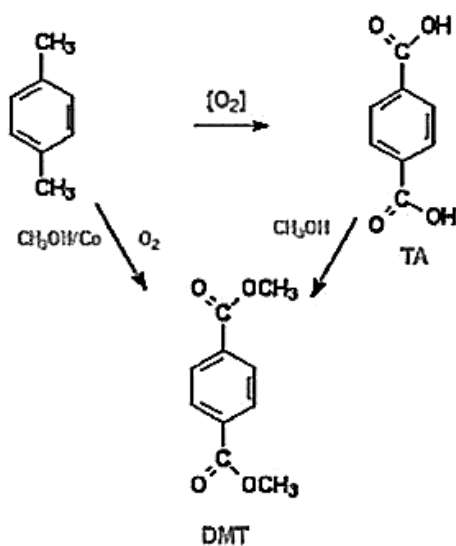


Figura 3.3. Proceso de esterificación. Fuente: (Richardson y Lokensgard 2000)

Por tanto, la industria del plástico puede partir de dos productos intermedios distintos, el ácido tereftálico (TPA) y el dimetiltereftalato (DMT). Y, para conseguir finalmente el PET, optar por dos reacciones de síntesis diferentes, polimerización por esterificación directa o por intercambio de éster.

-Polimerización por intercambio de éster. Mediante la reacción por esterificación de TPA o de DMT con etilenglicol puede obtenerse el monómero bis-(2-hidroxietil)-tereftalato (BHET). En una fase sucesiva y mediante policondensación, con el uso de catalizadores y a más de 250°C, el bis-(2-hidroxietil)-tereftalato se polimeriza en PET.

Como se aprecia en la Figura 3.4, en la reacción de esterificación se elimina agua cuando el proceso se lleva a cabo con TPA, y metanol en el caso de uso de DMT. Decir también, que los diversos catalizadores usados para la reacción de policondensación que, finalmente, produce el PET, podrían ser la fuente de metales migrantes.

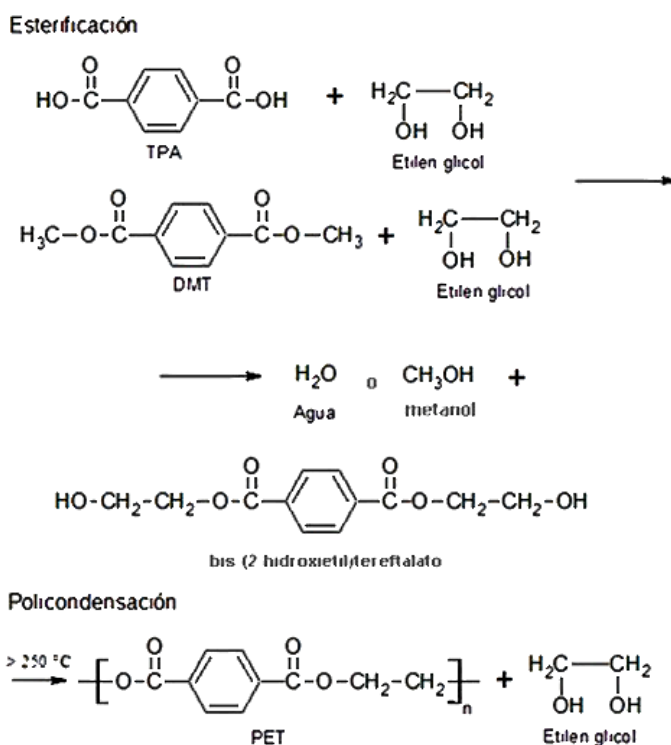


Figura 3.4. Esquema de esterificación y policondensación del PET. Fuente: (Richardson y Lokensgard, 2000)

-Polimerización por esterificación directa. El PET así obtenido tiene enlaces diglicólicos y con bajos contenidos en grupos carboxílicos en los extremos de la cadena. El proceso, esquematizado en la Figura 3.5, aprovecha la fácil reacción del ácido tereftálico con el etilenglicol cuando existen oligómeros de etientereftalato, a temperatura elevada y en presencia de trióxido de antimonio como catalizador, hasta obtener un polímero de cadena larga.

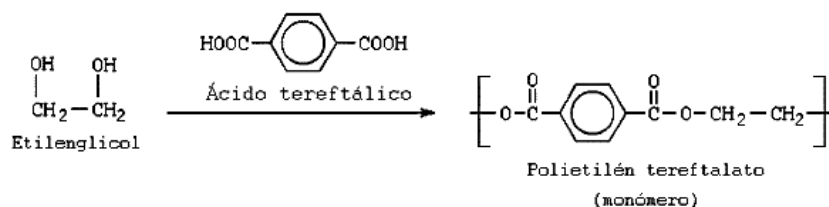


Figura 3.5. Estructura de la polimerización por esterificación directa Fuente: (Richardson y Lokensgard, 2000)

Para ambas rutas, una vez que la masa del polímero ha alcanzado la viscosidad deseada, se hace pasar por una matriz y los filamentos formados se enfrían y consolidan en agua. Dichos filamentos se reducen a gránulos o pellets como los de la Figura 3.6, para, tamizados y despolvados, almacenarlos con vistas al posterior conformado en productos útiles. Así, para poder usarlos como material de embotellado se someten a procesos de termoconformación, como el de cristalización, que cambia la estructura de los polímeros hasta la obtención de una resina blanco-lechosa de densidad apropiada, y el de polimerización en estado sólido, que aumenta el peso molecular de esa resina hasta los valores idóneos para la fabricación del envase PET.



Figura 3.6. Granulado PET. Fuente: www.mercadolibre.com

3.2.2.2. Catalizadores más comunes en la fabricación del PET

Aunque son los catalizadores de antimonio los más empleados por la industria en la fabricación de PET, debido a su precio competitivo (Westerhoff *et al.*, 2008), se han estudiado otros compuestos tales como titanio, aluminios, zirconio, cobalto o molibdeno, que no han arrojado resultados aceptables en términos de productividad industrial. Sobre los catalizadores basados en titanio, cabe decir que aunque los formados por Ti-alcóxidos son más activos que los de antimonio, causan problemas de decoloración (Pang *et al.*, 2006). Ahora bien, la nueva generación de este tipo de catalizadores de titanio (sistemas tetrabutóxidos, mezclas de $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ y complejos de Ti-P) consigue que las propiedades del producto final se optimicen (Finelli *et al.*, 2004). Aun así, actualmente no hay sustituto comercial para el antimonio en la producción de PET. (Thiele, 2004).

El antimonio como catalizador, se suele utilizar en forma de trióxido de antimonio (Sb_2O_3), glicolato o acetato (Thiele, 2004). Otros de los más empleados es el dióxido de germanio (GeO_2).

-Trióxido de antimonio. El antimonio en su forma mineral y a temperatura ambiente es un sólido cristalino. Al calentarse, arde con brillo y desprende un humo blanco, denso y de olor alíaceo, transformándose en óxido de antimonio (Sb_2O_3).

En cuanto a su toxicidad, los efectos cancerígenos del antimonio son parecidos a los del arsénico. Está catalogado dentro del Grupo 2B, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, describiéndose al Sb_2O_3 como un veneno sistemático que presenta riesgo de enfermedades cutáneas y de cáncer de pulmón. Una exposición constante y a corto plazo, causan irritación respiratoria y alteraciones del tracto digestivo y urinario. Y si las exposiciones son a largo plazo, provocan aumento del colesterol y de los niveles de glucosa en sangre (Acanski, 2014).

También el departamento de salud del estado de New Jersey (EE.UU) advierte de riesgos para las personas relacionadas con el antimonio en su entorno laboral, como irritación de la piel y mucosas, gargantas, pulmones; daños renales, hepáticos, en el desarrollo del feto, y sistema reproductor masculino, entre otros.

-*Dióxido de germanio*. A este otro catalizador se le suele dar uso en la fabricación de botellas de PET recicladas, al aportar un mejor brillo del material resultante. Su coste no obstante, de unos 500 € por cada kg de óxido de germanio (Ulrich, 2001), es el que determina su baja utilización.

El germanio es un metaloide sólido duro, cristalino, deleznable, de un blanco grisáceo y que conserva su brillo a temperaturas ordinarias. Nunca se halla en estado libre, sino combinado con otros elementos. Durante la preparación del dióxido de germanio (GeO_2) se genera un compuesto intermedio, El tetracloruro de germanio (GeCl_4).

El dióxido de germanio (GeO_2) se forma a modo de película de pasivación en germanio puro y al contacto con oxígeno atmosférico. Aunque de baja toxicidad, se ha demostrado en cobayas que su inhalación en concentraciones altas tanto de polvo de germanio metálico como de dióxido de germanio, produce una inhibición del incremento de peso. También, en dosis altas actúa como nefrotóxico (Nordberg y Sunderman, 2001).

3.2.2.3. Aditivos más comunes en la fabricación del PET

La industria en general no utiliza el PET en estado puro, pues, para conseguir diferentes propósitos tales como facilitar su procesado, mejorar sus propiedades o, simplemente, proporcionarle el aspecto deseado para una mejor comercialización es mezclado en los procesos de síntesis, elaboración y transformación con distintos aditivos (Gachter *et al.*, 1990).

Los aditivos son sustancias que van dispersas en la matriz polimérica, sin afectar a su estructura molecular, que se incorporan durante los procesos de síntesis, elaboración y transformación, y cuya función es mejorar las propiedades, comportamiento y calidad de los materiales plásticos (Beltrán y Marcilla, 2012). No deben ser volátiles a la temperatura de transformación, ni, por supuesto, migrar a los alimentos que estén en contacto con el PET al que se incorporan. Los más comunes se dividen en grupos y se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Grupos de aditivos y sus características (Beltrán y Marcilla, 2012)

GRUPOS DE ADITIVOS	
Subgrupos de aditivos	Características
PLASTIFICANTES	
	• Se incorpora al plástico facilitando el procesado. • Se reduce la temperatura de transición vítrea, aumentando flexibilidad y maleabilidad, y mejorando el flujo de los plásticos en condiciones de fusión. • Permite la fabricación de formas flexibles, tales como láminas, tubos, películas.
ANTIOXIDANTES	
	• Estabilizan, retrasando la degradación por oxidación de los polímeros. • Aumentan resistencia a la oxidación provocada por el calor y la luz.
COLORANTES	
	• Proporcionan colores al plástico, estables a luz, temperatura y humedad. • Mejoran cualidades estéticas, por tanto favorecen la comercialización. • Utilizados en la fabricación del PET grado película para uso alimentario.
Pigmentos	• Partículas finamente molidas dispersadas uniformemente en el polímero. • Orgánicos o inorgánicos. • Se suele usar mezcla de pigmentos para diversificar tonalidades. • Son los más usados. Dentro de los pigmentos, los más fiables para la reducción de la contaminación por migración son los "Master Batch".
Tintes	• Imprimen colores de menor solidez. • Más tendentes a migrar en el sistema plástico.
Negros de humo	• Son partículas de carbón. • Se utilizan para proteger los plásticos de la degradación térmica por UV. • También se utilizan como fibra para reforzar.
ESTABILIZADORES TÉRMICOS	
	• Aditivos que retrasan la descomposición de los polímeros sometidos a altas temperaturas, aumentando su resistencia a la degradación térmica. • Impiden la degradación de las resinas durante su tratamiento. • Alargan la duración de los productos finales que los contienen.

Tabla 3.4. (Cont.)

GRUPOS DE ADITIVOS	
Subgrupos de aditivos	Características
ESTABILIZADORES FRENTE A RADIACIÓN UV	
	• Actúan como pantalla frente a las radiaciones UV, absorbiendo la energía que éstas proporcionan al polímero. • Retrasan por tanto la descomposición del polímero, su decoloración y pérdida de brillo frente a dichas radiaciones.
AGENTES ANTIESTÁTICOS (DESESTABILIZADORES)	
	• Reducen las cargas electrostáticas en el producto final. • También, atraen la humedad aumentando la conductividad superficial, reduciendo la posibilidad de que se produzca una chispa o descarga.
RETARDADORES DE LLAMA	
	• Alteran el proceso de combustión originado cuando hay un importante flujo térmico, aumentando la resistencia a las llamas de los polímeros. • Aíslan el plástico, crean una reacción endotérmica enfriadora influyendo negativamente sobre la combustión.
Inorgánicos	• El alúmina trihidratada (ATH), el óxido de antimonio o el borato de zinc.
Ogánicos	• Los ésteres fosfóricos.
LUBRICANTES	
	• Se incorporan en las fases de producción, para disminuir las fuerzas de rozamiento entre el material plástico fundido y las superficies metálicas de los equipos del procesado. • Facilitan la elaboración de las resinas y mejoran la apariencia del producto final. • Deben ser compatibles con las resinas a las que se agregan, no afectar adversamente a las propiedades del producto y combinarse fácilmente.
Estearatos metálicos	• Como el estearato de aluminio.
Amidas y ésteres de ácidos grasos	
Ácidos grasos	
Ceras hidrocarbonadas	
Polietilenos de bajo peso molecular	

Tabla 3.4. (Cont.)

GRUPOS DE ADITIVOS	
Subgrupos de aditivos	Características
RELLENOS	
	• Proporcionan solidez y aumentan la velocidad de endurecimiento. • Minimizan la concentración por polimerización que dificulta el moldeo del material. • Reducen el agrietamiento y mejoran la resistencia térmica.
REDUCTORES DE ACETALDEHÍDO (AA)	
	• Aditivos que reducen y controlan los niveles residuales de acetaldehído, posibles causantes de sabores extraños en los productos envasados en PET. • Utilizados en preferentemente en la fabricación del PET grado película para uso alimentario, entre otros usos.

3.2.3. Procesos de interacción PET-alimentos. La migración en alimentos envasados

La migración así, es el conjunto de mecanismos de transferencia de masa o de componentes del polímero al alimento, de permeabilidad a gases y radiaciones a través de los materiales poliméricos, y de adsorción y absorción por el polímero de componentes del alimento (Catalá, 2000).

Los tratamientos térmicos tales como el calentamiento, la pasteurización o la esterilización, además del uso de microondas para el calentamiento de precocinados activan los procesos de transferencia de masa. También el almacenamiento en malas condiciones de conservación, bien por altas temperaturas, bien por una permanente exposición a la luz solar, puede desencadenar procesos de migración de sustancias tóxicas desde el polímero al alimento.

3.2.3.1. Procesos de interacción PET-alimento

Los polímeros, base de los materiales plásticos, son moléculas de elevado peso molecular que son inertes y que poseen una solubilidad limitada, tanto lipófila como hidrófila. La transferencia de estas moléculas desde el envase al alimento está obviamente limitada y su absorción, en el tracto gastrointestinal y en el caso de ingestión accidental del consumidor, sería mínima y sin ningún efecto sobre el organismo. Pero las sustancias del material de envase que sí pueden migrar al alimento son los compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en la matriz polimérica. Es decir, los residuos, coadyuvantes o aditivos provenientes de los procesos de polimerización propios de la producción de los materiales de envase de esta naturaleza (Catalá, 2000).

Los mecanismos de interacción polímeros-alimentos que se pueden dar son la permeabilidad, la migración y la sorción.

-Permeabilidad. Es un proceso bidireccional de transferencia de masa o de energía a través del material de envase. Para que se produzca tal transferencia debe existir un desequilibrio de concentraciones entre los dos ambientes, el externo y el creado en el interior del envase. La permeabilidad también puede ser causa indirecta de incorporación al alimento envasado de diversos componentes del material plástico por migración (Catalá, 2000). Además, afecta a la estabilidad del envase. De este modo y como se aprecia en la Figura 3.7, la permeabilidad provoca el paso de humedad, aromas y radiaciones del entorno al alimento. Y, desde el alimento envasado, de humedad, aromas, CO₂ y O₂ al entorno.

-Migración. Cuando existe transferencia de masa desde el polímero del que se compone el envase al alimento principalmente, a eso se conoce por migración. Es un proceso submicroscópico que por su gran incidencia en el alimento envasado se pasa a desarrollar con más detalle en el próximo apartado.

-Sorción. Con este fenómeno se produce el efecto contrario a la permeabilidad, pues desde el alimento se transfiere masa, generalmente formada de sustancias volátiles de moléculas orgánicas con bajo peso molecular y relacionadas con la conservación, también grasas y colorantes (López, 2007). Puede ser de dos tipos, por adsorción o por absorción. La adsorción es superficial, y la absorción es interna, en la matriz del envase.

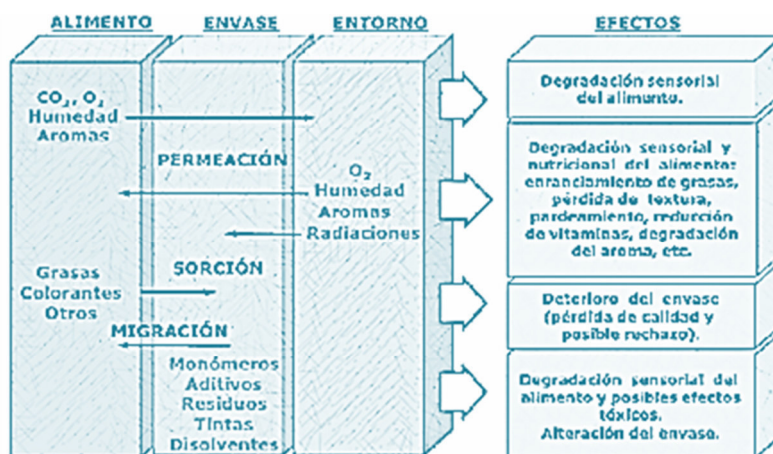


Figura 3.7. Esquema de las interacciones envase-alimento. Fuente: (Herranz, 2010)

3.2.3.2. Migración en alimentos envasados en PET

En el sector del embalaje y de los productos alimenticios se conoce la migración como la transferencia de materia por efectos de naturaleza físico-química desde el envase al alimento durante su almacenamiento o preparación (Briston y Katán, 1974). Y dentro de la migración, se conocen tres tipos distintos: migración global, migración específica y migración potencial.

-*Migración global.* Es la cantidad total de los componentes del material de envase que son transferidos al alimento, sin distinguir entre elementos, sean inertes o sean fisiológicamente influyentes por sus características toxicológicas.

-*Migración específica.* Con este tipo se cuantifica la transferencia de compuestos bien identificados. Se especifica por tanto la sustancia concreta que es transferida al alimento, y que es de relevancia casi siempre por su posible efecto tóxico sobre el organismo (Catalá, 2000).

-*Migración potencial.* Conocida también como límite de composición, es la cantidad máxima de una sustancia presente en un material polimérico que, posiblemente, podría ser transferida al alimento envasado (Catalá, 2000). Se hace su cálculo a partir de la concentración de un determinado monómero o aditivo en el material plástico, y se

presupone su completa transferencia al alimento para las condiciones más desfavorables de almacenamiento (Ariosti, 1999).

El PET, así como todos los materiales formados tras un proceso de polimerización, tienden a producir migración al contactar con líquidos, y en mayor medida según la naturaleza química del medio con el que entran en contacto. Los líquidos en contacto con el PET tienden a penetrar en la película de plástico produciendo una dilatación y haciendo que los aditivos se repartan entre dos fases, una la del líquido que penetra en la pared y otra la que está en contacto con esa pared. Entre estos aditivos, muchos tóxicos en cantidades apreciables, se encontrarían residuos de la reacción de síntesis de los polímeros, como, por ejemplo, los catalizadores utilizados en la fabricación del PET, y entre ellos el antimonio.

La migración de esos aditivos y de otros residuos provenientes del envase a los alimentos puede dividirse en tres etapas diferentes e interrelacionadas:

a) Difusión del migrante

En esta etapa la migración de aditivos se controla en el proceso de difusión del migrante (de las moléculas del aditivo) en una red formada por el polímero. Este transporte molecular sigue generalmente la denominada Ley de Fick para la difusión, cuya expresión se muestra en la Ecuación 3.1, y en la que m es la cantidad de compuesto que migra durante un tiempo t , c es la concentración de migrante en el material de envase, D es la constante de difusión, y S la superficie de contacto.

$$\text{Velocidad de difusión} = \frac{\delta m}{\delta t} = -DS \frac{\delta c}{\delta t} \quad (3.1)$$

b) Solvatación de los migrantes en el alimento

En esta fase, si la sustancia transferida es más afín al medio que conforma el alimento que al medio que forma el polímero, se disolverá bien y con continuidad en aquel. Si no, el paso al alimento se producirá muy lentamente.

c) Dispersión en el alimento

El migrante llega a esta etapa disuelto en el alimento. Si el alimento es sólido, un líquido muy viscoso o el producto envasado no sufre manipulaciones que agiten el contenido, el migrante se irá extendiendo por todo el alimento de acuerdo con la ya mencionada Ley de Fick.

Por todo lo anteriormente expresado, la migración dependerá tanto de la naturaleza del plástico como de la del alimento; también de la velocidad a la cual la sustancia se desprenda de la pared del material polimérico, del coeficiente de difusión y de solubilidad en el polímero y en el alimento (Bach *et al.*, 2012).

Tampoco se puede olvidar que la migración va a depender del tiempo y de la temperatura del procesamiento, de la distribución y del almacenamiento durante la vida útil del alimento envasado (Vom Bruck *et al.*, 1981). Otros factores que tienen influencia son: la densidad del plástico, concentración del migrante, manejo excesivo, espesor del material y superficie de contacto.

La migración por tanto, no es sólo una propiedad de un aditivo o componente que se encuentre en un polímero, sino que se ven involucrados aditivos, polímeros, los alimentos en contacto y las condiciones ambientales que afectan a todo el conjunto (Catalá, 2000).

3.3. LEGISLACIÓN

En este apartado, se van a relacionar las diferentes legislaciones en materia de metales pesados y de materiales en contacto con alimentos y migración.

3.3.1. Legislación de metales pesados

La legislación actual que regula los límites máximos de metales pesados en alimentos, internacional y comunitaria, viene recogida en la Tabla 3.5, indicando sus sucesivas modificaciones. También, una serie de recomendaciones y normativas relacionadas con este estudio, aunque no de carácter obligatorio.

Sobre la legislación nacional y autonómica se debe decir que, como tal, no existe actualmente, apoyándose toda la labor de gestión y supervisión, tanto de la Administración como del sector agroalimentario, íntegramente en la regulación europea. Tan solo cabe hacer referencia al Real Decreto 866/2008, de sustancias permitidas en la fabricación de plásticos destinados al contacto con alimentos.

En cuanto a la legislación internacional, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) gestionan la comisión del Codex Alimentarius, que establece las normas internacionales de inocuidad y calidad de los alimentos. Su objetivo es fomentar la producción de alimentos más sanos y nutritivos para los consumidores en todo el mundo. Las normas del Codex sirven en muchos casos para fundamentar la legislación nacional y como criterio de referencia en materia de inocuidad de los alimentos en el ámbito del comercio internacional de estos. Un área de trabajo importante del Codex es el establecimiento de límites de seguridad y el suministro de orientación, a lo largo de la cadena alimentaria, acerca de la prevención y la reducción de la contaminación; pues los alimentos pueden contaminarse por metales pesados, micotoxinas o bacterias y virus. En la Tabla 3.6 se recogen los distintos límites establecidos por el Codex, y en la legislación de diferentes países, para el antimonio, el cadmio y el plomo.

Tabla 3.5. Legislación sobre metales pesados aplicable en España

INTERNACIONAL	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
CODEX STAN 193-1995	Revisiones: 1997, 2006, 2008, 2009 Enmiendas: 2010, 2012, 2013, 2014, 2015
UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Reglamento (CE) 166/2006, de 24 de febrero de 2006, relativo al establecimiento de un registro europeo de emisiones y transferencias de contaminantes (RETC).	
Reglamento 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (establece los límites para el plomo, el cadmio, el mercurio y el estaño)	Reglamento 629/2008 de la Comisión, de 2 de julio de 2008, que modifica el Reglamento 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios Reglamento 420/2011 de la Comisión, de 29 de abril de 2011, que modifica el Reglamento 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios Reglamento 488/2014 de la Comisión, de 12 de mayo de 2014, que modifica el Reglamento 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios Reglamento (UE) 2015/1005 de la Comisión, de 25 de junio de 2015, que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios 28 de noviembre Reglamento (UE) 2015/1006 de la Comisión, de 25 de junio de 2015, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios
Recomendación 2014/193/UE, de 4 de Abril de 2014, de la Comisión, sobre la reducción de la presencia de cadmio en los productos alimenticios	
Recomendación (UE) 2015/1381, de 10 de agosto de 2015, sobre el control del arsénico en los alimentos	

Tabla 3.5. (Cont.)

ESPAÑA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo	

Tabla 3.6. Límites máximos de residuos (LMR) en aceites vegetales y agua. Fuente: CATICE

ELEMENTO	LMR aceites vegetales	LMR aguas
CODEX ALIMENTARIUS (Codex Stan 19/81 rev. 2017; 33/1981 rev. 2017 y 193/1995 rev.2018) (*) OMS		
Arsénico	0,1 ppm	0,01 ppm
Cadmio	-	0,003 mg/kg
Plomo	0,08 ppm	0,01 ppm
Antimonio	-	0,020 ppm (*)
UNIÓN EUROPEA (**) Nivel máximo de migración permitido para el Sb_2O_3		
Antimonio	0,04 ppm (**)	0,005 ppm
Plomo	0,10 ppm	0,01 ppm
Cadmio	-	-
Arsénico	-	-
BRASIL		
Antimonio	2 ppm	2 ppm
Arsénico	0,10 ppm	-
Cadmio	1 ppm	-
Plomo	0,10 ppm	-
CANADÁ		
Arsénico	-	0,01 ppm (no mineral)
Plomo	-	0,01 ppm (no mineral)
JAPÓN		
Antimonio	-	0,002 ppm
SUDÁFRICA		
Antimonio	0,15 ppm	0,005 ppm
Arsénico	0,1 ppm	0,01 ppm
Cadmio	-	0,003 ppm
Plomo	-	0,01 ppm
SUIZA		
Arsénico	0,1 ppm	0,05 ppm (agua potable)
Cadmio	-	0,005 ppm (agua potable)
Plomo	0,1 ppm	0,01 ppm (agua potable)

Por último, reflejar en la Tabla 3.7 los límites establecidos por el COI para metales pesados presentes en el aceite de oliva.

Tabla 3.7. Límites máximos de residuos (LMR) en aceites de oliva. Fuente: COI

ELEMENTO	LMR aceites de oliva
CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI) (COI /T.15/NC N° 3/Rev. 12, junio de 2018)	
Arsénico	0,1 ppm
Plomo	0,1 ppm

3.3.2. Legislación de materiales en contacto con alimentos y migración

Para evitar posibles daños en la salud del consumidor, los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos están sometidos a investigaciones constantes y a legislaciones específicas y adaptables a los avances y descubrimientos, y también a los posibles hechos probados que así lo justifiquen, y que puedan haberse dado en el devenir de la industria, de la comercialización y del consumo.

La normativa europea es de obligado cumplimiento en toda la Unión Europea, cuyos países deben adaptar sus legislaciones a lo finalmente aprobado. Así, partiendo de las legislaciones nacionales existentes y tomando referencias en estudios e informes basados en nuevos conocimientos científicos, se consigue mediante una legislación marco uniformizar todo el sector europeo de los materiales en contacto con alimentos. Esta legislación comunitaria en vigor, mantiene el principio básico de que los materiales de envasado no podrán ocasionar modificaciones inaceptables en la composición de los alimentos o en sus características organolépticas. Al respecto, la Tabla 3.8 recoge la legislación comunitaria y estatal más importante relacionada, y sus modificaciones. A destacar, el Reglamento (UE) 10/2011, que establece procedimientos detallados de evaluación de la seguridad y para la autorización de las sustancias que deberán utilizarse en la fabricación de materiales en contacto con alimentos. También, en dicho reglamento han quedado incluidos los denominados “materiales y objetos activos en contacto con alimentos”, que, a diferencia de los materiales y objetos tradicionales en contacto con alimentos, no son inertes por su diseño y, por lo tanto, son susceptibles de modificar la composición o las propiedades organolépticas de esos alimentos.

Tabla 3.8. Legislación sobre materiales en contacto con alimentos

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
<i>Directiva (MARCO) 80/590/CEE de la Comisión, de 9 de junio de 1980, relativa a la determinación del símbolo que puede acompañar a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (DEROGADA)</i>	
<i>Directiva (MARCO) 89/109/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (DEROGADA)</i>	
Reglamento (MARCO) (CE) 1.935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE	
Directiva 78/142/CEE del Consejo, de 30 de enero de 1978, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre materiales y objetos que contengan cloruro de vinilo monómero, destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (ESPECÍFICA)	
Directiva 80/766/CEE de la Comisión, de 8 de julio de 1980, relativa a la determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del contenido de cloruro de vinilo monómero en los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (ESPECÍFICA)	
Directiva 81/432/CEE de la Comisión, de 29 de abril de 1981, sobre determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del cloruro de vinilo cedido por los materiales y objetos a los productos alimenticios (ESPECÍFICA)	
Directiva 82/711/CEE del Consejo, de 18 de octubre de 1982, que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los materiales plásticos en contacto con los alimentos	
	Directiva 93/8/CEE de la Comisión, de 15 de marzo de 1993, por la que se modifica la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios
	Directiva 97/48/CE de la Comisión de 29 de julio de 1997 por la que se modifica por segunda vez la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios

Tabla 3.8. (Cont.)

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Directiva 84/500/CEE del Consejo, de 15 de octubre de 1984, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios	
Directiva 85/572/CEE del Consejo, de 19 de diciembre de 1985, por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios	
	DIRECTIVA 2007/19/CE DE LA COMISIÓN, de 2 de abril de 2007 por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios
Directiva 93/10/CEE de la Comisión del 15 de marzo de 1993 relativa a los materiales y objetos de la película de la celulosa regenerada para entrar en contacto con productos alimenticios (<i>ESPECÍFICA</i>)	
	Directiva 93/111/CE de la Comisión, de 10 de diciembre de 1993, por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios
	Directiva 2004/14/CE de la Comisión, de 29 de enero de 2004, por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios
Directiva 93/11/CEE de la Comisión, de 15 de marzo de 1993, relativa a la cesión de N-nitrosaminas y de sustancias N-nitrosables por las tetinas y chupetes de elastómeros o caucho	
Directiva 2002/16/CE de la Comisión, de 20 de febrero de 2002, relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (<i>DEROGADA</i>)	
	Directiva 2004/13/CE de la Comisión, de 29 de enero de 2004, por la que se modifica la Directiva 2002/16/CE relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios

Tabla 3.8. (Cont.)

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Directiva 2002/72/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2002, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios	Directiva 2004/1/CE de la Comisión, de 6 de enero de 2004 por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE en lo relativo a la suspensión de la utilización de la azodicarbonamida como agente expansor Directiva 2004/19/CE de la Comisión, de 1 de marzo de 2004, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios Directiva 2007/19/CE de la Comisión, de 2 de abril de 2007 por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios
Reglamento (CE) 2.023/2006, de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos	Reglamento (CE) 282/2008 de la Comisión, de 27 de marzo de 2008, sobre los materiales y objetos de plástico reciclado destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se modifica el Reglamento (CE) 2023/2006
Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos	Reglamento (UE) 1.183/2012 de la Comisión, de 30 de noviembre de 2012, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos

Tabla 3.8. (Cont.)

UNIÓN EUROPEA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
Reglamento delegado (UE) 2.016/2.095 de la Comisión, de 26 de septiembre, que modifica el Reglamento CEE 2.568/91.	
ESPAÑA	
LEGISLACIÓN	MODIFICACIONES
<i>Real Decreto 846/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones que deben cumplir las materias primas a base de materiales poliméricos reciclados para su utilización en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.</i>	
<i>Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.</i>	

3.4. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN ALIMENTOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En este apartado, se consideran los antecedentes bibliográficos que se han estimado más interesantes para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, referidos a los estudios sobre la determinación de metales traza presentes en los alimentos, así como para el antimonio, en alimentos envasados en PET, y en particular para el aceite de oliva virgen extra.

Antes de proceder a la revisión bibliográfica, se ha realizado un estudio estadístico para el período 2009–2019, sobre el empleo de las distintas técnicas analíticas atómicas actuales en el análisis de elementos minerales en disolución. Además, se ha abordado de forma resumida, cuáles son los parámetros analíticos y estadísticos más relevantes que justifican la selección de una técnica analítica adecuada para las necesidades del método analítico en cuestión, siendo, en el caso concreto del estudio que se afronta en esta Tesis Doctoral, las técnicas atómicas para la determinación de metales en alimentos.

Para la selección de una técnica instrumental, la sensibilidad es una propiedad analítica fundamental para alcanzar los niveles de concentración de los analitos en las muestras. Un parámetro estadístico que expresa numéricamente esta propiedad es el límite de detección (LD). En la Figura 3.8 (Thomas, 2008), se pueden observar los intervalos de concentración correspondientes a las cuatro técnicas representadas. Generalmente, los límites de detección más bajos se alcanzan cuando se utiliza la Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) y la Espectroscopía de Absorción Atómica con Cámara de Grafito (GFAA). Otras técnicas, como la Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y la Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (AAS), tienen límites de detección similares y más altos.

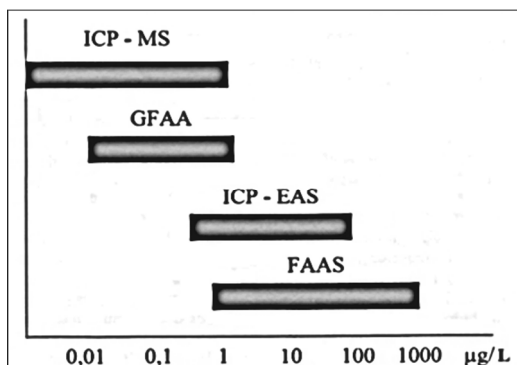


Figura 3.8. Límites de detección típicos para las principales técnicas espectroscópicas

De la misma manera, otro parámetro a considerar es el intervalo de trabajo analítico. Para las técnicas espectroscópicas atómicas se muestran en la Figura 3.9 (Thomas, 2008). Un amplio intervalo de calibración ahorra tiempo de análisis que se emplea en calibrar y puede reducir los errores de manipulación de la muestra, si las diluciones se mantienen a un mínimo. Las técnicas ICP-MS y ICP-AES tienen intervalos de calibración de 3 órdenes de magnitud mayores que la EAA-AE y la FAAS.

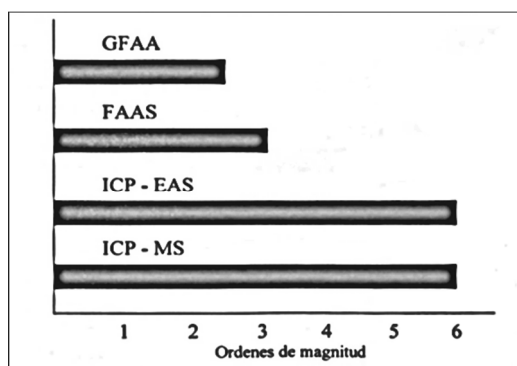


Figura 3.9. Intervalos de trabajo analítico para las técnicas espectroscópicas atómicas

Por otro lado, los instrumentos para análisis de elementos individuales (FAAS y EAA-AE) son generalmente menos complejos y, por lo tanto, de menor coste que aquellos instrumentos empleados para las técnicas multielementales (ICP-AES y ICP-MS). Así, el rendimiento de muestras es siempre considerablemente mayor si se emplean los métodos "multielemento". En la Figura 3.10 se muestran los costes típicos para las técnicas espectroscópicas atómicas (Thomas, 2008). Como consecuencia de ello, y a

pesar de su coste más elevado, estas técnicas multielementales se emplean con más frecuencia en laboratorios de análisis de rutina, con gran volumen de muestras, suponiendo pues un rendimiento considerablemente mayor. Además, estos equipos disponen también de un dispositivo de automuestreo que facilita su funcionamiento de manera automática.

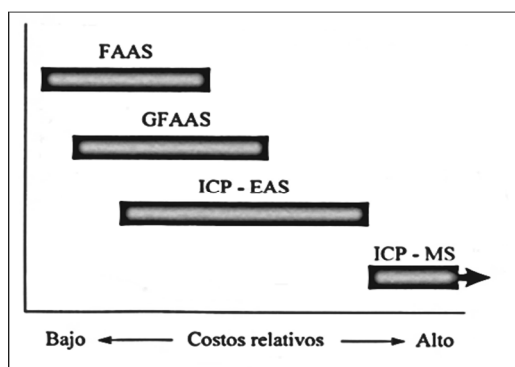


Figura 3.10. Coste de los instrumentos de Espectroscopía Atómica

Los resultados del estudio realizado para el período 2009-2019, sobre la disponibilidad de las técnicas analíticas en el análisis de alimentos, se pueden consultar en la Figura 3.11, en un gráfico que representa los porcentajes de aplicación de cada una de las técnicas atómicas actuales. Dichos porcentajes ponen de manifiesto que en la actualidad las técnicas analíticas más utilizadas son, en orden creciente: la Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), la Espectroscopia de Absorción Atómica con Llama (FAAS) y, por último, la Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). En cambio, la Espectroscopía de Emisión Atómica (FAES) y la Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (EAA-AE), son las menos empleadas.

Hay que destacar que los resultados del estudio eran los esperados, pues, a pesar del elevado coste, la técnica ICP-MS es la más utilizada por su gran potencial, que resulta del acoplamiento de dos técnicas analíticas, el Plasma de Acoplamiento Inductivo y la Espectrometría de Masas. La primera actúa como atomizador, y la segunda, es un analizador multielemental que determina casi todos los elementos de la tabla periódica, con un potencial de ionización menor que el del argón y a concentraciones muy bajas. De acuerdo a sus niveles de sensibilidad, de $\mu\text{g/L}$ (ppb) y de ng/L (ppt), el ICP-MS es una técnica perfecta para la determinación de elementos

minerales a nivel de traza y ultratrazas de carácter tóxico, como los contaminantes químicos en el caso de los alimentos.

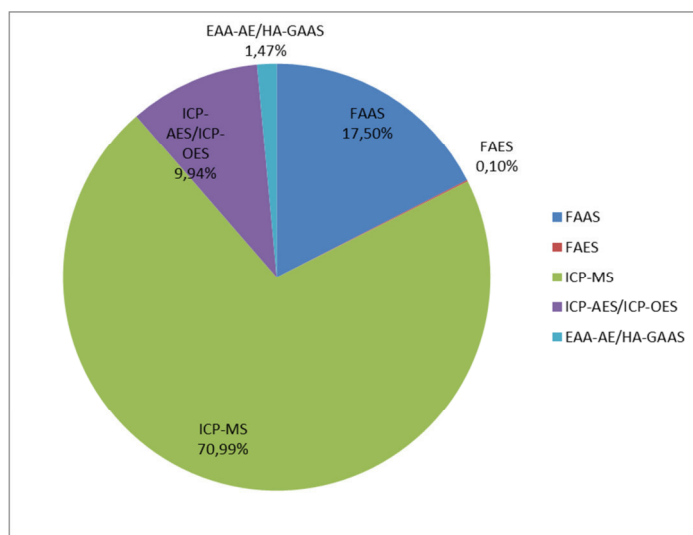


Figura 3.11. Porcentaje de distintas técnicas analíticas de determinación de metales en alimentos (2009-2019)

Fuente: ISI Web of Knowledge

A continuación, se exponen los resultados del estudio bibliográfico para los metales traza As, Cd y Pb, considerados tanto por su importante carácter tóxico como por su frecuente presencia como contaminantes químicos en los alimentos. Por distintas razones y a lo largo de la cadena alimentaria, estos elementos están vigilados y controlados por las autoridades internacionales en seguridad alimentaria. Además, hay que destacar que en el caso del As y Pb, ambos tienen establecidos de forma particular sus límites máximos de residuos (LMR) para el aceite de oliva virgen extra.

Ahora bien, en el caso del Sb se ha realizado una revisión más específica, consultando estudios sobre cualquier alimento en general y de acuerdo a unos criterios más definidos y concretos, como han sido: la naturaleza del material del envase, PET, las distintas formas de exposición de las muestras (exposición a la luz solar, o a tratamientos térmicos con diferentes tiempos de aplicación, así como a períodos de almacenamiento prolongados). Según esta bibliografía se han conseguido conocer los diferentes niveles de migración del Sb al alimento, para compararlos con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, de migración de antimonio desde el envase PET al

aceite de oliva virgen extra muestreado, tras haber sido sometido a diferentes condiciones de degradación.

El estudio de antecedentes para esta Tesis Doctoral se recoge en las Tablas 3.9 y 3.10. Esta relación de los distintos trabajos encontrados se ha organizado de forma general: a) en la Tabla 3.9 los estudios de determinación de As, Cd, Pb y Sb en alimentos que no han sufrido ningún tipo de exposición solar o térmica; y b) en la Tabla 3.9 los estudios sobre alimentos que sí han soportado algún tipo de exposición. Luego, a su vez cada tabla se ha dividido según grupos de alimentos y año de publicación.

La información que se detalla en las tablas, extraída de las distintas publicaciones científicas consultadas, es la que se ha considerado más relevante para un estudio de esta naturaleza. Así, se han reflejado los minerales estudiados, el tipo de exposición (sólo en la Tabla 3.10), el alimento, la técnica analítica, los valores de LD y LQ y los niveles de concentración de los contaminantes presentes en los respectivos alimentos.

Tabla 3.9. Trabajos sobre presencia de metales traza y antimonio en alimentos sin tratamiento térmico

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng/g)	LQ (μg/kg)	[μg/Kg]	REFERENCIAS
Pb, Cd y otros	Aceite vegetal	ICP-AES	-	-	Pb (7,4) Cd (4,5)	Pehlivan <i>et al.</i> , 2008
Pb, Cd y otros	Aceites vegetales y no vegetales	GF-AAS	-	-	Pb (0,03-0,01) Cd (4,57-0,09)	Mendil, <i>et al.</i> 2008
Cd, Pb y otros	Aceites vegetales	GF-AAS	Cd (0,06); Pb (0,85);	-	Pb (34,2-103,7) Cd (1,3-12,3)	Bakkali <i>et al.</i> , 2009b
As, Cd, Pb, Sb y otros	Aceites vegetales	ICP-MS	Pb (0,8); As (3,0); Cd, Sb (1,5)	-	(ND) As, Cd, Sb, Pb	Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2011b
As, Cd, Sb y otros	Aceite de oliva	ICP-MS	As (0,62); Cd (0,16); Sb (0,14)	-	(1) As (1,72-26,65) (1) Cd (0,88-0,36) (1)Sb (0,23-0,41)	Juranovic <i>et al.</i> , 2007
As, Cd, Pb y otros	Aceite de oliva	GF-AAS	(8) As (0,17); Cd (0,09); Pb (0,18)	-	(5) As (0,009-0,019) Cd (2,64-8,43) (5)Pb (0,009-0,018)	Zhu, <i>et al.</i> , 2011

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo.

ICP-AES o ICP-OES: Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado por Inducción.

GF-AAS: Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito.

(1): ng/g.

(5): μg/g.

(8): mg/L.

ND: No detectado.

Tabla 3.9. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng/g)	LQ (μg/kg)	[μg/Kg]	REFERENCIAS
As, Pb y otros	Aceite de oliva y orujo	ICP-MS	Pb (0,9); As (3,0)	-	(ND) As (5) Pb (≤6)	Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2011a
As, Cd, Pb, Sb	Aceite de oliva y aceitunas	ICP-MS	As (15-50); Cd (12-35); Pb (4-12); Sb (3-10)	-	(5) As (2,2-50) (5) Cd (2,1-150) (5) Pb (2,4-50) (5) Sb (2,1-100)	Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2014
Pb, Cd, As y otros	Muestras de diferentes tipos de alimentos	ICP-MS	(1) Pb (4,0); Cd(0,2); As (5,0)	-	(1) As (1,2-59,1) (1) Pb (82,4-87,8) (1) Cd (0,21-12,5)	Nardi <i>et al.</i> , 2009
As, Cd, Pb, Sb	Alimentos	ICP-MS	-	-	(6) As (0,010-2,54) (6) Cd (0,001-0,117) (6) Pb (0,004-0,105) (6) Sn (6.10 ⁻⁴ -0,09)	Millour <i>et al.</i> , 2011
Pb, Cd y otros	Tomates, pimientos y cebollas	GF-AAS	0,05-2,20	0,15-7,34	Pb (12,2-70,6) Cd (11,8-15,4)	Bakkali <i>et al.</i> , 2009a
Sb	Refrescos y agua mineral	ICP-MS	(2) 2,0	2,5	-	Welle y Franz., 2010
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. GF-AAS: Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito. (1): ng/g. (2): μg/kg. (5): μg/g.				(6): mg/Kg. (ND): No detectado.		

Tabla 3.9. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng/g)	LQ (ng/g)	[µg/Kg]	REFERENCIAS
As, Cd, Pb y otros	Extracto de soja, proteína de soja texturizada, harina de soja integral transgénica	ICP-OES ICP-MS	(5) As (0,007); Cd (0,006); Pb (0,03)	-	-	Tiago <i>et al.</i> , 2015
As, Cd, Pb, Sb y otros	Verduras y aceites vegetales	ICP-MS	(2) As (0,005); Cd (0,007); Pb (0,015); Sb (0,038)	-	Verduras: As (0,32-55,6); Cd (1,3-32,3); Pb (4,1-96,0); Sb (1,3-56,6). Aceites: As (0,38-5,7); Cd(1,1-1,2); Pb (3,1-92,5); Sb (1,0-10,2)	Bakkali <i>et al.</i> , 2012
Sb, Se	Agua natural, bebidas y alimentos	ICP-OES HG-AAS	(4) Sb (3,60)	Sb (12)	Sb (20-65)	Altunay y Gürkan, 2016
As, Cd, Pb, Sb y otros	Yogur lácteo	ICP-MS	As (3,0); Sb (1,2); Cd (1,5), Pb (5,0)	-	(5) As (2-10) (5) Cd (1,5-5) (5) Pb (1-10) (5) Sb (1.2-1,5)	Llorent-Martínez <i>et al.</i> , 2012
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. ICP-OES: Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado por Inducción. HG-AAS: Espectrofotometría de Absorción Atómica de Generación de Hidruro. (2): µg/kg. (3): µg/L.			(4): ng/L. (5): µg/g.			

Tabla 3.9. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng/g)	LQ (ng/g)	[µg/Kg]	REFERENCIAS
Cd, Pb y otros	Yogur	GF-AAS	Cd (0,4); Pb (10,6)	Cd (1,4); Pb (35,4)	(1) Cd (2,5-12,4); (1) Pb (35,4-210)	De Andrade <i>et al.</i> , 2018
As, Cd, Pb y otros	Leche y yogur	ICP-MS	As (0,069); Cd (0,009); Pb (0,023)	As (0,231); Cd (0,029); Pb (0,075)	As (0,21-1,090) Cd (1,36-2,38) Pb (3,35-13,86)	Khan <i>et al.</i> , 2014
As, Cd, Pb y otros	Leche en polvo	HG-AAS	(2) As (0,280); Cd (0,090); Pb (0,110)	(2) As (0,830); Cd (0,260); Pb (0,330)	(6) Cd (5,96); (6) Pb (8,01)	Evgenakis <i>et al.</i> , 2017
As, Cd, Pb y otros	Leche de burra	ICP-MS	(3) 0,009-0,041	(3) 0,027-0,124	(3) As (42,84-78,05) (3) Cd (3,96-11,19) (3) Pb (9,77-18,11)	Potorti <i>et al.</i> , 2013
Cd, Pb y otros	Zumo de frutas	ICP-MS	(3) 0,1-2.000	-	(3) Cd (0,3-1,1) (3) Pb (0,2-2,0)	Tormen <i>et al.</i> , 2011
Cd, Pb	Zumo de frutas	ICP-MS	(7) Cd (2,67); Pb (60,3)	-	Cd (0,01-0,41) Pb (0,091-0,434)	Szymczycha y Welna, 2013
Sb, Sn	Zumos de frutas, refrescos	ICP-OES	(3) 1,2 – 2,5	(3) 4,0 - 8,3	(0,9-12,2)	Biata <i>et al.</i> , 2017
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. ICP-OES: Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado por Inducción. HG-AAS: Espectrofotometría de Absorción Atómica de Generación de Hidruro. GF-AAS: Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito. (1): ng/g.				(2): µg/kg. (3): µg/L. (6): mg/Kg. (7): µg/mL.		

Tabla 3.9. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (ng/g)	LQ (ng/g)	[µg/Kg]	REFERENCIAS
Cd, Pb y otros	Café	ICP-MS	(6) Cd (0,003); Pb (0,003)	-	(6) Cd (0,064); (6) Pb (1,6)	Jarosova <i>et al.</i> , 2014
Cd, Pb y otros	Té chino	GF-AAS	(3) Cd (1,24); Pb (1,04)	-	(6) Cd (0,01-0,39); (6) Pb (0,48-10,57)	Zhong <i>et al.</i> , 2016
Cd, Pb y otros	Miel de abejas	GF-AAS	(8) Cd (0,02); Pb (0,03)	(8) Cd (0,06); Pb (0,1)	(6) Cd (0,80-1,0); (6) Pb (1,32-2,0)	Zamudio <i>et al.</i> , 2016
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. GF-AAS: Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito. [µg/Kg]: La concentración elegida en el intervalo es la que ofrece mayor dato de migración.				(3): µg/L. (6): mg/Kg. (8): mg/L.		

Tabla 3.10. Trabajos sobre presencia de metales traza y antimonio en alimentos con tratamiento térmico

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TRAT. TÉRMICO	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (μg/L)	LQ (μg/L)	[μg/Kg]	REFERENCIAS
Sb	Agua mineral	Almacén 30 meses 22-70°C, 9-24 h	ICP-MS	-	-	(1) (0,8-1) (1) (0,8-1,90)	Keresztes <i>et al.</i> , 2009
Pb, Sb, otros 77 y BPA	Agua mineral	70°C, 4 h	ICP-CRI-MS	(1) Sb (0,1 a 1,0)-Pb (0,1 a 0,7)	-	-	Rowell <i>et al.</i> , 2016
Sb	Agua natural	22°C, oscuridad 45°C, exterior	ICP-MS	-	-	(3) (5,5)	Hureiki y Mouneimne, 2012
Sb y otros	Agua mineral	2, 22, 45, 60 y 80°C; 1 semana	ICP-MS	-	-	(3) (1,24-15,8)	Reimann <i>et al.</i> , 2012
Sb	Agua embotellada	De 23°C a 60°C y 120 días	HG-AFS	(3) 1,0	-	(3) (3,6)	Greifenstein <i>et al.</i> , 2013
Sb, Pb y otros	Agua embotellada	40°C, 50°C y 60°C y 10 días	ICP-MS	Sb (0,2); Pb (0,1); V (0,5); resto de metales (1,0)	-	(3) (0,5-3,5)	Bach <i>et al.</i> , 2013
Sb (también BPA)	Agua embotellada	4°C, 25°C, 70°C	ICP-MS	-	-	(3) (0,02-2,61)	Fan <i>et al.</i> , 2014
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. HG-AFS: Espectrometría de Fluorescencia Atómica de Generación de Hidruro. ICP-CRI-MS: Técnica ICP-MS con Interfaz de Reacción de Colisión (CRI).				(1): ng/g. (3): μg/L. [μg/Kg]: La concentración elegida en el intervalo es la que ofrece mayor dato de migración.			

Tabla 3.10. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TRAT. TÉRMICO	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	[µg/Kg]	REFERENCIAS
Sb	Agua embotellada	4°C, 20°C, 40°C Y 60°C	HG-AFS ICP-MS	Sb I (0,11) Sb III (0,25) Sb V (0,05)	Sb I (0,14) Sb III (0,83) Sb V (0,16)	(3) (0,3-0,7) (3) (2,6-4,2) (3) (2,6-4,2)	Carneado <i>et al.</i> , 2015
Sb	Agua mineral	25°C, 75°C y luz solar 15 días	HG-AFS	0,113	0,377	(3) (0,28-2,30)	Chapa-Martínez, 2016
Sb	Agua embotellada	25°C a 80°C	ICP-MS	0,50	0,80	(3) (3,05-25,75)	Payán <i>et al.</i> , 2016
Sb	Agua mineral	4°C y 4 semanas 8°C y luz solar 12°C y oscuridad	ICP-MS	(3) Sb (0,05)	.	(3) (8,63-23,88)	Markwro, 2017
Sb, Pb, Cd	Agua embotellada y refrescos	40°C, 60°C y 80°C, 9 meses	ICP-MS	(3) Sb (0,02); Pb (0,03); Cd (0,02)	-	(3) (6,61-23,40)	Tukur <i>et al.</i> , 2012
Sb	Simulantes: líquido de alimentos, acuoso de alimentos y de vinagre	40°C y 60°C	ICP-MS HG-AFS	ICP-MS (0,003) HG-AFS (0,010)	ICP-MS (0,112) HG-AFS (0,375)	(0,5-1,2)	Sánchez-Martínez <i>et al.</i> , 2013

ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo.
HG-AFS: Espectrometría de Fluorescencia Atómica de Generación de Hidruro.
(3): µg/L.

Tabla 3.10. (Cont.)

ELEMENTOS MINERALES	APLICACIONES	TRAT. TÉRMICO	TÉCNICA ANALÍTICA	LD (μg/L)	LQ (μg/L)	[μg/Kg]	REFERENCIAS
Sb	Simulantes: Vino y vinagre	40°C, 20 d.	GF-AAS	1,0	3,7	(3) <20	De Jesús, 2016
Sb	Zumos	50°C, 15 d.	ICP-MS	-	-	(3) (1,14)	Hansen <i>et al.</i> , 2006
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo. HG-AFS: Espectrometría de Fluorescencia Atómica de Generación de Hidruro. (3): μg/L.							

Como resumen del estudio de antecedentes, en el gráfico de la Figura 3.12 se han representado los porcentajes de las técnicas analíticas recogidas en las Tablas 3.9 y 3.10. De la comparación entre dicha Figura 3.12 y la anteriormente citada Figura 3.11, se puede observar que de nuevo las técnicas de carácter multielemental superan al resto, en cuanto a su aplicación, confirmándose que este tipo de técnicas se están imponiendo de forma más habitual para el análisis químico, a pesar de su coste económico, que queda compensado con sus ventajas cuantitativas de elevada sensibilidad y con su carácter multielemental.

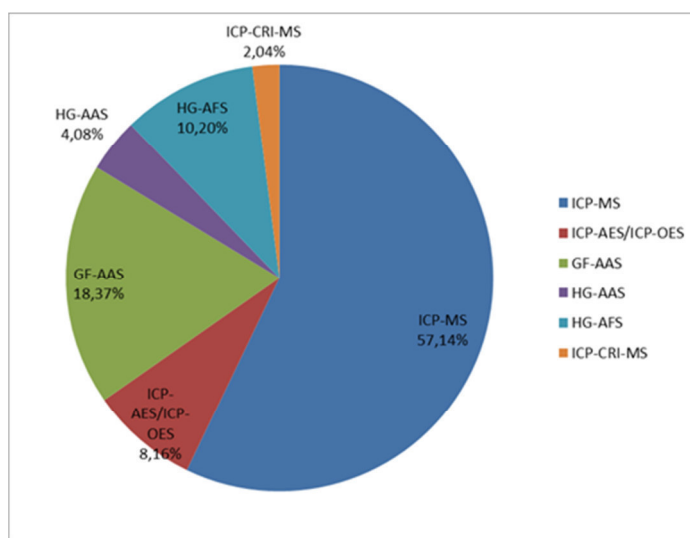


Figura 3.12. Porcentaje de las diferentes técnicas analíticas reflejadas en el estudio de antecedentes

Fuente: elaboración propia.

En el caso del Sb, de los datos representados en la Tabla 3.9 se deduce que de este elemento, sólo se determina analíticamente en un 25% de los alimentos estudiados.

En cuanto a la Tabla 3.10, se puede comprobar que el 75% de los alimentos en los que se ha estudiado la migración del Sb, desde envases de PET, son muestras de agua mineral, dato que se corresponde con el porcentaje encontrado para aguas en el gráfico representado a continuación, en la Figura 3.13, destacando de nuevo sobre el resto de muestras de otros alimentos (yogur, refrescos...).

También, cabe destacar el bajo porcentaje de estudios encontrados de estas

características para los aceites, sólo un 7%. Esto a su vez pone de manifiesto, el interés y relevancia de la investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral para el sector productivo del olivar y del aceite de oliva virgen extra, contribuyendo con sus resultados a visualizar qué migración de antimonio tiene lugar desde el envase de PET a los aceites de oliva.

Los límites máximos de residuos (LMR) contemplados en las normativas internacionales, son casi todos para el agua y alguno para aceites vegetales, como el de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

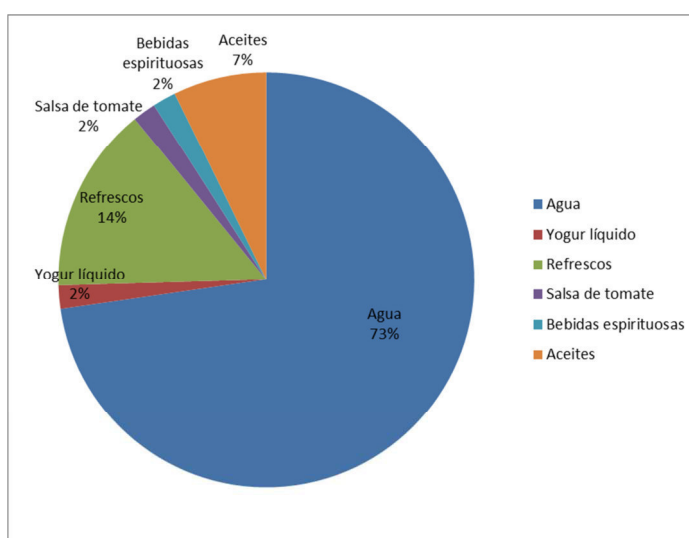


Figura 3.13. Porcentaje de los alimentos en los que se determina antimonio, (2009 - 2019)

Fuente: ISI Web of Knowledge

Por tanto, urge la necesidad de ampliar estudios en otros alimentos, también en el aceite de oliva virgen extra. Es necesario por tanto, llegar a conocer qué niveles de concentración de antimonio, por migración desde los envases PET tan extendidos, pueden estar presentes en este producto, el AOVE, que en la actualidad ya ha adquirido la condición de grasa saludable, base de la dieta Mediterránea, y que por esta razón, entre otras, está alcanzando un interés comercial extraordinario.

Con ello, se contribuirá a establecer las condiciones adecuadas de manejo de los envases PET que contengan aceites de oliva, tanto en su transporte y almacenamiento, como durante su exposición a la luz en las estanterías de los establecimientos de

distribución y venta, o incluso en su manipulación en el hogar. Así, se podrá garantizar que la presencia de Sb está controlada y por debajo de límites peligrosos para la salud, y, al mismo tiempo, que las características propias de su categoría como aceite de oliva virgen extra se pueden mantener hasta el momento de su consumo.

4. OBJETIVOS

Actualmente, la creciente preocupación por la salud y el cuidado de la alimentación ha generado en la sociedad una corriente de opinión en la que la seguridad alimentaria es un aspecto básico y vigilado. Por ello, desde los diferentes organismos internacionales, las agencias y los gobiernos se han tomado medidas para ejercer un mayor control sobre la calidad y seguridad de estos alimentos, evitando de esta manera generar alarma social entre los consumidores, lo que podría suponer repercusiones económicas negativas, para el sector industrial alimentario.

Con ese enfoque global y con el propósito de contribuir a la mejora de la calidad y la seguridad alimentaria, para la mejor comercialización de los aceites de oliva vírgenes extra, los objetivos que se persiguen con esta Tesis Doctoral son:

1. Realizar una revisión bibliográfica para conocer los antecedentes de estudios de trabajo de migración, de alimentos envasados en PET.
2. Conocer la legislación actual, a nivel internacional y europeo de metales pesados en alimentos.
3. Someter las muestras de los aceites de oliva virgen extra, de distintas variedades, a exposiciones diferentes de tiempo y temperatura, de almacenamiento y de exposición a la luz solar.
4. Evaluar la variación de los parámetros de calidad y de otros componentes minoritarios de interés, de las muestras de los aceites de oliva virgen extra.
5. Constatar la presencia de antimonio en las distintas muestras de aceites ensayadas y sus niveles de concentración, como consecuencia de la migración, debida a los tratamientos.
6. Determinar las variaciones de las concentraciones presentes de arsénico (As), cadmio (Cd), y plomo (Pb), en las muestras de aceites de oliva virgen extra, después del período de almacenamiento.
7. Evaluar el deterioro que sufre el PET desde el punto de vista químico cuando es sometido a las condiciones térmicas ensayadas..
8. Comparar las concentraciones de los metales pesados As, Cd, Pb y Sb, obtenidos en esta Tesis, con los datos existentes en la bibliografía.
9. Contribuir a la mejora en la trazabilidad de la industria de los aceites de oliva virgen, especialmente en la manipulación del producto envasado, con vistas a su comercialización y distribución.

10. Aportar información sobre la migración a los aceites de oliva vírgenes, desde los envases de PET, con el propósito de mejorar la seguridad alimentaria del sector.

5. PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo, se expone la parte experimental desarrollada en esta Tesis Doctoral, relacionando todos los materiales y reactivos que ha sido necesario utilizar, así como los equipos de análisis imprescindibles para la obtención de los resultados.

También, se explica el criterio de codificación de las diferentes marcas de aceite de oliva virgen extra elegidas para el estudio, basado en la diferenciación de tratamientos (de sometimiento a temperaturas y tiempos de exposición, de almacenamiento y de exposición a la luz solar).

Por último, se habla de los distintos métodos de análisis aplicados tanto a los aceites de oliva virgen ensayados, como al material de envasado que emplea cada marca de aceite. Con estos análisis se ha averiguado en qué medida se ha afectado la calidad y pureza de los primeros, determinándose, además, la presencia de trazas de As, Cd, Pb y Sb, y cómo se ha influido en la degradación del material (PET) con el que están constituidos los envases.

5.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Se relacionan en este apartado tanto los materiales como los reactivos, aportando de los mismos los datos más significativos.

5.1.1. Materiales

Los materiales utilizados son los propios de metodologías de análisis realizadas en cada caso en el laboratorio. Así, se han manejado:

- Vasos y buretas de diversos volúmenes.
- Vasos de decantación de diversos volúmenes.
- Matraces erlenmeyer de 250 mL de cuello esmerilado.
- Matraz aforado de 25 mL y 100 mL.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz (celda de cuarzo UV micro, paso de luz 1.0 cm, medidas totales 12,5 x 45mm, capacidad 0,35mL. Marca "Luzeren").
- Tubos roscados.
- Duquesas de 50 mL.
- Micropipetas. Se han usado de diferentes capacidades de trabajo, de 2 -20 μL , de 20 -200 μL , de 100 - 1000 μL .

5.1.2. Reactivos

- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ETANOL 96% PA ACS (JT Baker, Mallinckrodt Baker Europa, Deventer, Países Bajos).
- Éter dietílico ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$) max. 0,005 % H_2O (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido potásico 85% *lentejas. (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Indicador azul alcalino. (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Indicador fenoltaleína, solución 1 % etanólica (Merck, Darmstadt, Alemania).

- Cloroformo. (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Ácido acético glacial (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Yoduro de potasio (KI) PA ACS (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,005 N. analítica/cromatográfica (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Almidón ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) n. (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Isoctano, para UV-IR (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu UV-V (Fluka, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Alemania).
- Wunstorfer Strasse 40
- D-30926 Seelze, Germany).
- Carbonato sódico (Na_2CO_3) BioXtra, $\geq 99.0\%$ (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido cafeico. $((\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH} = \text{CHCO}_2\text{H})$, $\geq 98.0\%$ (HPLC) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Fenoltaleína 1%, solución etanólica. (Fluka, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Alemania)
- Metanol (CH_3OH) PA-ACS-ISO; también para cromatografía de gases (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua Milli-Q (Millipore. Bedford, Massachusetts, EEUU).
- N-hexano. ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2$) para UV-IR-HPLC (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Isopropanol. $((\text{CH}_3)_2\text{CHOH})$, para UV-IR-HPLC (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Ciclohexano. Para UV-IR-HPLC (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Ácido nítrico (HNO_3), 65%, max. 5 ppb Hg (Panreac, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Alemania).
- Peróxido de hidrógeno. 30 v/v % (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Disolución estándar multipatrón-2A, de 10 $\mu\text{g/mL}$, que contiene los metales pesados As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb y Sn (Agilent. Palo Alto, California, EEUU)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), 97% p/v (Merck, Darmstadt, Alemania).

5.2. EQUIPOS

A continuación, se detallan todos los equipos utilizados en esta Tesis Doctoral para el análisis de la calidad de los aceites de oliva vírgenes extra, de migración de los envases de PET y en la determinación de metales pesados.

5.2.1. Estufas, congeladores y otros

Se relacionan según su tamaño e importancia en el proceso analítico.

- Agitador de tubos, tipo vortex.
- Balanzas de precisión y analíticas. De METTLER (Mettler-Toledo S.A.E., L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).
- Baño de arena.
- Estufa. Con termostato regulable y circulación de aire. De Mecánica Científicas. (Mecánicas Científicas S.A., Getafe, Madrid, España)
- Frigoríficos. CONVI (-18°C). De LG (LG-Electronics, Las Rozas, Madrid, España)
- Congelador. Congelador -86°C de New Brunswick Scientific, modelo U570, con una capacidad de 570 litros y nueve compartimentos (New Brunswick Scientific, Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos) (Figura 5.1).



Figura 5.1. Congelador de -86°C. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.2.2. Digestor asistido por microondas

El equipo utilizado en la digestión de las muestras de AOVE, que se puede ver en la Figura 5.2, es un sistema de reacción acelerada de microondas CEM, modelo MARS Xpress (CEM Corporation, Matthews, Carolina del Norte, EEUU) con potencia regulable entre 0 y 1.600 Vatios a una frecuencia de 2.455 MHz.

Este equipo, que funciona con un Software Synergy Prep. de control y monitorización de las operaciones, está provisto de un sistema de control de temperatura por infrarrojo mediante dos sensores situados en la parte inferior de la cavidad interior. Posee un sistema de plato giratorio de movimiento continuo, la temperatura es medida en cada vaso. Dispone también de un sistema de agitación de muestras mediante generación de un campo magnético rotatorio en la parte inferior del equipo. Este sistema ofrece la posibilidad, colocando agitadores magnéticos en el interior de los vasos, de trabajar con agitación del contenido de los mismos asegurando la homogeneización de las muestras.

El sistema de seguridad implantado en este equipo se denomina ReactiGuard y detiene su funcionamiento si se detecta cualquier incidente en alguno de los vasos dentro del microondas. Como complementos posee además un carrusel de 40

posiciones para vasos modelo Xpress, y un juego de 40 vasos del citado modelo Xpress con rango de temperatura hasta 220°C y una presión máxima de trabajo de 500 psi. Tiene además un sistema de extracción para eliminar los posibles gases corrosivos o perjudiciales y los vapores inflamables acumulados en el microondas.



Figura 5.2. Digestor por microondas. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.2.3. Espectrofotómetro de absorción de UV-V

El espectrofotómetro empleado es el modelo Varian Cary 4.000 (Varian Inc. CP-3800 Walnut Creek, California, EEUU) de la Figura 5.3, que proporciona una excelente resolución a lo largo del espectro UV-visible, desde 175 a 900 nm. El detector es un tubo fotomultiplicador R928 de alta eficacia. Lleva lámpara halógena de tungsteno para visible y de deuterio para UV. También consta de una lámpara de mercurio para validación de la precisión de la longitud de onda. Su sistema de doble haz reduce el ruido y la luz dispersada considerablemente.

El software Cary WinUV tiene multitud de aplicaciones, permitiendo hacer tanto medidas puntuales como barridos en todo el rango espectral, así como aplicaciones concretas para determinar concentraciones, estudio de cinéticas y cinéticas enzimáticas, RNA-DNA. También consta de una aplicación para la validación del equipo.

Dispone de soporte para muestras líquidas, para microcubetas, extensión del compartimento de muestras y accesorios como una esfera integradora, para medidas de reflectancia difusa, un accesorio Sipper, para medidas en flujo de rutina, con un control de temperatura entre 0°C y 40°C, así como una sonda de fibra óptica.



Figura 5.3. Espectrofotómetro UV-V. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.2.4. Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier

Los análisis de infrarrojo de las muestras se llevaron a cabo mediante un Espectrómetro (FT-IR) Bruker (Bruker Systems, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) modelo Tensor 27, con ATR (Figura 5.4). Las características de este espectrómetro de infrarrojo por Transformada de Fourier son las siguientes:

- Rango espectral $7500\text{-}370\text{ cm}^{-1}$, divisor de haz de bromuro de potasio (KBr).
- Detector (DLATGS) de alta sensibilidad y ventanas de KB.
- Interferómetro de alineación permanente y de alta estabilidad Rocksolid™.
- Detector externo LN-MCT, enfriado con nitrógeno líquido, con celda de gases, para realizar medidas acoplado con el equipo de análisis termogravimétrico (TG-FTIR).
- Accesorio Attenuated Total Reflectance (ATR) dura SamplIR, acoplado al compartimento de muestra para medida de reflectancia total.
- Software OPUS 5.0.



Figura 5.4. Espectrómetro FT-IR. Unidad IR y Raman / UV-visible. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

El método tuvo una resolución de 4 cm^{-1} con un simple scan-time de 64 scans en modo absorbancia. El espectro barrido fue desde los $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Se usó el método Attenuated Total Reflectance (ATR) evitando posibles zonas saturadas en el espectro. Y se usó el software, para el manejo de los datos obtenidos, OPUS viewer 6.5 de análisis de espectros.

5.2.5. Cromatógrafo de gases

Para el análisis de los ácidos grasos, se ha empleado un cromatógrafo de gases de la marca Shimadzu, modelo GC-2010 Plus ATF (Shimadzu Corporation, Kioto, Prefectura de Kioto, Japón), que se observa en la Figura 5.5. Sus características técnicas son un doble puerto de inyección de columnas capilares, tipo Split/Splitless.

Se emplea columna cromatográfica SP-2380 de $60\text{ m} \times 0,2\text{ mm} \times 0,2\text{ }\mu\text{m}$, (Supelco, Pensilvania, EEUU). Consta de control digital del flujo, un Detector FID, un detector ECD-2010Plus, un Detector TCD y un Inyector automático AOC-5000 (PAL LHS2-SHIM) para inyección de líquidos (hasta $10\text{ }\mu\text{L}$) o espacio en cabeza head-space (hasta $2,5\text{ mL}$). Como gas portador utiliza Helio. Y el tratamiento de los resultados se hace mediante Software libre “Shimadzu GC solution”.



Figura 5.5. Cromatógrafo de gases. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.2.6. Cromatógrafo de líquidos (HPLC)

El cromatógrafo de líquidos utilizado se puede observar en la Figura 5.6, es un modelo Prominence de la Serie 20 (Shimadzu Corporation, Kioto, Prefectura de Kioto, Japón), que dispone de los siguientes componentes fundamentales:

- Detector Array de diodos (SPD-M20A) que permite trabajar con lámpara de deuterio y wolframio entre 190 y 800 nm, con resolución de 1,4 nm; y que posee una celda de paso óptico de 10 nm y 10 μL , con una temperatura regulada entre 9°C y 50°C a presión máxima de 12 MPa.
- Colector de fracciones (FRC-10^a, sólo en AC07) con rack para 64 fracciones (tubos de 18 mm de diámetro).
- Bomba de elución (LC-20AD), con presión de 40 MPa hasta 5 mL/minuto y 20 MPa hasta 10 mL/minuto.
- Desgasificador por vacío (DGU-20A5) para cinco líneas de flujo de hasta 20 mL/minuto cada una.
- Inyector automático con refrigerador (SIL-20A8HT), con un volumen de inyector variable de hasta 100 μL , y dos racks para 70 y 10 viales de 1,5 mL con temperatura controlada entre 4°C y 40°C.
- Horno de columnas (CTO-10ASvpC)
- Columna Shimadzu de uso general (Shim-pack VP-ODS)



Figura 5.6. Cromatógrafo de líquidos. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.2.7. Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo

El equipo utilizado (Figura 5.7) es un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) modelo 7.500a de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU), que permite el análisis químico cualitativo y cuantitativo de la mayoría de elementos de la tabla periódica en un amplio rango de concentraciones desde ppt hasta cientos de ppm en soluciones acuosas.

Este modelo dispone de un muestreador de 96 posiciones para introducción automática de muestras mediante una bomba peristáltica, un nebulizador tipo Babington y una cámara de nebulización de cuarzo refrigerada por Sistema Peltier, una antorcha de plasma de argón a través de conos de la interfase de níquel, atomizador y analizador de masas tipo cuadrupolo.

El equipo además, está dotado del software ChemStation, un paquete de programas específicos que permiten por un lado el control del equipo y por otro el desarrollo de métodos analíticos para la adquisición y posterior tratamiento de datos.



Figura 5.7. Espectrómetro ICP-MS. Fuente: CICT de la Universidad de Jaén.

5.3. MUESTRAS Y TRATAMIENTOS. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS

En este subcapítulo se van a exponer las variedades de aceite de oliva virgen extra elegidas para el estudio, los distintos tratamientos a que han sido sometidos, tanto los aceites como los envases PET y los criterios elegidos para su codificación.

5.3.1. Muestras

Las muestras utilizadas para todas las investigaciones planteadas se corresponden con aceites de oliva virgen extra (AOVE) de las variedades picual, hojiblanca y *Arbequina*, agrupadas según lo especificado en la tabla 5.1. Dichas variedades se han conseguido eligiendo 5 marcas, referidas con los números 1 al 5, de tal modo que de cada marca se han tomado diferentes muestras (Tabla 5.1)

Tabla 5.1. Muestras según variedades

MARCA	MUESTRA	VARIEDAD
1	A	<i>Picual</i>
2	B	<i>Picual</i>
3	C	<i>Picual</i>
4	D	<i>Picual</i>
1	E	<i>Arbequina</i>
2	F	<i>Arbequina</i>
2	G	<i>Hojiblanca</i>
5	H	<i>Hojiblanca</i>

Con la elección de dichas marcas se ha querido abarcar la diferente oferta comercial existente en los expositores de tiendas, supermercados y grandes superficies. Es decir, que se han elegido marcas de interés comercial del ámbito local-comarcal (3 y 4), nacional (1 y 2), así como marcas blancas (5).

Una vez adquiridas las botellas de las cinco marcas seleccionadas, se almacenaron hasta el inicio del procedimiento experimental al abrigo de luz y temperatura ambiente, para conservar sus propiedades hasta someterse a los distintos tratamientos elegidos.

5.3.2. Tratamientos

Las muestras se sometieron a tratamientos de temperatura, de tiempo de almacenamiento y de exposición a la luz solar, para simular periodos de depósito prolongados y de exposición en estand comerciales respectivamente.

Concluida cada exposición, los aceites se conservaron en botellas de vidrio ámbar almacenadas en congelador a -18°C y -86°C hasta el momento del análisis químico, para evitar cualquier alteración de los aceites de oliva vírgenes.

5.3.2.1. Tipo de tratamientos

Se incluyen en la investigación las muestras testigo de las cinco marcas elegidas, es decir, las muestras que se analizaron sin que sufrieran ningún tipo de tratamiento.

a) Tratamiento térmico

Para este tipo de tratamientos se eligieron distintas temperaturas y tiempos de exposición, que fueron los siguientes:

- Temperaturas de 40°C , durante 2 y 3 semanas
- Temperaturas de 60°C , durante 2 y 3 semanas
- Temperaturas de 80°C , durante menos de una semana

Para el de 80°C las botellas de polietilentereftalato (PET) sólo soportaron el primer día de la semana en dicha exposición. Las deformaciones del PET impidieron continuar con el tratamiento hasta el séptimo día, pues se corría el peligro de vertido del aceite y, por tanto, de hacer inservibles las muestras por contaminación.

Las muestras elegidas para este tratamiento incluyen las marcas 1, 2, 3, 4 y 5 consideradas para esta Tesis Doctoral, y comprenden las variedades *Picual*, *Hojiblanca* y *Arbequina* (muestras A, B, C, D, E, F, G y H).

b) Tiempo de almacén durante 18 meses

El tiempo de almacenamiento de 18 meses se ha elegido para superar el tramo general de un año, a partir del cual la mayoría de variedades comercializadas van perdiendo sus propiedades nutricionales y organolépticas.

Al igual que en el tratamiento térmico todas las muestras tratadas son de las marcas 1, 2, 3, 4 y 5 consideradas en el estudio (muestras A, B, C, D, E, F, G y H).

c) Tratamiento de exposición a la luz solar

Para la investigación que nos ocupa ha resultado interesante someter a los aceites de oliva virgen de las marcas elegidas a diferentes exposiciones a la luz solar, simulando distintas intensidades de degradación.

- Exposición a la luz solar durante 1, 2, 3 y 4 semanas

Todas las muestras tomadas para este tratamiento son de las marcas 1, 3 y 5, y comprenden las variedades *Picual*, *Hojiblanca* y *Arbequina* (muestras C, E y H).

5.3.2.2. Digestión de aceites y de envases de polietilentereftalato (PET)

a) Digestión de los aceites de oliva vírgenes extra (AOVE)

Seleccionando el procedimiento específico para muestras grasas, la digestión de todas las marcas y muestras se ha hecho en un digestor asistido por microondas. Para el tratamiento de las muestras se han pesado 0,5 g de cada uno de los aceites vírgenes extra seleccionados en balanza analítica. Se han incorporado al vaso de teflón tipo Xpress, añadiendo 6 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2 . Una vez cargado el carrusel, con todos los vasos debidamente introducidos y convenientemente cerrados se han sometido al procedimiento de digestión para muestras grasas según el ciclo de temperaturas expuesto en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Programa para la digestión de los aceites de oliva virgen

PERIODO	POTENCIA	%	TIEMPO DE RAMP (minutos)	PRESIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO (minutos)
1	800	100	5	0	90	3
2	800	100	5	0	120	3
3	800	100	5	0	150	3
4	800	100	5	0	180	3

Superados los periodos, se dejaron enfriar los vasos y, a continuación, se transfirió el contenido a un matraz aforado de 100 mL, que se enrasó con agua Milli-Q. De este modo quedó preparado como muestra para análisis mediante ICP-MS.

b) Digestión del polietilentereftalato (PET) del envase

La digestión de todas las marcas y muestras de envase de PET se ha hecho con un baño de arena durante 30 minutos. Para ello, se han triturado y pesado en balanza analítica 0,15 g de PET de cada una de las botellas analizadas, que se ha introducido en un matraz erlenmeyer esmerilado, adicionando 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Transcurridos los 30 minutos, las muestras se han sacado del baño de arena y se han dejado enfriar. A continuación y para eliminar cualquier coloración de la muestra, se les ha añadido 2 mL de peróxido de hidrógeno. Tras la digestión del PET, se ha diluido hasta un volumen de 100 mL en un matraz aforado, con ácido nítrico al 2%, para su posterior análisis mediante ICP-MS.

5.3.3. Codificación de muestras

La codificación de muestras se ha hecho conforme a los distintos tratamientos ya descritos a las que se han sometido los aceites (almacenamiento, exposición a temperaturas durante distintos periodos de tiempo y exposición a la luz solar en diferentes periodos también de tiempo. Las marcas 1 a 4 se han codificado correlativamente en las muestras A, B, C y D para su formato comercial de aceites de

oliva vírgenes extra de la variedad *Picual*. Las muestras de las marcas 1 y 2, en su formato para aceites vírgenes extra de la variedad *Arbequina*, se han codificado con las letras E y F respectivamente. Y los formatos de vírgenes extra de la variedad *Hojiblanca* de las marcas 2 y 5, se han codificado para sus respectivas muestras con las letras G y H.

El resultado final de la codificación es el siguiente:

- Testigo. Para los AOVE que no han sufrido ningún tipo de tratamiento.
- Almacén. Para los AOVE que se han almacenado durante 18 meses, después de su adquisición.
- Estu-40(2). Para los AOVE que han sido sometidos mediante estufa a una temperatura de 40°C durante dos semanas.
- Estu-40(3). Para los AOVE que han sido sometidos mediante estufa a una temperatura de 40°C durante tres semanas.
- Estu-60(2). Para los AOVE que han sido sometidos mediante estufa a una temperatura de 60°C durante dos semanas.
- Estu-60(3). Para los AOVE que han sido sometidos mediante estufa a una temperatura de 60°C durante 3 semanas.
- Estu-80(1d). Para los AOVE que han sido sometidos mediante estufa a una temperatura de 80°C durante 1 día.
- LS(1). Para los AOVE expuestos a la luz solar durante una semana.
- LS(2). Para los AOVE expuestos a la luz solar durante dos semanas.
- LS(3). Para los AOVE expuestos a la luz solar durante tres semanas.
- LS(4). Para los AOVE expuestos a la luz solar durante cuatro semanas.

A modo de ejemplo, para una muestra de la marca 1, de la variedad *Picual*, que se ha sometido a un tratamiento térmico de 40°C durante tres semanas, su codificación será **Estu-40(3)-A**. Esa misma marca 1, pero de la variedad *Arbequina* con un tratamiento de dos semanas de exposición a la luz solar, su muestra se codificará como **LS(2)-E**.

Todos estos códigos se exponen en la Tabla 5.3, donde se puede apreciar también qué muestras se han elegido para cada tipo de tratamiento.

Tabla 5.3. Códigos de las muestras analizadas

MUESTRA	CÓDIGO	MUESTRA	CÓDIGO
A	Testigo-A Estu-40(2)-A Estu-40(3)-A Estu-60(2)-A Estu-60(3)-A Almacén-A	B	Testigo-B Estu-40(2)-B Estu-40(3)-B Estu-60(2)-B Estu-60(3)-B Almacén-B
C	Testigo-C Estu-40(2)-C Estu-40(3)-C Estu-60(2)-C Estu-60(3)-C Almacén-C	D	Testigo-D Estu-40(2)-D Estu-40(3)-D Estu-60(2)-D Estu-60(3)-D Almacén-D
E	Testigo-E Estu-40(2)-E Estu-40(3)-E Estu-60(2)-E Estu-60(3)-E Almacén-E	F	Testigo-F Estu-40(2)-F Estu-40(3)-F Estu-60(2)-F Estu-60(3)-F Almacén-F
G	Testigo-G Estu-40(2)-G Estu-40(3)-G Estu-60(2)-G Estu-60(3)-G Almacén-G	H	Testigo-H Estu-40(2)-H Estu-40(3)-H Estu-60(2)-H Estu-60(3)-H Almacén-H
C	LS(1)-C LS(2)-C LS(3)-C LS(4)-C	E	LS(1)-E LS(2)-E LS(3)-E LS(4)-E
H	LS(1)-H LS(2)-H LS(3)-H LS(4)-H		

Como se aprecia, no se han incluido las muestras tratadas a 80°C, pues finalmente se han desechado del estudio, por no ofrecerse las condiciones de conservación deseadas, tras deformarse y abrirse los envases expuestos al calor.

5.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos de análisis que se exponen a continuación son los correspondientes a las muestras de los aceites vírgenes extra, así como al material de los envases, que es el polietilentereftalato (PET).

Con el análisis de los AOVE seleccionados se pretende saber si las condiciones ensayadas en el laboratorio de temperatura y tiempo de almacenamiento, así como de exposición a la luz solar afectan a su calidad y pureza, atendiendo a sus propiedades físico-químicas, sensoriales y a la composición de los ácidos grasos, así como al estudio de los componentes minoritarios, pigmentos, polifenoles y α -tocoferoles. Con dichos análisis además, se ha determinado la presencia de trazas, As, Cd, Pb y Sb.

Los análisis del polietilenterftalato (PET) ha servido para conocer si el material de los distintos envases seleccionados, han sufrido procesos de degradación, como consecuencia de los distintos tratamientos.

5.4.1. Medida de la calidad y pureza

A diferencia de otros productos alimenticios, el AOVE se debe analizar tanto química como sensorialmente. Y es muy importante indicar, que los resultados de ambas analíticas definen su clasificación comercial final.

Todos los análisis realizados y reflejados en este apartado son los establecidos en la normativa COI/T.20/Doc.15, y en el Reglamento de ejecución UE 299/2013.

5.4.1.1. Propiedades físico-químicas

a) Grado de acidez

El grado de acidez determina la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite y se expresa en porcentaje de ácido oleico.

En el proceso analítico, las muestras de aceite homogéneas y filtradas se pesaron hasta el valor de 20 gr, que es el propio para aceites que se presumen con una acidez menor de 1 grado.

Se disolvieron a continuación en 50 mL de una mezcla de etanol al 95% y éter dietílico, en la proporción 1:1. Esta mezcla debió ser previamente neutralizada en el momento de su utilización con una solución de hidróxido potásico 0,1 M, en presencia de 0,3 mL de solución de fenolftaleína por cada 100 mL de mezcla.

Después se hizo una valoración ácido-base con una disolución de hidróxido potásico 0,1 M, agitando hasta producirse el viraje del indicador azul alcalino utilizado (apareció coloración rosa permanente, al menos durante 10 segundos).

b) Índice de peróxidos

El índice de peróxidos valora el estado de oxidación inicial de un aceite y hace referencia a la cantidad (expresada como miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de hidroperóxidos en la muestra, que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas en el reglamento. El yodo liberado se valora con disolución valorada de tiosulfato sódico.

El ensayo se realizó con luz artificial, para proteger las muestras de la luz natural. Primero se llenó de nitrógeno un matraz erlenmeyer de 250 mL con cuello esmerilado, provisto de tapón y seco para evitar en la medida de lo posible la oxidación del KI por el contacto con aire (llamado error de oxígeno). Luego, rápidamente se introdujo en éste la muestra de entre 1,2 y 2,0 g de aceite (la cantidad pesada se correspondió con el dato que se presumía conseguir para un AOVE, de 12 a 20 meq de O₂/kg)

A continuación, como disolvente se agregaron agitando 10 mL de cloroformo, 15 mL de ácido acético glacial y 1 mL de solución saturada de yoduro de potasio. Se cerró el matraz y se mantuvo en agitación durante 1 minuto, para luego conservarlo en oscuridad durante 5 minutos. Por último, se añadieron 75 mL de agua destilada, y se valoró en agitación el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃ 0,005 N), utilizando como indicador 2 mL de solución de almidón.

c) Análisis de los K_{232} y K_{268}

Mediante prueba espectrofotométrica en el UV se miden los coeficientes de extinción específica a las longitudes de onda 232 nm y 268 nm. A partir de los resultados para los coeficientes de extinción K_{232} y K_{268} , se indica cuál es la calidad del aceite estudiado.

Para este análisis la materia grasa debe estar exenta de sustancias en suspensión. Por ello, ninguna de las muestras presentó turbidez o sustancias en suspensión, lo que hizo innecesario su filtrado.

Para ello, se pesó con precisión de 0,5 mg y en un matraz aforado de 25 mL la cantidad necesaria de materia grasa, 100 mg, cantidad que guardaba relación con el dato de absorción en el ultravioleta esperada para un AOVE. Luego, se disolvió en isooctano y se completó hasta el enrase. Además, la disolución debe tener una concentración tal que la absorbancia leída en el espectrofotómetro se encuentre dentro de los límites indicados más adelante. Por tanto, se hicieron diluciones en los casos en que los valores de extinción obtenidos superaron el rango 0,1-0,8.

Para medir en el espectrofotómetro a las longitudes de onda deseadas se introdujeron las disoluciones en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

5.4.1.2. Análisis sensorial

En los AOVE, se puede dar una enorme diversidad de características sensoriales que varían y dependen de factores tales como la variedad de la aceituna, las técnicas de cultivo aplicadas, la maduración a la que se decide la recolección y las características agroclimáticas del medio y del año de producción. También, las posibles composiciones o “coupages” de varios aceites con vistas a la obtención de un producto agroalimentario con distinción comercial, hacen que esa diversidad de características sensoriales sea aún mayor y, hasta cierto punto, parecida a la de los vinos de calidad, lo que va más allá de un mero análisis químico.

Para precisar de una manera científica cuáles son las características organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, el COI decidió en 1981 establecer un método tipo que así lo permitiera, mediante el desarrollo y normalización ISO del análisis sensorial. Así, se adoptó en 1987 un método y unas normas en las que se fijaron diferentes requisitos, tanto de condiciones semánticas, físicas y materiales, como de los procedimientos aplicables a dicho método.

El método del análisis sensorial se consigue mediante la ejecución de las conocidas como pruebas de panel, que son una serie de ensayos organolépticos en condiciones controladas llevados a efecto por un equipo de catadores seleccionados y previamente entrenados conforme a una serie de técnicas sensoriales preconcebidas.

La norma COI T20/Doc.14, de 17 de noviembre de 1994, define el método óptimo de selección de los catadores que vayan a conformar un grupo o panel de cata, uniformizando sus evaluaciones para que sean lo suficientemente fiables y coherentes entre sí. Esta selección se consigue siguiendo las siguientes pautas de trabajo:

1. Entrenamiento previo en el análisis de aceites y selección preliminar por aspectos psicológicos.
2. Determinación de los umbrales medios de sensibilidad del grupo de aspirantes, para los defectos del aceite que determinan su categoría comercial.
3. Determinación del umbral de sensibilidad de cada catador para dichos atributos, y eliminación de los catadores menos sensibles.
4. Determinación de la constante de repetición, reproducibilidad y fiabilidad de las evaluaciones, así como entrenamiento continuado del grupo para mantenerlas.

Los miembros de un panel mínimo lo forman un jefe de panel y ocho catadores. No obstante, conforme va aumentando el número de miembros la fiabilidad y capacidad de trabajo será mucho mejor, aunque es cierto que también lo serán las dificultades para mantener el panel a punto, coordinado y entrenado.

Entrando más en el procedimiento, para evitar que las condiciones ambientales influyan en la decisión de los catadores, las salas de cata tienen unas características

concretas y bien definidas en la Norma UNE 87-004-79. Las muestras se codifican, para favorecer la incógnita de su origen y evita juicios de valor del catador. Tampoco se expone su color, pues se analiza utilizando una copa de vidrio azul oscuro según norma COI/T.20/Doc. n°5, evitando que tal percepción pueda también alterar la evaluación del catador. La copa conteniendo 15 mL de aceite se tapa con un vidrio de reloj y se calienta a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, favoreciendo así la evaporación y concentración de aromas. Por fin, el proceso de cata se desarrollará de la siguiente manera:

1. En una primera fase olfativa se identificarán y cuantificarán los aromas y su intensidad.
2. En la fase de boca, se valorarán los atributos “dulce” en la superficie de la lengua, el “amargo” al final de la lengua, el “picante”, en la garganta al tragar el aceite y respirar oxigenándolo, y la “astringencia” en la superficie de la lengua.
3. La fase retronasal, una vez ingerido el aceite, permitirá identificar aromas secundarios.

En una hoja normalizada, como la de la Figura 5.8, el catador evaluará los diferentes atributos. Así, se analizará la intensidad de cada uno en una escala no estructurada de 10 cm de longitud. Por tanto, se recogerán las sensaciones positivas de frutado de aceituna, amargor y picante; también, la de otros siete atributos del aceite, esta vez negativos. Unos propios de la mala calidad de la aceituna, como son atrojado, avinado y moho, otros consecuencia del proceso extractivo y de conservación, como son borras, rancio o metálico, y cualquier otro defecto de los definidos en la norma en vigor.

HOJA DE PERFIL DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS

Atrojado/Borras		➔
Moho-Humedad-Tierra		➔
Avinado-Avinagrado-Acido-Agrio		➔
Metálico		➔
Rancio		➔
Otros (cuáles)		➔

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS:

Frutado		➔
Anrargo		➔
Picante		➔

verde maduro

Nombre del catador:

Código de la muestra:

Fecha:

Observaciones

Figura 5.8. Hoja normalizada de cata de aceites (Fuente COI)

También, es posible analizar un mayor número de atributos, evaluación casi siempre reservada para aceites vírgenes extra de gran calidad con ausencia total de defectos, aunque, eso sí, siempre bajo la responsabilidad de un panel reconocido, de características positivas contrastadas y con un buen entrenamiento a punto.

5.4.1.3. Ácidos grasos

La determinación por cromatografía de gases de la composición cuantitativa y cualitativa de los ácidos grasos del AOVE, según el Reglamento (CEE) 2.568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, se basa en la separación y determinación de los ésteres metílicos de esos diferentes ácidos grasos que en él se encuentran. Es aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres inferior al 3,3%.

Sabemos que el hidróxido de potasio no produce la esterificación de los ácidos grasos libres. Los ésteres metílicos se forman por la transesterificación con una solución metanólica de hidróxido potásico como una fase intermedia antes de que se produzca la saponificación.

a) Procedimiento cromatográfico

En un tubo roscado de 5 mL se pesó aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Se añadieron 2 mL de heptano para luego agitar la mezcla. Luego, se adicionaron 0,2 mL de la solución metanólica 2 N de hidróxido potásico para, una vez cerrado dicho tubo, agitarlo mediante un vibrador de presión durante 30 segundos. Una vez nítida la solución de la parte superior, que es la que contenía los ésteres se decantó para su análisis en el cromatógrafo.

El flujo del gas portador (helio) debe ser adecuado para permitir la elución del linoleato de metilo en un tiempo mínimo de 25 minutos. La presión de entrada y el flujo necesario para conseguirlo puede variar según la columna y el instrumento utilizado. Es necesario mantener el flujo constante durante todo el análisis. Dicho flujo gaseoso se mide con un medidor de burbuja de jabón.

Una vez puesta en marcha la calefacción del horno, de la cámara de inyección y del detector, las condiciones de temperatura fueron las siguientes:

- Temperatura del horno: 185 °C.
- Temperatura en cámara de inyección, idónea para volatilización: 220 °C.

- Temperatura del detector: 220 °C.

-Identificación de los picos. Se utilizó el criterio basado en los tiempos de retención. Así, primero aparecieron los ácidos grasos con menos carbonos, es decir, menos masa molecular, y, dentro de estos, primero los que conformaron menos insaturaciones (más saturados). Es decir, si nos referimos exclusivamente a los ácidos que entran normalmente en la composición de las grasas naturales, sus ésteres aparecerían en el cromatograma en orden creciente de sus átomos de carbono y de su insaturación. Esto es, el palmítico (C16) aparecería delante del esteárico (C18), y los ésteres en C18 aparecerían en el orden estearato, oleato, linoleato. El éster del ácido aráquico (C20:0), usualmente, aparecería antes del linolénico (C18:3), pero podría ocurrir lo contrario en algunos análisis, o incluso superponerse el uno al otro, dependiendo en estos casos tanto de la columna como de su utilización. Entonces, al trabajar en condiciones constantes, los tiempos de retención serían reproducibles en cada especie química, siendo por tanto éste el criterio más frecuentemente usado para su identificación.

-Determinación cuantitativa. Se basa en el principio de que las masas de cada uno de los componentes separados en la mezcla son proporcionales a las áreas comprendidas dentro de cada pico. Se utiliza el método de normalización interna. Así, se calcula el contenido de un componente dado (*i*) expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos, mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos, aplicando la expresión siguiente, donde ***A_i*** es el área del pico correspondiente al componente *i*; y **ΣA** la suma de las áreas de todos los picos integrados:

$$\%componente\ i = \frac{A_i}{\Sigma A} \times 100 \quad (5.1)$$

5.4.2. Componentes minoritarios

Los componentes minoritarios analizados son los pigmentos (clorofilas y carotenoides), los polifenoles y los α -tocoferoles. A continuación, se exponen pormenorizados los métodos empleados para cada componente.

5.4.2.1. Pigmentos

La valoración global del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides se ha realizado siguiendo el método que consiste en determinar la absorbancia de una disolución de aceite de oliva a la longitud de onda de máxima absorción del componente mayoritario de la fracción clorofílica y carotenoide, es decir, la feofitina-a y la luteína, respectivamente (Mínguez *et al.*, 1991).

En el procedimiento analítico se disolvieron 7,5 g de aceite en ciclohexano, enrasando a 25 mL. Una vez homogeneizada la disolución se leyeron las absorbancias a 670 nm, para la determinación de los pigmentos clorofílicos, y a 472 nm para los pigmentos carotenoides. Luego, la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides, en mg de pigmento por kg de aceite, se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$C = \epsilon \frac{V}{\epsilon_0 P} \times 10.000 \quad (5.2)$$

C: Concentración de pigmento en la muestra en mg/kg de aceite

ϵ : Absorbancia a 670 nm en pigmentos clorofílicos, y a 472 nm en carotenoides.

ϵ_0 : Coef. extinción específica pigmento: ϵ_0 (feofitina-a)=613; ϵ_0 (luteína)=2.000

P: Peso de la muestra (g)

V: Volumen de la disolución de pigmentos (25 mL)

5.4.2.2. Polifenoles

Los análisis para la determinación de los polifenoles totales se han hecho introduciendo como modificación la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu en vez del reactivo Folin-Denis. El procedimiento consta de dos partes: una para la extracción de los polifenoles del aceite de oliva y otra para su posterior determinación colorimétrica (Vázquez *et al.*, 1973).

El reactivo de Folin-Ciocalteu está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdicos y fosfowolfrámicos que son reducidos por los polifenoles en medio básico generando un mezcla de óxidos azules de molibdeno y wolframio cuya intensidad

es proporcional a la cantidad de polifenoles presentes.

a) Procedimiento para la obtención del extracto de polifenoles

Se disolvieron 10 g de la muestra de aceite en 50 mL de hexano y se extrajeron por triplicado con un volumen de 10 mL de una disolución de metanol: agua (60:40 v/v) en un embudo de decantación. Tras 2 minutos en agitación se dejó reposar el embudo para separar por decantación la fase hidroalcohólica, que se recogió directamente en un matraz aforado de 50 mL, que se enrasó con agua destilada.

b) Procedimiento para la determinación colorimétrica de los polifenoles

En un matraz aforado de 50 mL se adicionaron 35 mL de agua destilada, 5 mL de extracto de polifenoles y 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitó hasta homogeneizar y, pasados 3 minutos, se añadieron 5 mL de una disolución saturada de carbonato sódico. Se llevó el volumen a 50 mL con agua destilada, se mezcló y, tras 1 hora de reposo, se midió la absorbancia a 725 nm de una alícuota filtrada en una cubeta de 1 cm de paso de luz.

El blanco se midió de otra disolución preparada pero sin extracto de polifenoles. Para su cuantificación se realizó un curva patrón, procediendo de igual forma que en el análisis pero sustituyendo el extracto de polifenoles por disoluciones de ácido cafeico de concentración conocida entre 1 y 9 mg/L.

5.4.2.3. α -Tocoferoles

Para la determinación de α -tocoferoles se procede del siguiente modo. En un matraz aforado de 10 mL se disolvieron 0,2 g de muestra en 10 mL de n-hexano. A continuación, esta muestra se inyectó en un cromatógrafo líquido de alta resolución. El volumen de inyección fue de 20 μ L. La fase móvil utilizada fue hexano:isopropanol (97:3 v/v) en condiciones isocráticas y el flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min.

Los cromatogramas realizados se registraron a 275 nm. Luego, se construyeron las rectas de calibrado a partir del estándar para la cuantificación.

5.4.3. Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial, está diseñado para construir un modelo estadístico describiendo el impacto de dos o más factores categóricos (Col_1, Col_2, Col_3, etc.), de una variable dependiente. Se realizan pruebas para determinar si hay o no diferencias significativas entre las medias a diferentes niveles de los factores y si hay o no interacciones entre los factores. Para ello, se ha empleado el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion v16.1.18.exe.

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de los factores categóricos, Col_4, en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

5.4.4. Determinación de Sb en los AOVE y en los envases PET. Determinación de trazas de otros tóxicos (As, Cd, Pb)

Se ha analizado mediante ICP-MS el contenido de Sb de todas las muestras de aceite de oliva virgen “extra”, tanto de los testigos como de las sometidas a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo, almacenamiento y exposición solar. Además, se han obtenido los datos relativos a trazas de tóxicos (As, Cd, Pb) que pudieran estar presentes en el AOVE.

5.4.4.1. Condiciones para el análisis por ICP-MS

La determinación de los elementos estudiados (As, Cd, Pb y Sb) se realizó mediante ICP-MS, con un equipo que se ha descrito en el apartado 5.2.7, y según las condiciones que se detallan a continuación:

- Instrumento. Agilent 7500a
- Nebulizador. Tipo Babington
- Cámara de nebulización. Frecuencia: 10 Mhz, potencia 1300 w
- Generador RF. Frecuencia: 10 Mhz, potencia 1300 w
- Flujo de Ar (L/min). Plasma: 15; auxiliar: 0,9; nebulizador: 1-1,1
- Diámetro interno del inyector en la antorcha. 2,5 mm
- Profundidad de la muestra. 7,6 mm
- Interfase Pt cono sampler, Ni cono skimmer
- $Ce^{+}/Ce^{+} < 1,0 \%$
- Vacío. Interfase: 4 torr, cuadrupolo: 2×10^{-5} torr
- Adquisición de datos. Tiempo de réplicas: 200 ms; tiempo de permanencia: 200 ms; barridos/lectura: 3; lecturas/réplica: 3; número de réplicas: 3
- Masas analíticas. ^{75}As , ^{111}Cd , ^{208}Pb , ^{121}Sb ,
- Patrones internos. 7Li , ^{89}Y , ^{205}Tl

Indicar además, que el análisis con ICP-MS se hizo mediante el método de calibración directo, con una disolución estándar multipatrón-2-A, correspondiente para As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb y Sn, de 10 $\mu g/ mL$. Las muestras se introdujeron mediante una bomba peristáltica, pasando por el atomizador antes de llegar a la antorcha de plasma de argón.

5.4.5. Análisis del polietilentereftalato

El análisis de cada una de esas muestras de PET se llevó a cabo con el espectroscopio FT-IR ya citado en el apartado 5.2.4. Cada muestra fue escaneada en el rango 4.000-400 cm^{-1} con 32 scans a una resolución de 4 cm^{-1} . Con los resultados obtenidos se procedió al cálculo del Índice de carbonilo de cada uno de los PET, para

así poder valorar las distintas degradaciones del material según la siguiente expresión:

$$\text{Índice de carbonilo} = \frac{\text{Absorbancia } 1.715 \text{ cm}^{-1}}{\text{Absorbancia } 974 \text{ cm}^{-1}} \quad (5.3)$$

Se considera el pico a 974 cm⁻¹ como referencia, puesto que se mantiene inalterado durante las degradaciones (Rajakumar *et al.*, 2011).

6. RESULTADOS

En este capítulo, se exponen todos los resultados obtenidos, organizados según los diferentes objetivos analíticos abordados en la Tesis Doctoral.

En el trabajo de experimentación, se simularon las distintas y posibles condiciones inadecuadas de almacenamiento y exposición en estanterías de venta al público de los aceites de oliva virgen extra, modificando la temperatura y el tiempo de exposición, bien almacenando los aceites durante un largo periodo de tiempo, o exponiéndolos gradualmente a la luz solar.

Posteriormente, se consideraron las variaciones que se produjeron en la calidad y pureza de dichos aceites estudiados y las posibles migraciones de Sb, que tuvieron lugar desde el envase de polietilentereftalato (PET), a las diferentes muestras. Al mismo tiempo, se analizaron las concentraciones de tóxicos tales como As y Pb, que están legislados para el aceite, y de Cd, presentes en los aceites de las distintas muestras de estudio.

Por último, se recogieron los resultados de alteración de la composición del envase, en este caso del polietilentereftalato (PET), en el volumen comercial elegido de un litro de capacidad, para las botellas de las distintas marcas elegidas.

6.1. DEGRADACIÓN DEL PET

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos tras los distintos análisis realizados a las muestras de polietilentereftalato, procedentes de las botellas de aceite testigo y a las sometidas a los distintos tratamientos de temperatura y exposición solar, y se discute la influencia de dichos tratamientos en las propiedades del material.

En primer lugar, se muestran los espectros obtenidos en FT-IR para las muestras de PET iniciales de todos los aceites antes de los tratamientos (Figura 6.1). En ellas se observa el intervalo espectral desde los 400 hasta los 4.000 cm^{-1} , en el que se han marcado los picos más importantes.

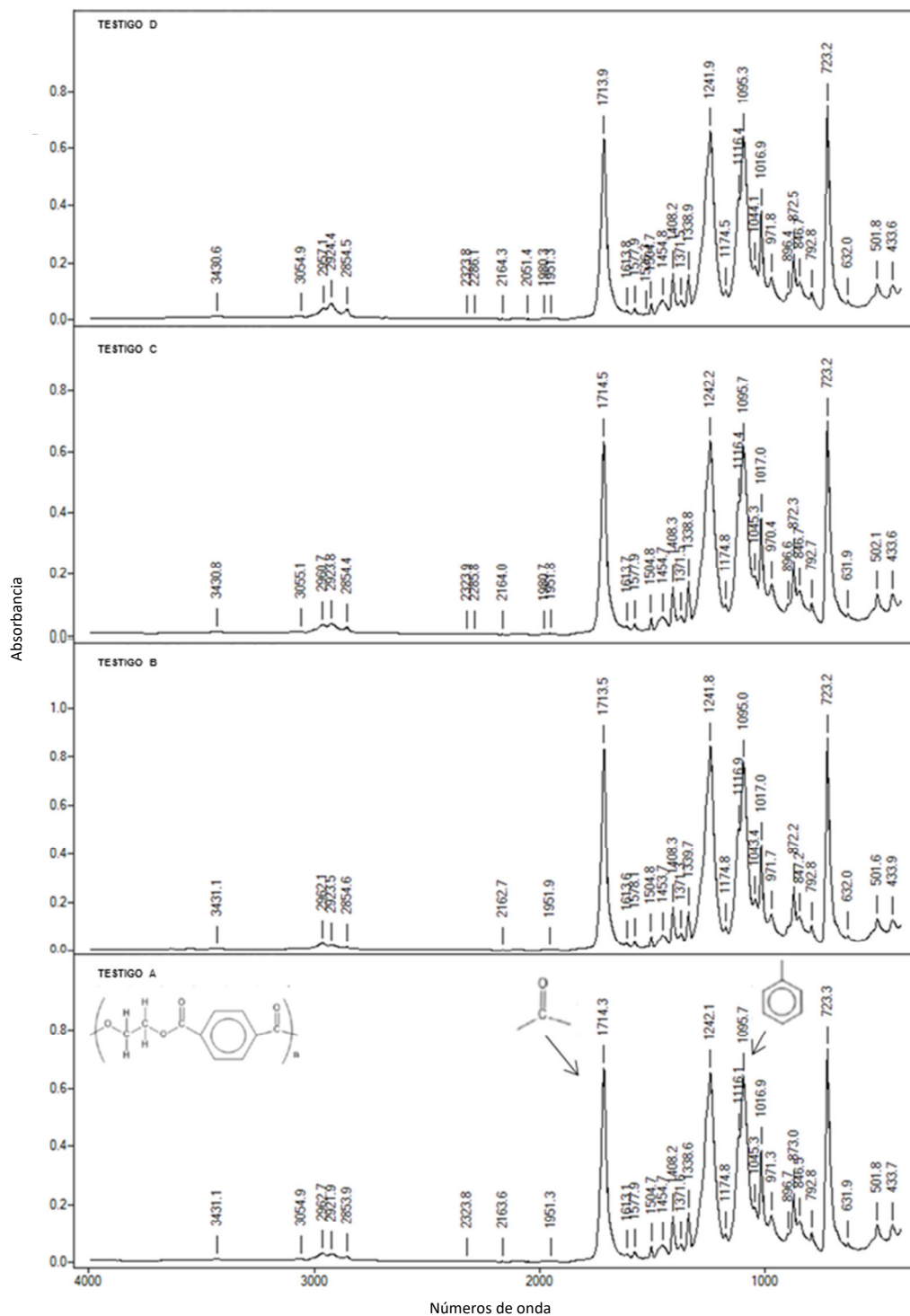


Figura 6.1. Espectros de las muestras de PET Testigo

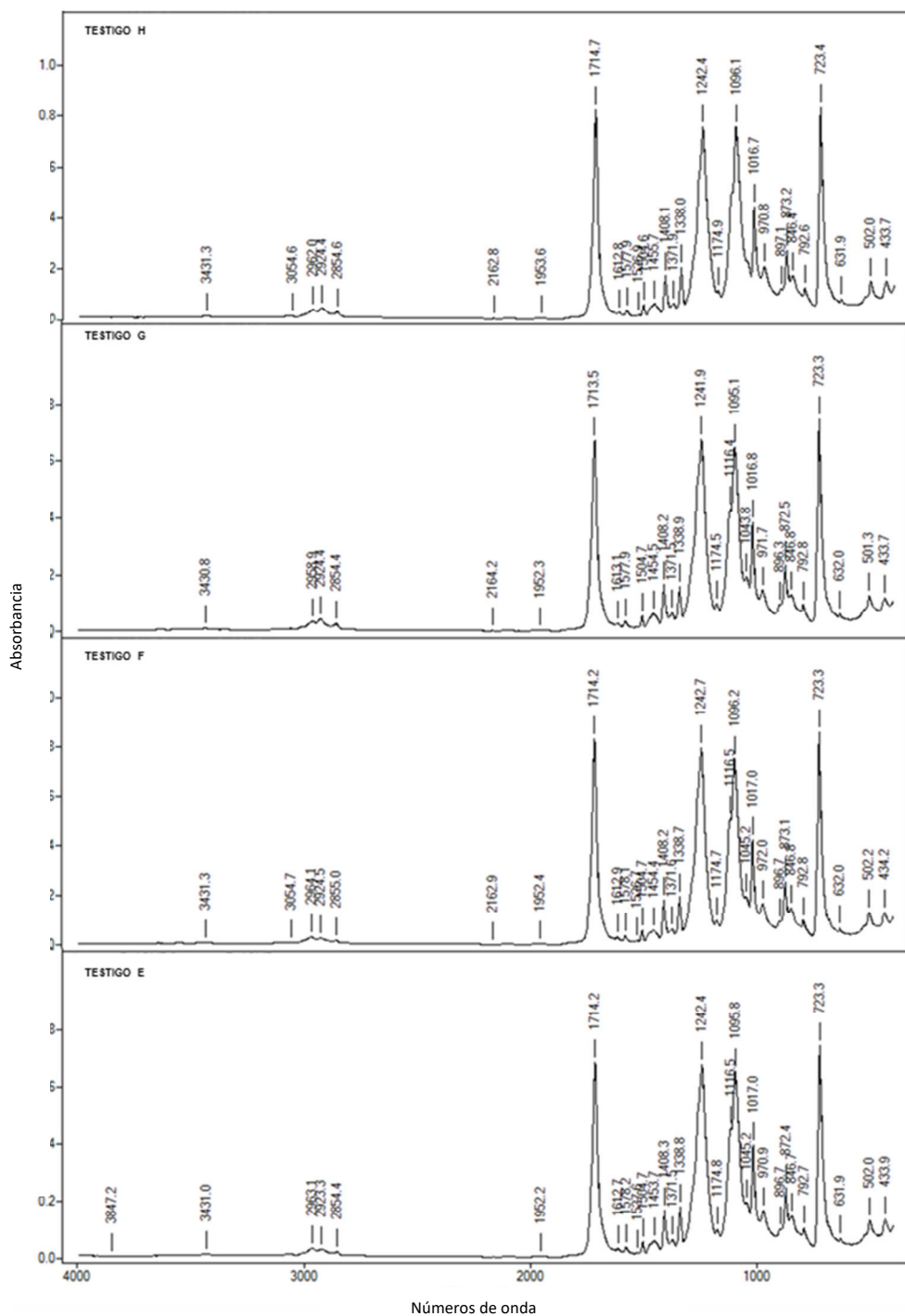


Figura 6.1. (Cont.)

Las principales bandas de absorción en los espectros IR de PET se asignan de la siguiente manera de acuerdo con la bibliografía (Chen *et al.*, 2013) y para el caso del testigo A; la banda a $3.100\text{--}2.800\text{ cm}^{-1}$ se atribuye al estiramiento del enlace C-H aromático y alifático; a 1.714 cm^{-1} para el estiramiento del enlace carbonilo del éster; en torno a $1.470\text{--}1.350\text{ cm}^{-1}$ para los modos de vibración de flexión y movimiento del segmento de etilenglicol; a 1.242 cm^{-1} el estiramiento del grupo éster; a 1.095 cm^{-1} del grupo metileno, y a 1.017 y 723 cm^{-1} la bandas aromáticas.

En la Tabla 6.1 se recogen, a modo de ejemplo, los picos identificados para el PET de la muestra Testigo A.

Tabla 6.1. Picos identificados para el PET de la muestra Testigo A

Banda	Nº de onda (cm^{-1})
3.431	Grupo OH (hidroxilo)
3.054	Estiramiento simétrico de CH
2.962; 2.908	C-H estiramiento simétrico
2.323	Deformación axial simétrica de CO_2
1.714	Estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ del grupo del ácido carboxílico
1.577; 1.504	Vibraciones del esqueleto aromático con vibraciones $\text{C}=\text{C}$
1.454; 1.408; 1.338	Vibraciones de la deformación del grupo C-O de los grupos O-H y enlaces del segmento de etilenglicol
1.242; 1.124	Grupo tereftalato ($\text{OOC}\text{C}_6\text{H}_4\text{-COO}$)
1.095; 1.045	Grupo metileno y vibraciones de los enlaces éster C-O
971; 873; 846	Anillos aromático tetra sustituidos
1.951; 792	Vibración de los H adyacentes a los anillos aromáticos en los compuestos p-sustituidos y las bandas aromáticas
723	Interacción de los grupos éster polares y los anillos de becenio

6.1.1. Muestras de PET sometidas a degradación térmica

Las muestras de PET se sometieron a tratamientos de 40, 60 y 80°C durante dos y tres semanas. Durante estos tratamientos, el PET sufrió una degradación térmica cuyo seguimiento se realizó mediante FT-IR.

La degradación térmica es aquella que actúa inducida por temperaturas elevadas en ausencia de oxígeno.

La etapa inicial de la degradación térmica, es una escisión aleatoria del enlace éster en cadena, dando lugar a la formación de un éster vinílico y grupos terminales

carboxilo. La transesterificación del éster vinílico se produce entonces para dar el alcohol vinílico, que se transforma inmediatamente en acetaldehído. La cadena de poliéster se regenera así y se mantiene un grado medio de polimerización. El resultado neto de tal reacción es la sustitución de los grupos terminales hidroxilo por los grupos terminales del ácido carboxílico, produciendo en el proceso una cantidad equivalente de acetaldehído. La abstracción del átomo de hidrógeno también puede ocurrir en cierta medida cuando las impurezas en el polímero generan sitios macro-radicales. Estos reaccionarán con el oxígeno, produciendo radicales peroxi y posteriormente hidroperóxidos, que son en sí mismos fotoquímicamente y térmicamente inestables e inducirán a una mayor degradación (Venkatachalam *et al.*, 2012); (McNeill y Bounekhel, 1991). En la Figura 6.2 se muestra el mecanismo de termodegradación.

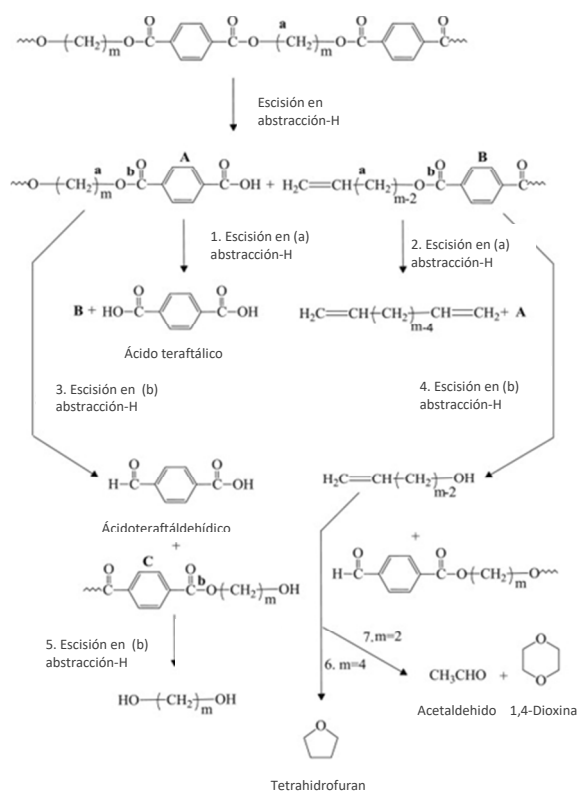


Figura 6.2. Mecanismo de termodegradación. Fuente: (McNeill y Bounekhel, 1991)

Los análisis por FT-IR corroboran los cambios estructurales obtenidos en forma de productos de degradación. Los espectros obtenidos muestran señales características del ácido tereftálico, una banda ancha desde 3.300 hasta 2.500 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión de O-H para ácidos. El amplio intervalo de frecuencia con los sub-máximos, también indica la presencia de dímeros formados a través de puentes de hidrógeno (Tellez *et al.*, 2001; (Stuart, 2004), vibración de tensión de =C-H en el anillo aromático a 3.069 cm^{-1} , tensión de C-H a 2.966 cm^{-1} , vibración de C=O desplazada a 1.682 cm^{-1} , vibraciones de tensión de C=C del anillo aromático entre 1.682 y 1.424 cm^{-1} , flexión en el plano de C-O-H a 1.424 cm^{-1} , tensión de CO a 1.261 cm^{-1} , flexión en el plano de C-H en la región de 1.261 a 1.020 cm^{-1} y banda de flexión fuera del plano de C-O-H a 932 cm^{-1} . Las bandas desde 932 a 700 cm^{-1} son relacionadas con la vibración fuera del plano del anillo aromático p-sustituido. Los resultados concuerdan con los indicados por otros investigadores sobre degradación de PET (Téllez *et al.*, 2001; Guclu *et al.*, 2003).

Los resultados concuerdan con los indicados por (Téllez *et al.*, 2001) y (Guclu *et al.*, 2003) sobre degradación de PET.

Los espectros de las Figuras 6.3 a 6.6, muestran la influencia del tiempo de exposición sobre las distintas muestras de PET.

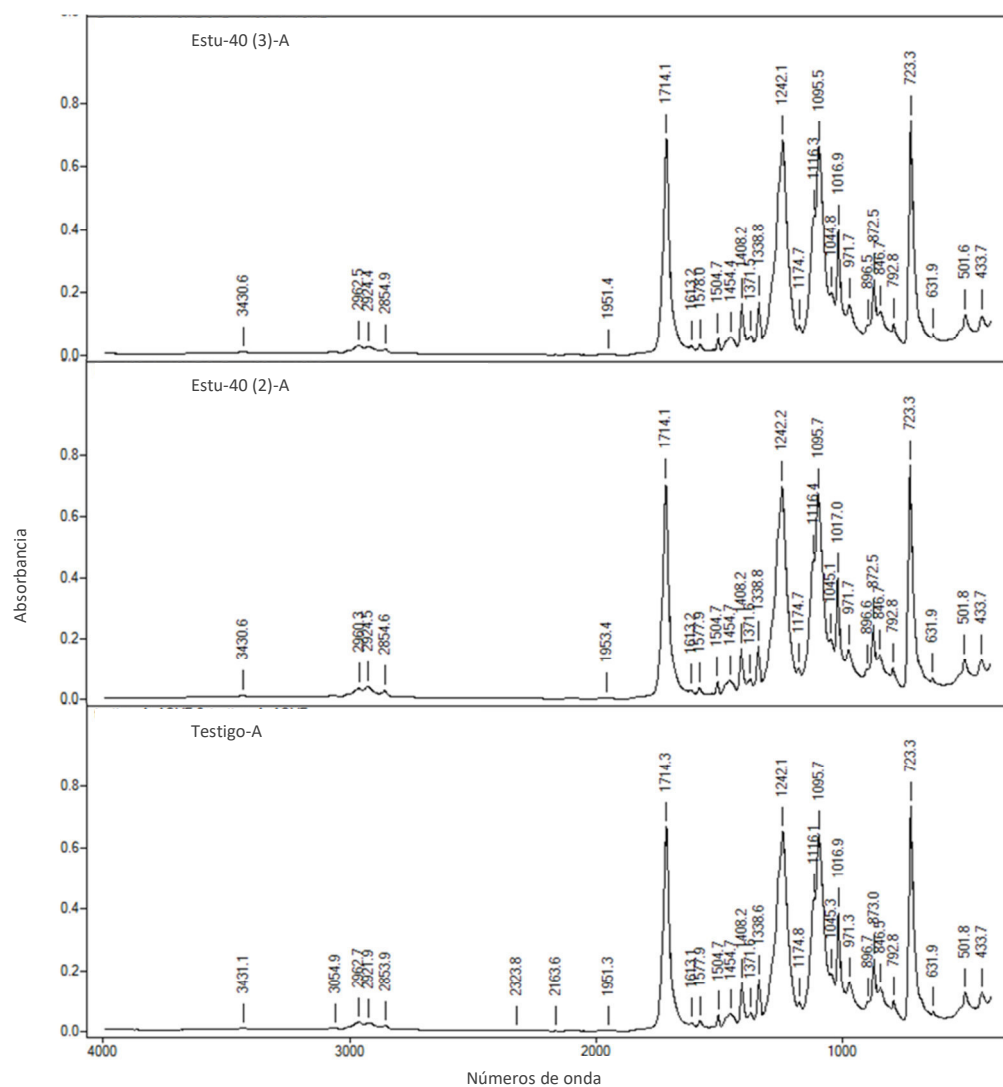


Figura 6.3. Influencia del tiempo de exposición, en estufa a 40°C, sobre la muestra A

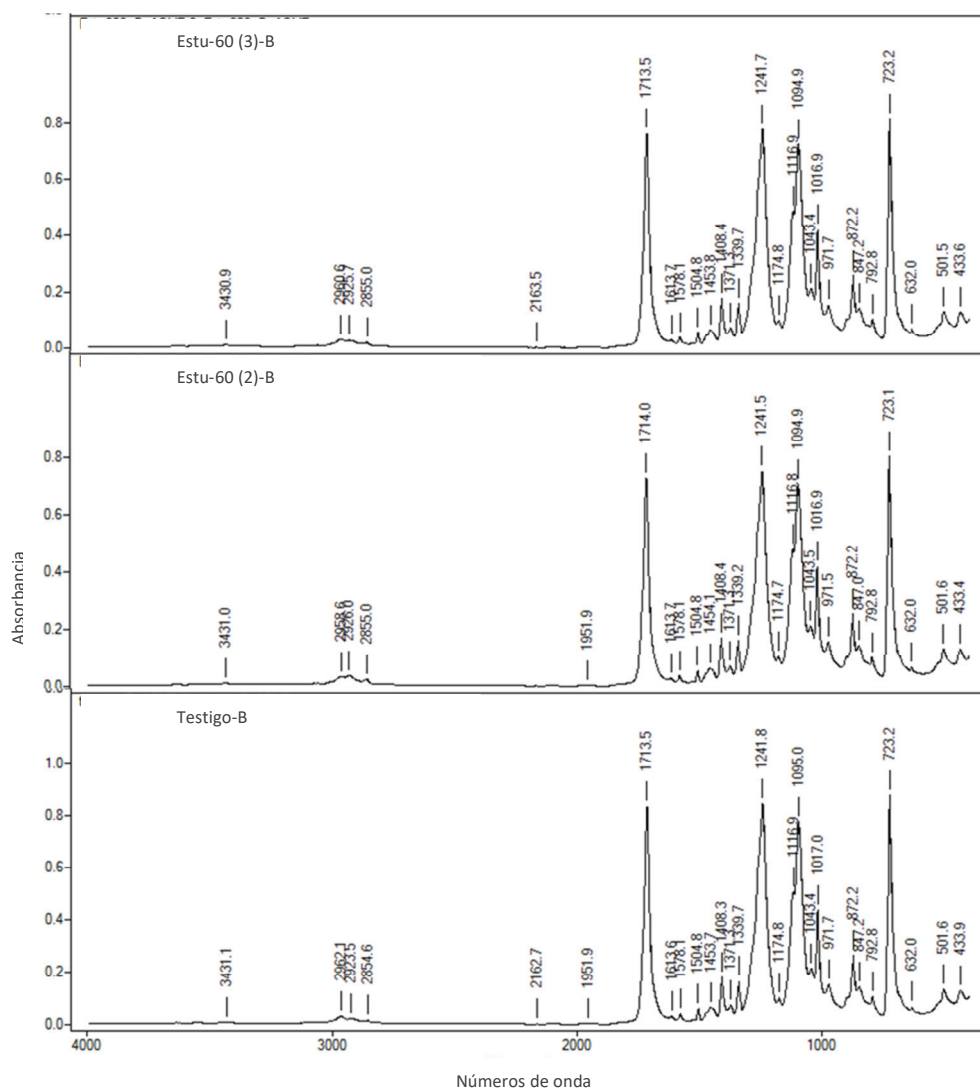


Figura 6.4. Influencia del tiempo de exposición, en estufa a 60°C, sobre la muestra B

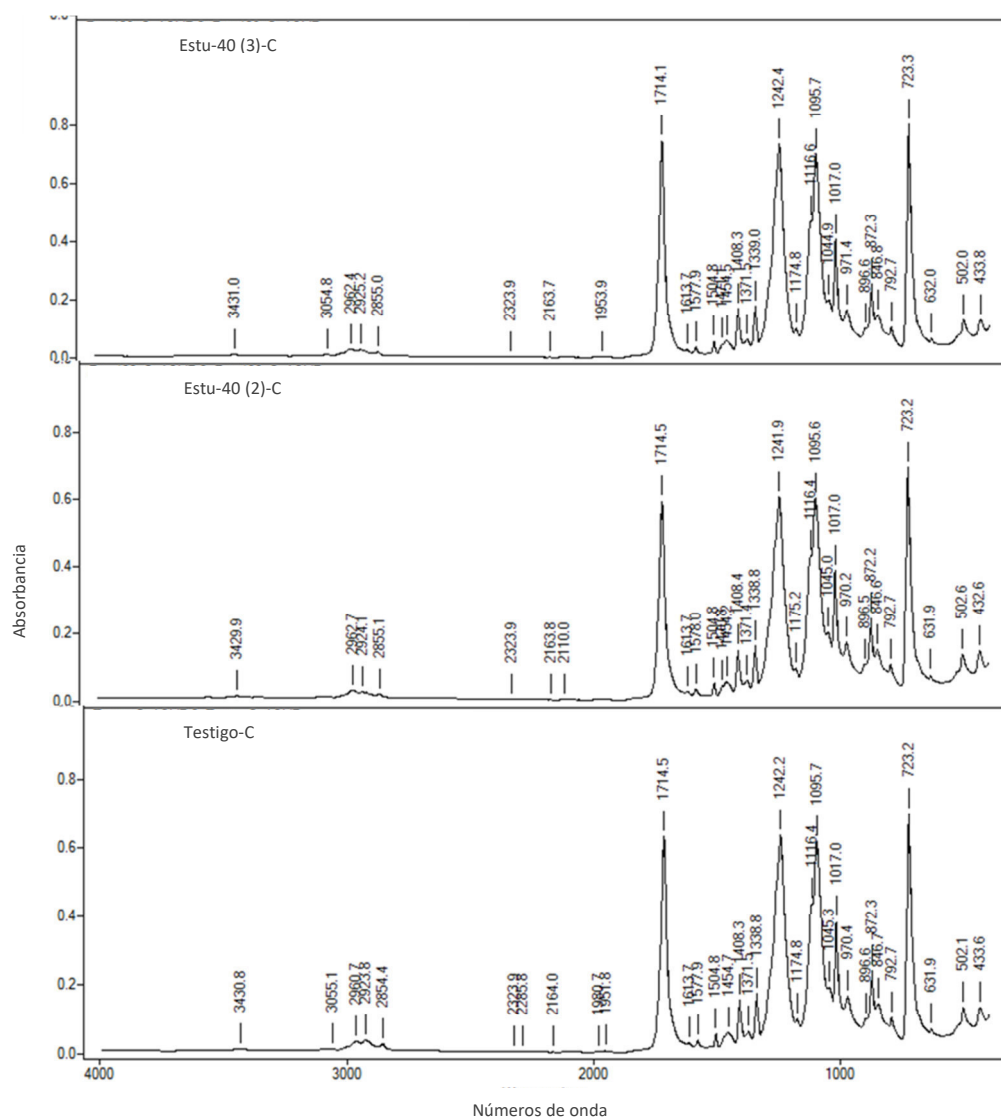


Figura 6.5. Influencia del tiempo de exposición, en estufa a 40°C, sobre la muestra C

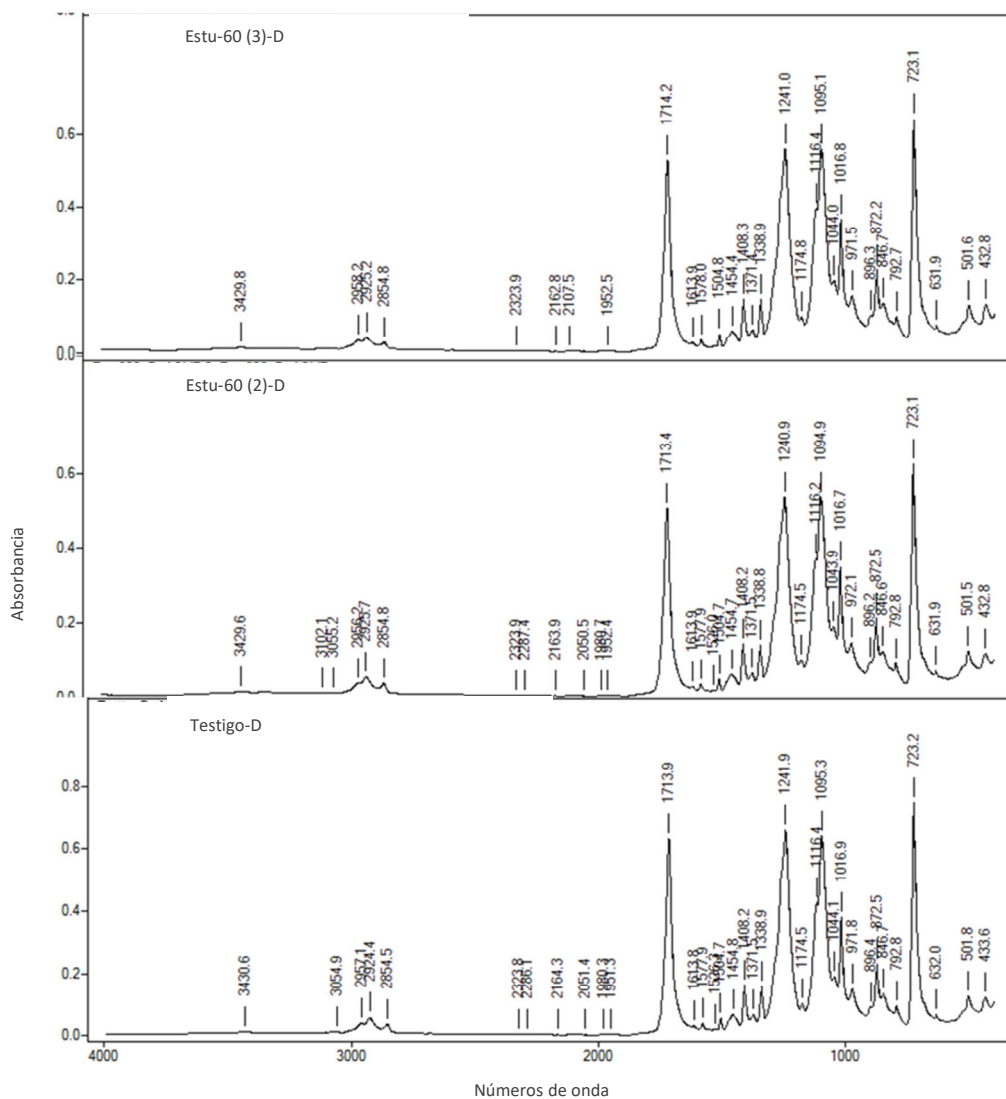


Figura 6.6. Influencia del tiempo de exposición, en estufa a 60°C, sobre la muestra D

Los espectros de las Figuras 6.7 a 6.10, muestran la influencia de la temperatura sobre las distintas muestras de PET.

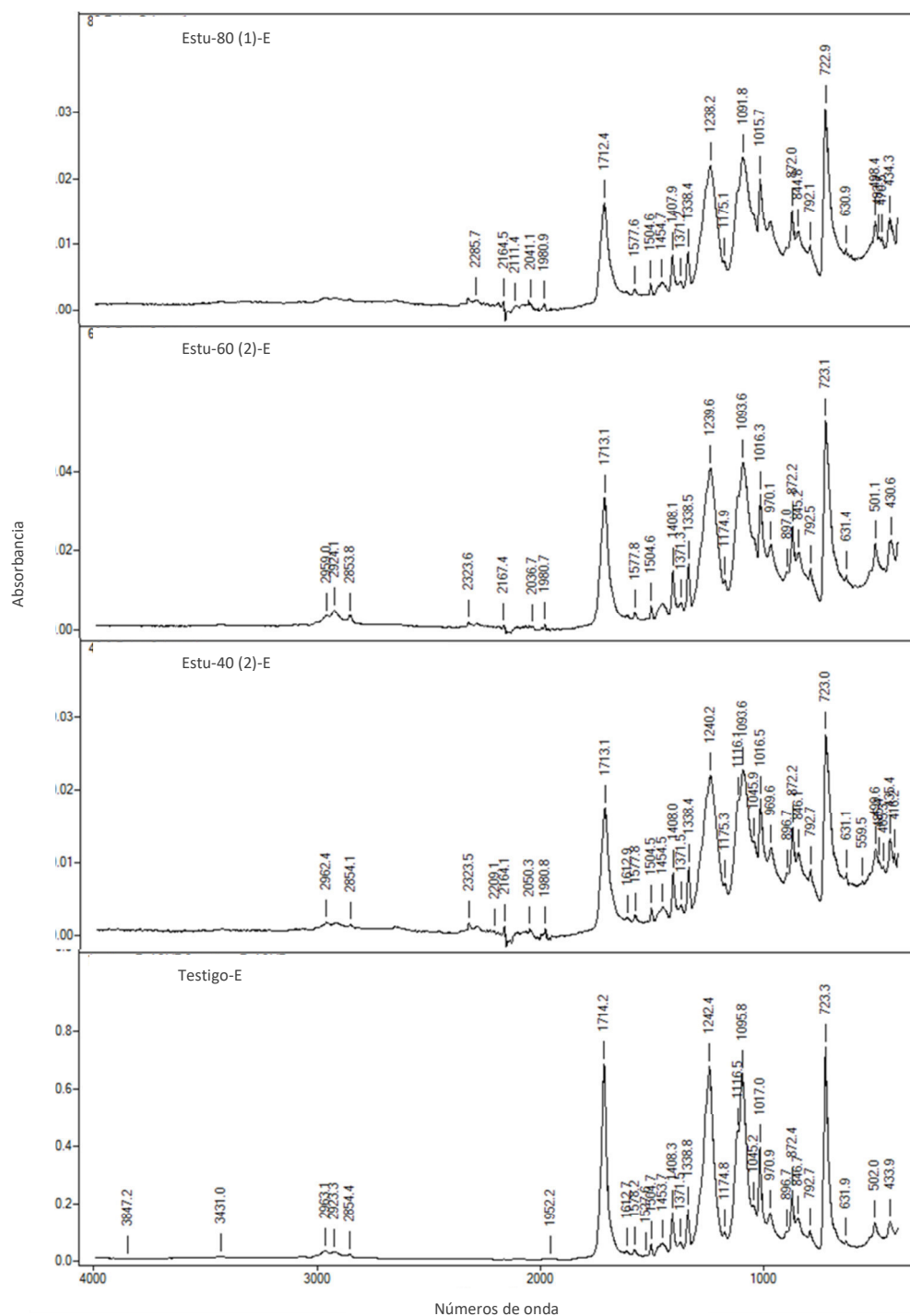


Figura 6.7. Influencia de la temperatura, sobre la muestra E, a 2 semanas de exposición

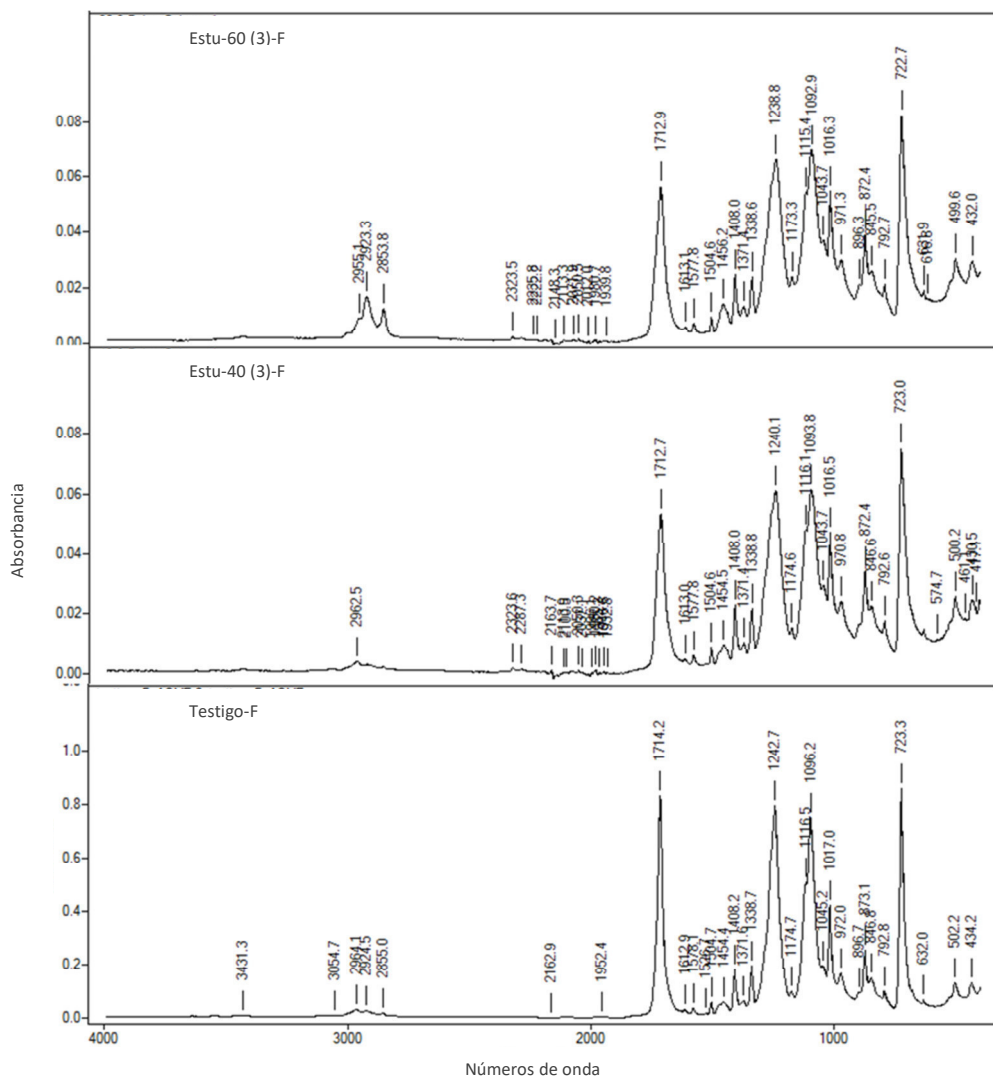


Figura 6.8. Influencia de la temperatura, sobre la muestra F, a 3 semanas de exposición

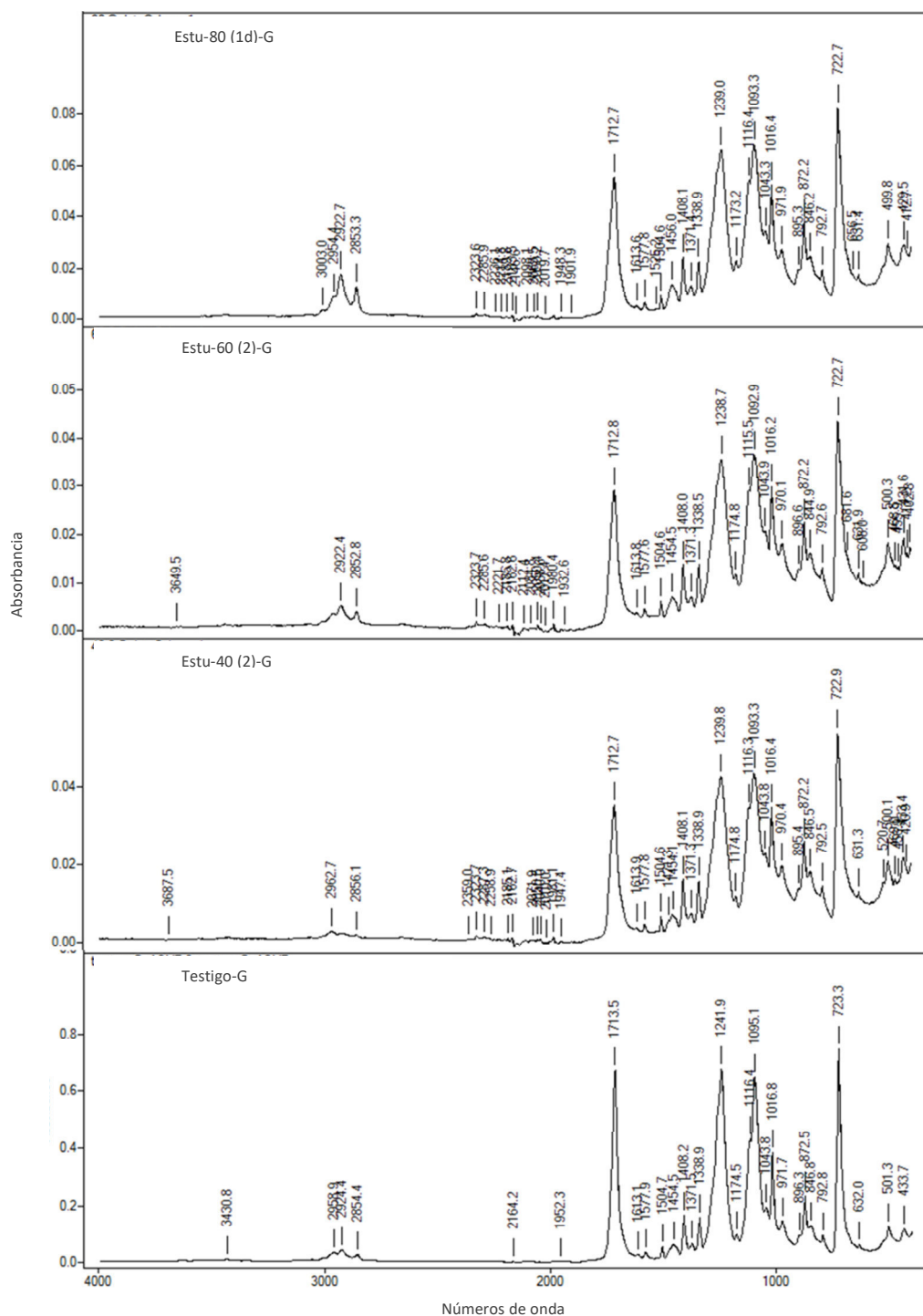


Figura 6.9. Influencia de la temperatura, sobre la muestra G, a 2 semanas de exposición

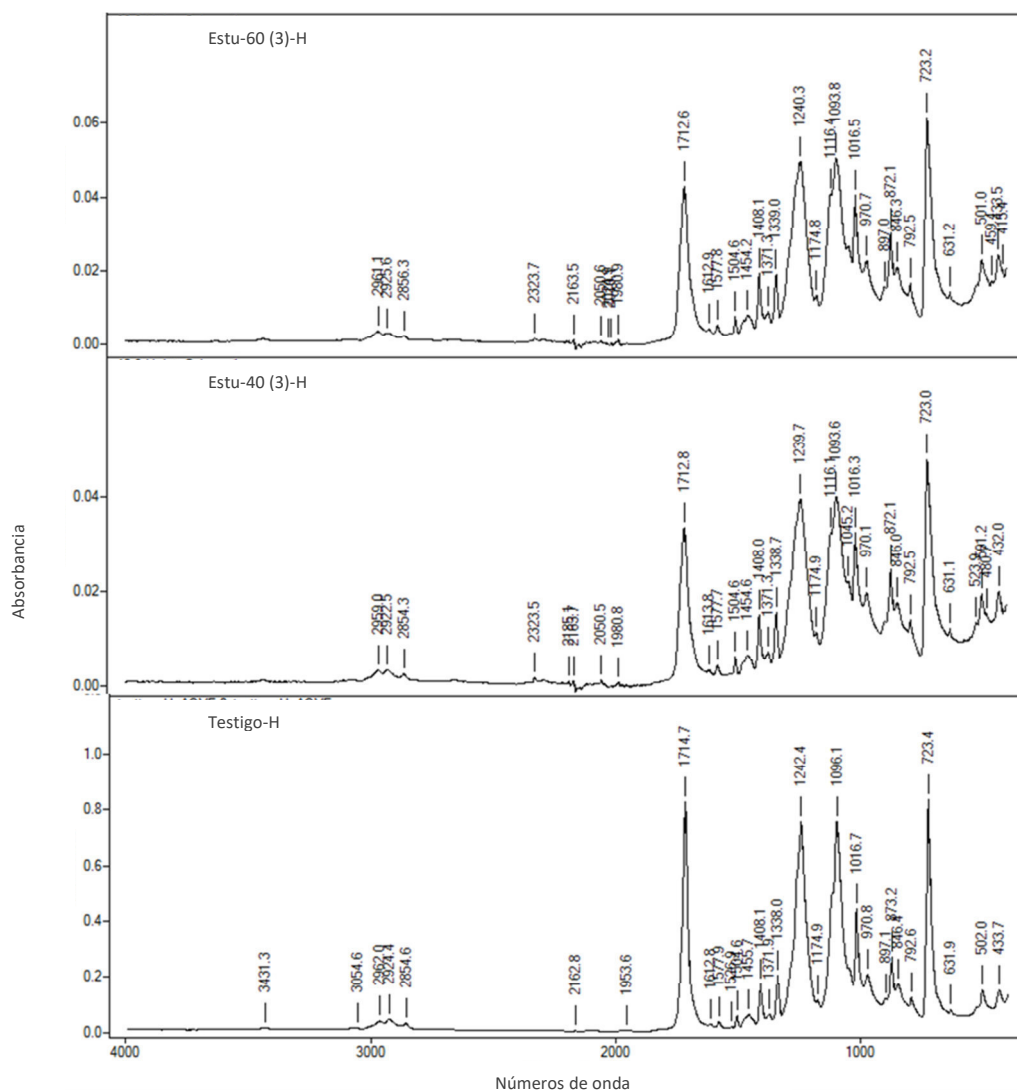


Figura 6.10. Influencia de la temperatura, sobre la muestra H, a 3 semanas de exposición

En todos los espectros, se aprecia que los picos relacionados con los productos de degradación, que se encuentran en torno a $1.700\text{-}1.785\text{ cm}^{-1}$, se modifican tanto con el tiempo como con la temperatura, lo que es indicativo del comienzo de la degradación.

El índice de carbonilo es el parámetro más usado para cuantificar el grado de degradación de un polímero. En el caso del PET, el carbonilo lo contiene el carboxilo y el acetaldehído que son productos de degradación de este polímero. Dicho índice se puede determinar mediante la expresión (6.1), indicada por Carlsson *et al.* (1976).

$$\text{Índice de carbonilo} = \frac{\text{Absorbancia } 1.715 \text{ cm}^{-1}}{\text{Absorbancia } 974 \text{ cm}^{-1}} \quad (6.1)$$

Se considera el pico a 974 cm^{-1} , puesto que se mantiene inalterado durante las degradaciones (Chelliah *et al.*, 2017).

En la Figura 6.11, se muestra la evolución del índice de carbonilo medio, para las muestras de PET sometidas a distintas temperaturas y tiempos de exposición.

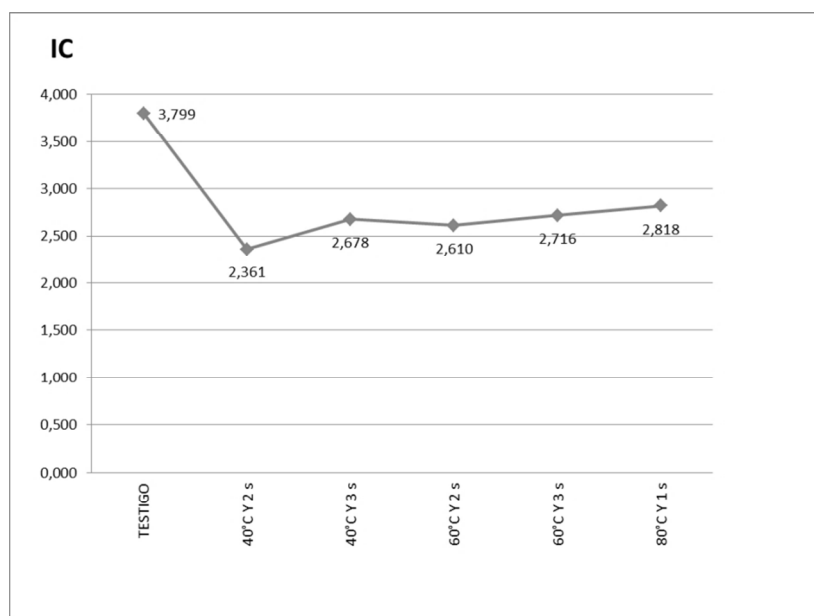


Figura 6.11. Evolución de los índices de carbonilo medios

En las Figuras 6.12 a 6.13, se muestran los valores medios del Índice de carbonilo según la variación de temperaturas, y según el tiempo de exposición de los PET en que se envasaron las muestras de aceites.

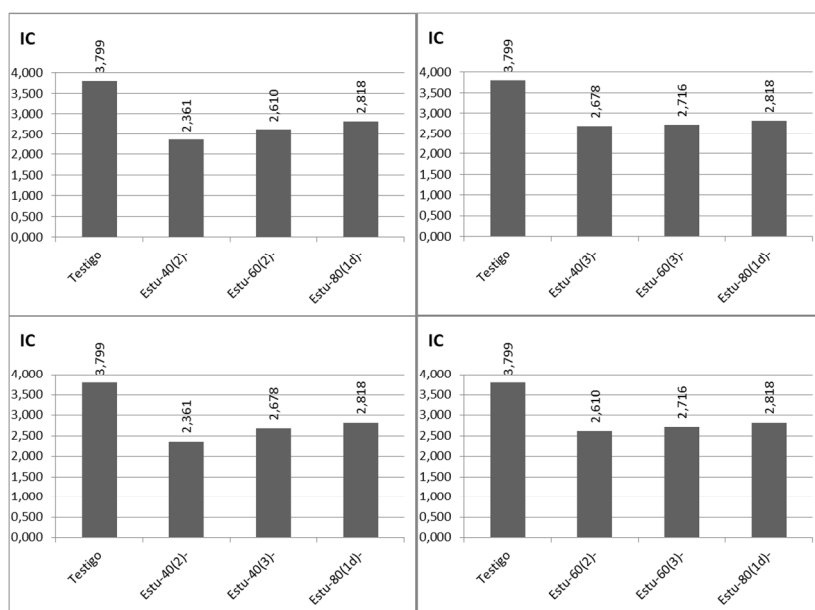


Figura 6.12. Índices de carbonilo medios según temperaturas

También, a modo de comparación, se puede observar en la Figura 6.13 la diferencia evidente entre los Índices de carbonilo medios, obtenidos tras someter el PET a las variaciones de temperatura y tiempo consideradas, y el obtenido en las muestras expuestas únicamente a un almacenamiento prolongado en el tiempo, que es mucho menor.

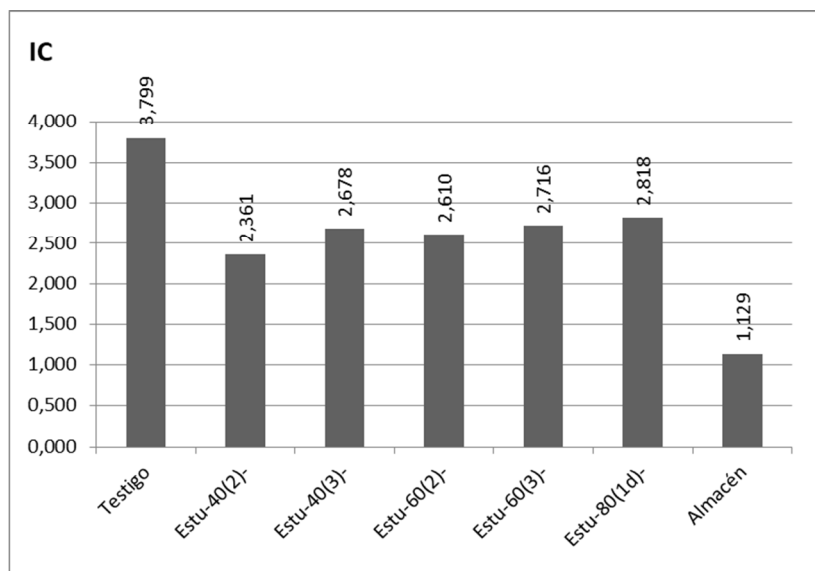


Figura 6.13. Índices de carbonilo medios (incluye almacenamiento)

La tendencia que se observa en los índices de carbonilo es similar a la que presentan otros autores. Este parámetro varía con el tiempo y temperatura a medida que aumenta la degradación del polímero. Esta variación es debida a la formación de productos secundarios, lo cual hace que el índice de carbonilo disminuya inicialmente y, pasado un tiempo, comience a aumentar al comenzar a aparecer productos de degradación (Pires *et al.*, 2015) y (Chelliah *et al.*, 2017).

Si se comparan los valores obtenidos en los tratamientos, se puede afirmar que las altas temperaturas afectan de forma más desfavorable a la degradación de los plásticos que el tiempo.

6.1.2. Fotodegradación

La fotodegradación de PET ocurre con la exposición a la luz ultravioleta cercana, lo que da lugar a la escisión de las cadenas por mecanismos del tipo Norrish I y II (Venkatachalam *et al.*, 2012). Esto conduce a una reticulación, que hace al polímero quebradizo, decolorado y con superficie áspera. Las películas también desarrollan superficies enloquecidas. El PET cuando se expone a la luz UV se degrada rápidamente, lo que lleva a un deterioro en las propiedades físicas y mecánicas, y a adoptar un color amarillo intenso.

Las Figuras 6.14 a 6.16 muestran los espectros de las muestras C, E y H tras la exposición ultravioleta.

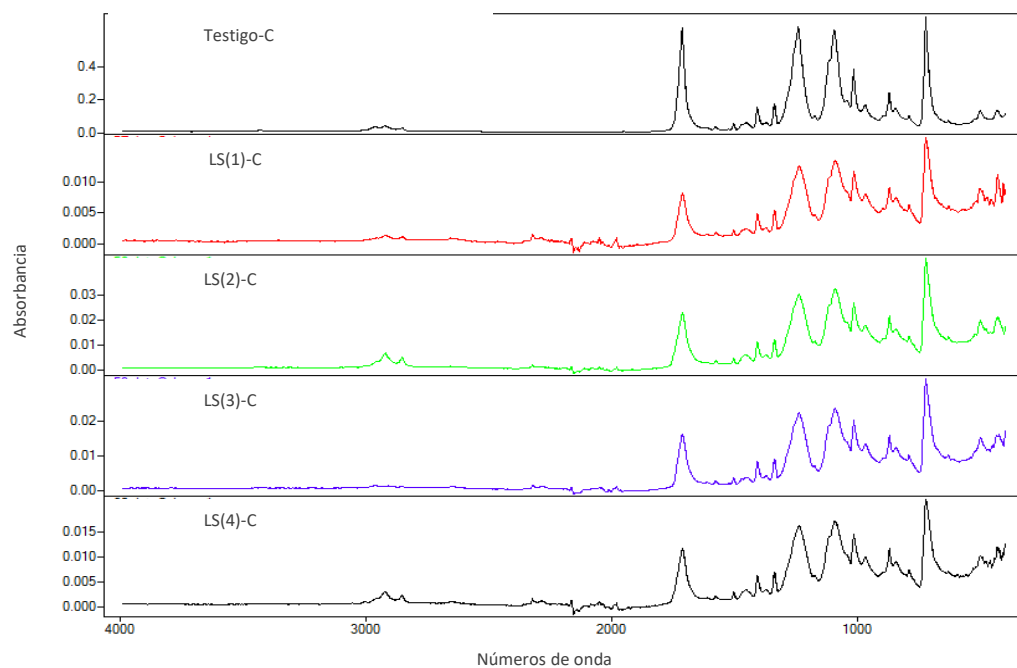


Figura 6.14. Evolución de la muestra Testigo-C de PET tras la exposición UV

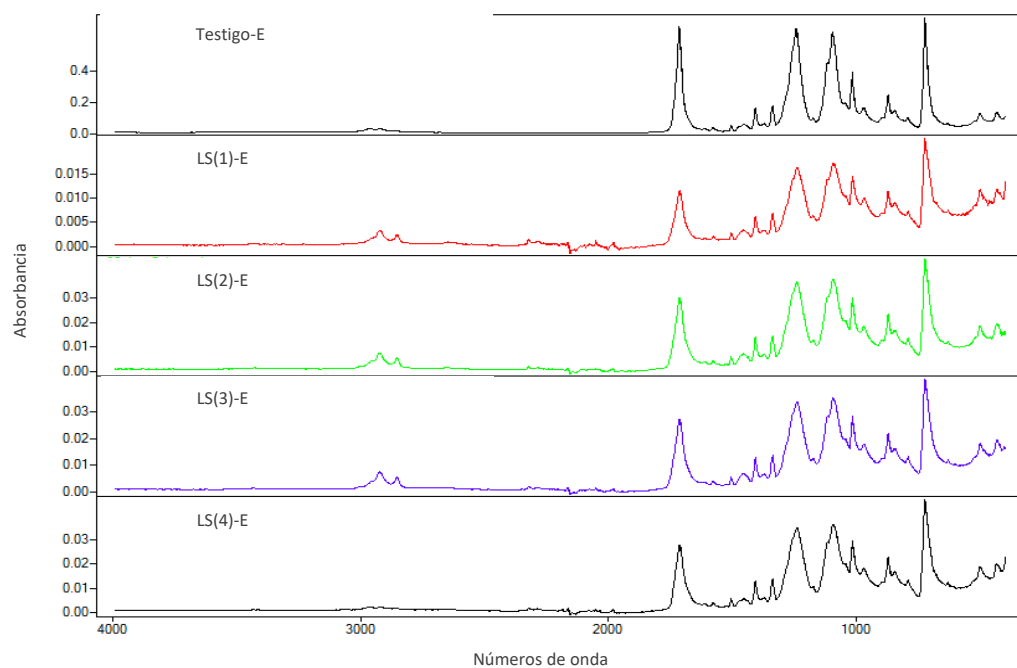


Figura 6.15. Evolución de la muestra Testigo-E de PET tras la exposición UV

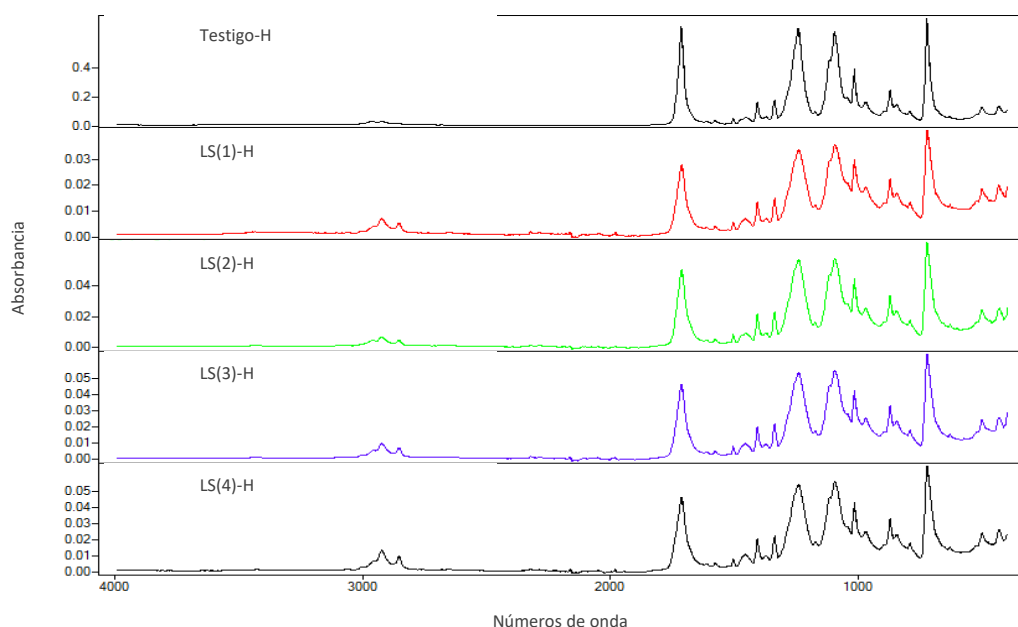


Figura 6.16. Evolución de la muestra Testigo-H de PET tras la exposición UV

Los análisis de infrarrojos han mostrado grandes cambios en la región hidroxílica y la ampliación de los picos de carbonilo. Estos se atribuyen a la formación de peréster o anhídrido. Tanto los grupos terminales hidroxilo como los carboxílicos, junto con el monóxido de carbono y el dióxido de carbono, son los principales productos de la fotodegradación (Fagerburg y Clauberg, 2003).

El índice de carbonilo, se ha empleado para cuantificar el grado de degradación del polímero, como se muestra en la Figura 6.17.

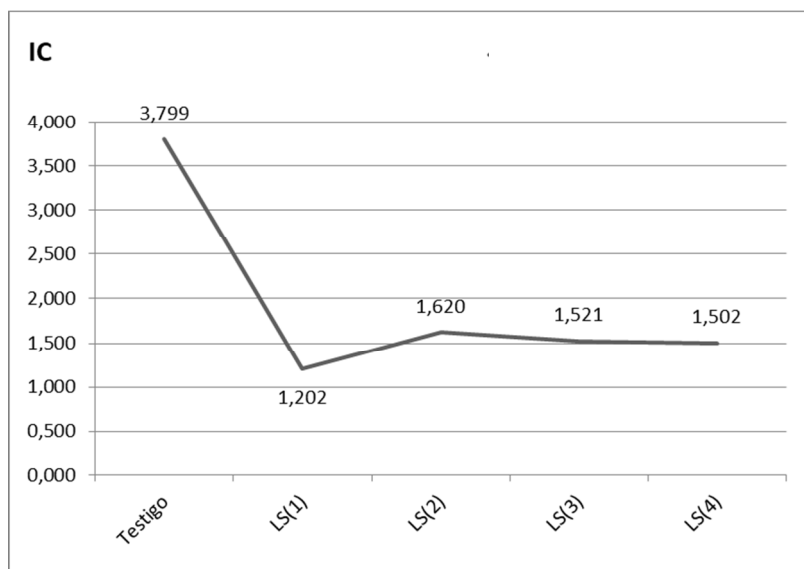


Figura 6.17. Evolución de Índices de carbonilo medios según diferente exposición solar

Se aprecia en la figura 6.17, que el índice de carbonilo disminuye inicialmente, luego aumenta y se mantiene estable.

Con el fin de distinguir la diferencia entre las distintas exposiciones hechas a las diferentes muestras tratadas, se ofrece el siguiente gráfico de Índices de carbonilo alcanzados (Figura 6.18). En éste se puede observar que los tratamientos de exposición a la luz solar y de almacenamiento prolongado, reflejan unos menores Índices de carbonilo que los correspondientes a tratamientos térmicos. Lo cual indica que el plástico se deteriora menos con estos tratamientos.

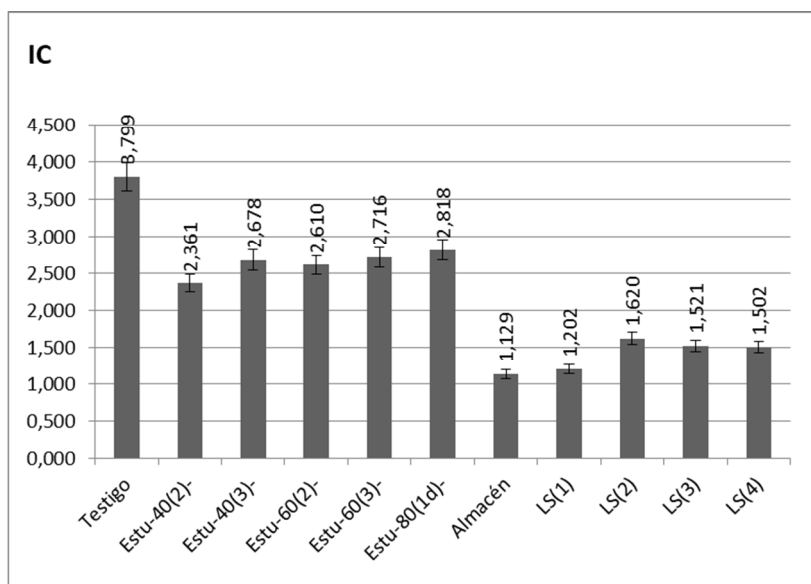


Figura 6.18. Índices de carbonilo medios (incluye almacenamiento y exposición solar)

6.2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD Y COMPONENTES MINORITARIOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA, EN CONDICIONES EXTREMAS DE ALMACENAMIENTO

En este trabajo, se persigue la simulación de condiciones de almacenamiento extremas del aceite de oliva virgen extra (AOVE). Así, se han estudiado tres aceites de oliva virgen extra monovarietales, *Arbequina* (E), *Picual* (dos marcas B y C) y *Hojiblanca* (H), lo que hace un total de cuatro aceites de oliva virgen extra.

Esta sección, describe los resultados obtenidos y analiza la influencia de esas condiciones experimentales, evaluando el deterioro que pueden presentar los parámetros de calidad y los componentes menores de esos aceites de oliva.

Los criterios de calidad y límites empleados, son los establecidos por el COI, y los resultados contribuyen al control de la trazabilidad, para la comercialización del AOVE.

6.2.1. Parámetros de calidad

En la Tabla 6.2 se recogen los valores de los parámetros de calidad de cada muestra de aceite de oliva virgen extra, al comienzo del ensayo (muestra de control o Testigo) y después de cada tratamiento (Estu-40(2); Estu-40(3); Estu-60(2); Estu-60(3)).

Los resultados obtenidos a 80°C no se han considerado porque las botellas se dañaron después del tratamiento de calentamiento.

Tabla 6.2. Parámetros de calidad

<i>Picual B</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Grado acidez	0,09 ± 0,001	0,14 ± 0,001	0,18 ± 0,002	0,13 ± 0,001	0,13 ± 0,001
Peróxidos	10,6 ± 0,9	7,2 ± 0,2	7,8 ± 0,3	5,6 ± 0,2	6,3 ± 0,1
k ₂₃₂	1,77 ± 0,05	1,66 ± 0,01	1,74 ± 0,01	1,84 ± 0,02	1,71 ± 0,01
k ₂₆₈	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,02
<i>Picual C</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Grado acidez	0,110 ± 0,001	0,140 ± 0,002	0,110 ± 0,001	0,110 ± 0,001	0,110 ± 0,002
Peróxidos	8,4 ± 0,2	8,6 ± 0,1	9,3 ± 0,3	6,6 ± 0,8	6,3 ± 0,7
k ₂₃₂	1,89 ± 0,04	1,79 ± 0,06	1,80 ± 0,02	1,88 ± 0,07	1,97 ± 0,06
k ₂₆₈	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01
<i>Arbequina E</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Grado acidez	0,060 ± 0,003	0,080 ± 0,001	0,090 ± 0,001	0,080 ± 0,002	0,090 ± 0,003
Peróxidos	9,4 ± 0,2	8,0 ± 0,2	8,5 ± 0,3	6,2 ± 0,2	5,46 ± 0,04
k ₂₃₂	0,93 ± 0,01	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,01	0,94 ± 0,01	2,15 ± 0,02
k ₂₆₈	0,060 ± 0,002	0,080 ± 0,003	0,090 ± 0,001	0,110 ± 0,002	0,180 ± 0,003
<i>Hojiblanca H</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Grado acidez	0,030 ± 0,002	0,100 ± 0,004	0,090 ± 0,003	0,080 ± 0,002	0,080 ± 0,002
Peróxidos	5,2 ± 0,2	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,2 ± 0,2	4,6 ± 0,02
k ₂₃₂	0,72 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,72 ± 0,03	1,84 ± 0,05
k ₂₆₈	0,050 ± 0,003	0,050 ± 0,002	0,060 ± 0,003	0,070 ± 0,002	0,150 ± 0,001

6.2.1.1. Grado de acidez (GA)

Las muestras iniciales consideradas como testigos de los AOVE de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, muestran valores del GA, inferior al límite establecido en las normativas Europea e Internacional, mientras que para las dos marcas de *Picual*, son ligeramente superiores 0,09 y 0,11 respectivamente.

En la Tabla 6.2 puede observarse, que en los aceites las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca* los tratamientos térmicos no produjeron cambios significativos en los valores iniciales del GA, habiendo oscilado entre 0,08 y 0,09, por lo que se pueden seguir considerando como vírgenes extra. Sin embargo, las muestras de la variedad *Picual*, sí pierden su denominación de “virgen extra”, pasando a “virgen”, al presentar un GA de 0,13 y 0,14 respectivamente, que son valores superiores al exigido legalmente.

Esta tendencia, en parte, también ha sido observada por otros autores, los cuales estudiaron la estabilidad del aceite de oliva cuando éste es tratado a diferentes tiempos de calentamiento por horno microondas y horno convencional (Albi *et al.*, 1997; Malheiro *et al.*, 2009; Cerretani *et al.*, 2009b); Adrover-Obrador *et al.*, 2012).

Del análisis de los resultados, se puede apreciar que los tratamientos a 40°C son los que mayores incrementos del índice de acidez producen, con aumentos del 86%. Mientras que los tratamientos a 60°C, durante dos y tres semanas, dan lugar a un incremento del 67% y 64% respectivamente. Se puede observar que es el aceite de la variedad *Arbequina*, el que menores incrementos medios de acidez muestra en los tratamientos, de hecho en dos de ellos no se modifica y en los demás, presenta un incremento de la acidez del 15%, frente al 54% del aceite *Picual B*, 37% del *Picual A* y 204% del *Hojiblanca*.

6.2.1.2. Índice de peróxidos

Según la legislación actual, estos aceites, antes de realizar los tratamientos objeto de estudio, se enmarcan dentro de la categoría de aceite de oliva virgen extra, los valores del índice de peróxidos (IP) fueron de 10,60 para *Picual B*, 8,44 para *Picual C*, 5,19 para *Hojiblanca* y 9,44 para *Arbequina*.

En el caso de la variedad *Hojiblanca*, no se observan cambios significativos a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de tratamiento, mientras que para las variedades *Picual* y *Arbequina*, el valor del IP, disminuye con el tiempo y temperatura, oscilando entre un 20-30%. Confirmándose con estos resultados que todos los aceites mantienen su valor correspondiente a un AOVE.

En la Figura 6.19 se puede observar cómo los tratamientos a la temperatura de 60°C son los que más afectan al IP, produciendo una disminución de este parámetro en todos los aceites analizados.

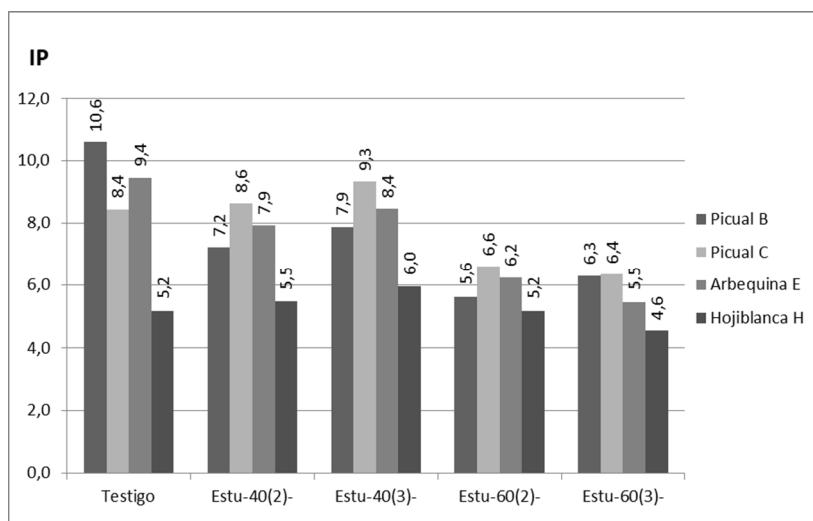


Figura 6.19. Influencia de los tratamientos de calentamiento en el valor de los índices de peróxidos de los aceites ensayados

Comparando los resultados con otros autores que emplean distintas fuentes de energía (Adrover *et al.*, 2012), en el caso de tratamiento por microondas no se observan cambios significativos con el tiempo de aplicación, mientras que para el calentamiento con horno convencional el valor de IP disminuye, y es en el caso de la fritura donde se observa una disminución más acusada (alrededor del 50%).

En la literatura se encuentran resultados contradictorios a cerca de la evolución del IP en aceites tratados térmicamente. Así, Albi *et al.* (1997), observaron un pequeño incremento en el valor de IP para aceite de oliva virgen extra después de un calentamiento con microondas a 170°C durante 120 min, mientras que disminuye el IP en un aceite de oliva virgen en las mismas condiciones. Por su parte, Cossignani *et al.* (1998), observaron un aumento del IP en aceite de oliva virgen extra después de un tratamiento con microondas durante 8 minutos.

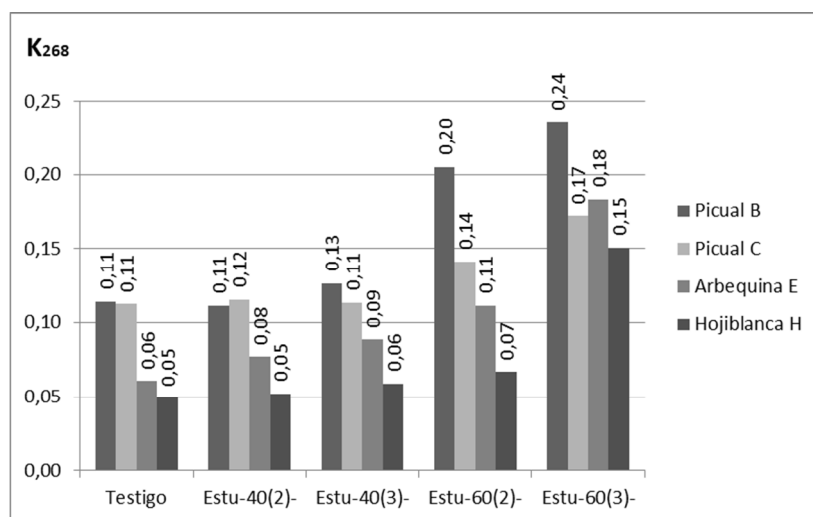
El comportamiento del IP podría explicarse por la evolución del proceso de oxidación, el aumento del IP se debe a la formación de hidroperóxido y la aparición de productos de oxidación secundaria reduce el IP.

6.2.1.3. Valores de los coeficientes de extinción K_{232} y K_{268}

El análisis espectrofotométrico ultravioleta expresado como coeficientes de extinción específicos, (COI/T.15/NC n° 3/Rev. 7, Mayo de 2013 y (UE) 2015/1.830 de La Comisión de 8 de julio de 2015), aportan información sobre el estado de oxidación del aceite de oliva, proporcionando asimismo información sobre la calidad de éste. El valor de K_{232} está correlacionado con la formación de dienos conjugados de ácidos grasos poliinsaturados (oxidación primaria), mientras que los valores de K_{268} son indicadores de la presencia de productos de oxidación secundaria, incluyendo trienos conjugados y productos de carbonilo.

Los valores máximos permitidos para K_{232} y K_{268} son, respectivamente, 2,50 y 0,22 para el aceite de oliva virgen extra y 2,60 y 0,25 para aceite de oliva virgen. Como puede observarse en la Tabla 6.2, en todos los aceites de las tres variedades, tanto inicialmente como para los distintos tratamientos de temperatura y tiempo ensayados, los coeficientes de extinción presentan valores inferiores a los límites previstos para la categoría virgen extra, 2,50 y 0,22 para K_{232} y K_{268} respectivamente, si bien solo una variedad *Picual*, presenta un valor (0,24) próximo al límite establecido para un AOVE (K_{268}), para la temperatura de 60°C y tres semanas.

En relación al efecto de los tratamientos, se aprecia que el mayor incremento del K_{232} se produce en el tratamiento a 60°C durante tres semanas excepto para el aceite *Picual* B que se produce a 60°C y dos semanas. En el caso del K_{268} , los tratamientos de 60°C son los que más afectan (Figura 6.20).

Figura 6.20. Variación de K_{268} con los tratamientos

El efecto del calentamiento sobre los parámetros de calidad del aceite de oliva también ha sido estudiado por varios autores. Con resultados similares, Malheiro *et al.* (2009) informó sobre aumentos del coeficiente K_{232} después del calentamiento por microondas. En este estudio, todos los aceites presentaron un K_{232} superior a 3,1 después de 15 minutos de calentamiento, indicando la existencia de un proceso de degradación acelerado y, por tanto, la pérdida de la categoría de virgen “extra”.

Este comportamiento se observa en todas las variedades de aceite de oliva virgen extra estudiadas. No se observaron cambios relevantes en dichos aceites después del tratamiento en el horno convencional. Sin embargo, se observa un aumento significativo del coeficiente de extinción K_{268} en todas las variedades después de cada tratamiento de calentamiento, tanto en el horno convencional como en el calentamiento por microondas. Este aumento, con el tiempo, se debe a la formación de compuestos de oxidación que explican la disminución de IP.

6.2.2. Análisis sensorial

La evaluación organoléptica de los cuatro aceites, se ha realizado según el Método Oficial de la UE, Reglamento (CEE) n° 2.568/91 modificado por el Reglamento (UE) n° 1.348/2013, los aceites se clasifican en las distintas categorías, en función de la mediana de los defectos y de la mediana del atributo frutado.

En la Figura 6.21, se muestra el valor de las medianas para los atributos y defectos considerados, para cada tratamiento en la estufa. Se puede comprobar que sensorialmente pierden todos su denominación de “virgen extra”, pasando a “virgen” e incluso a lampante para dos variedades, una la *Picual* y otra la *Arbequina* cuando la temperatura es de 60°C y el tiempo de permanencia en la estufa de tres semanas. La Figura 6.22 muestra los perfiles sensoriales correspondientes a cada aceite.

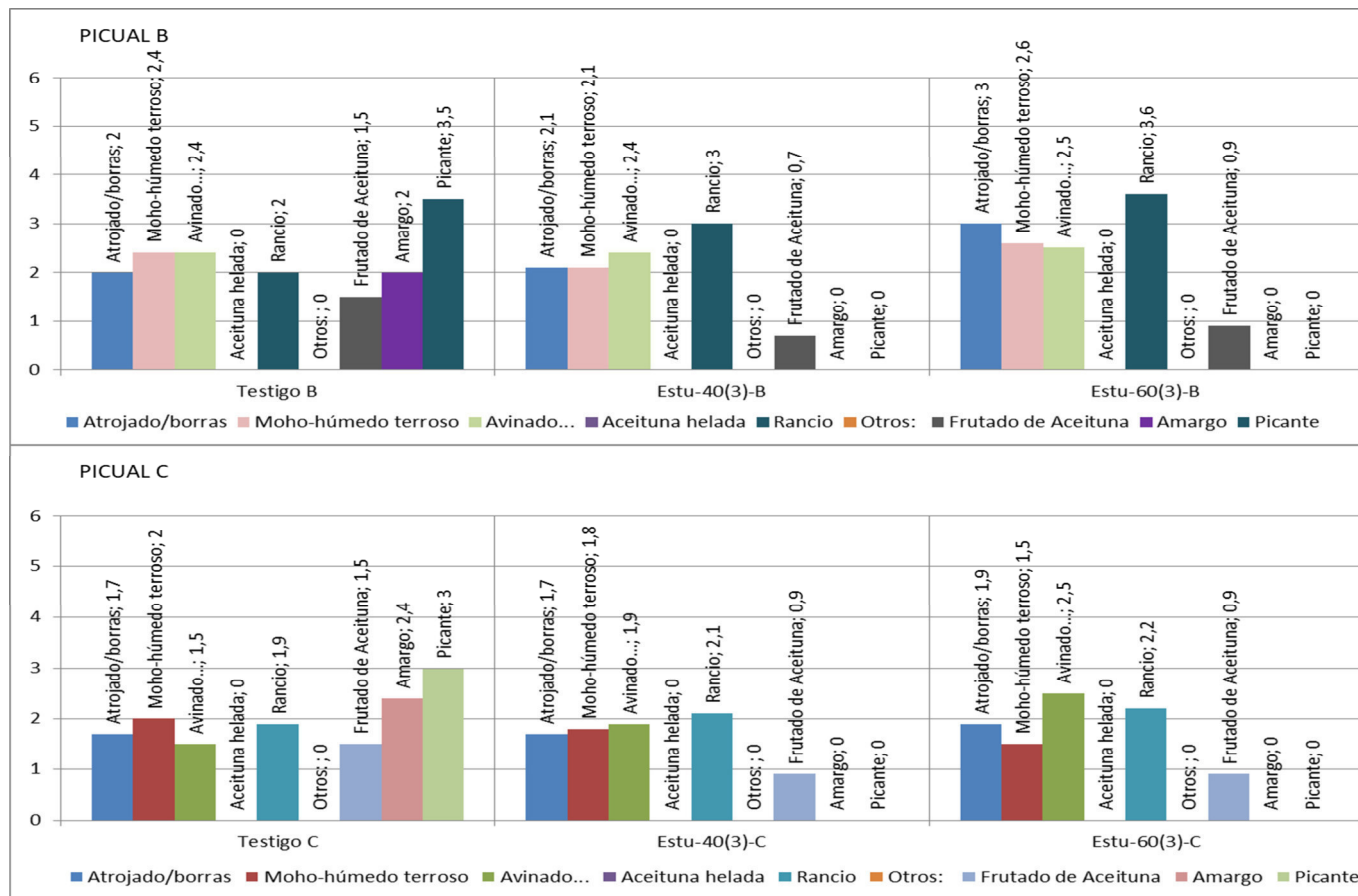


Figura 6.21. Influencia de los tratamientos de calentamiento en el análisis sensorial. Características y defectos positivos

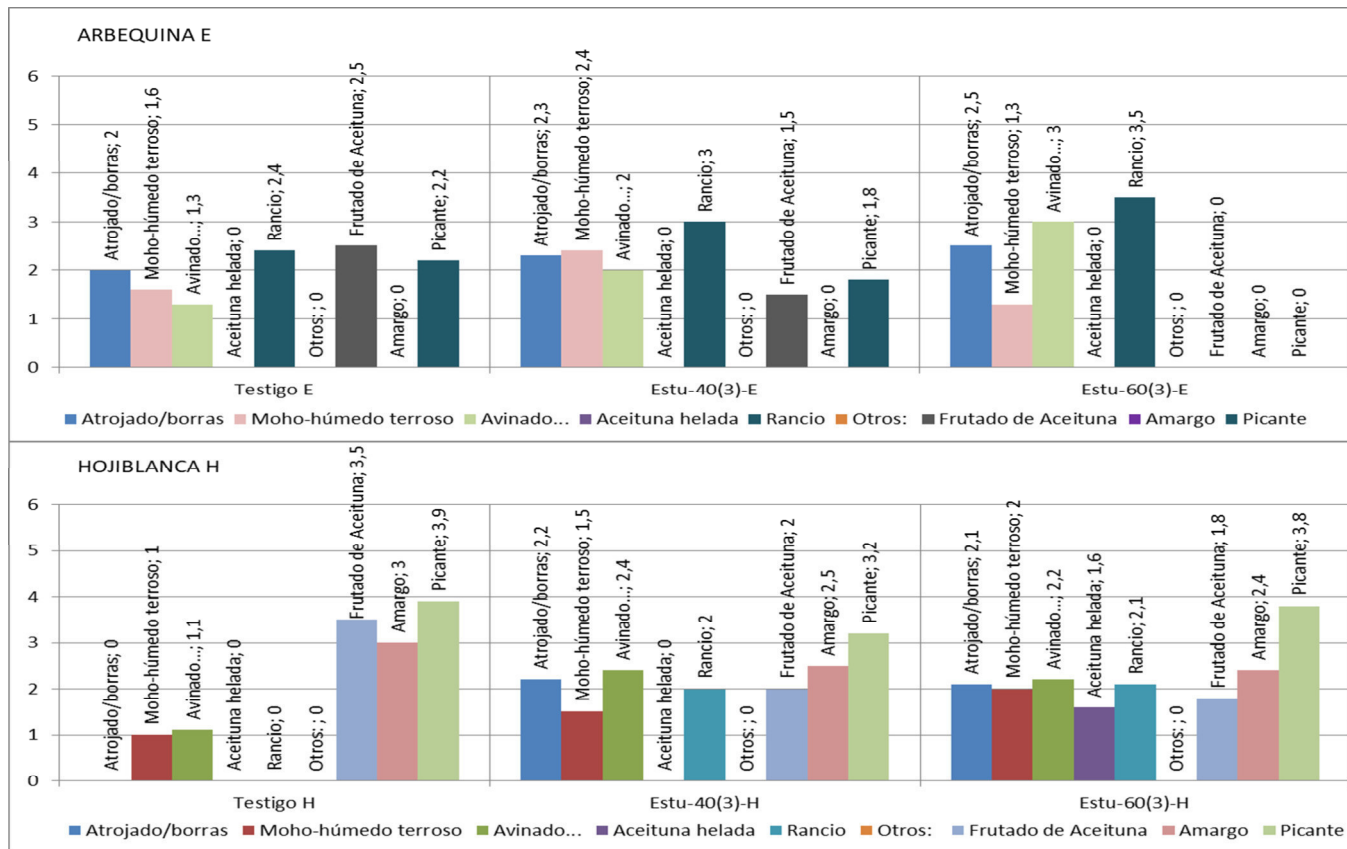


Figura 6.21. (Cont.)

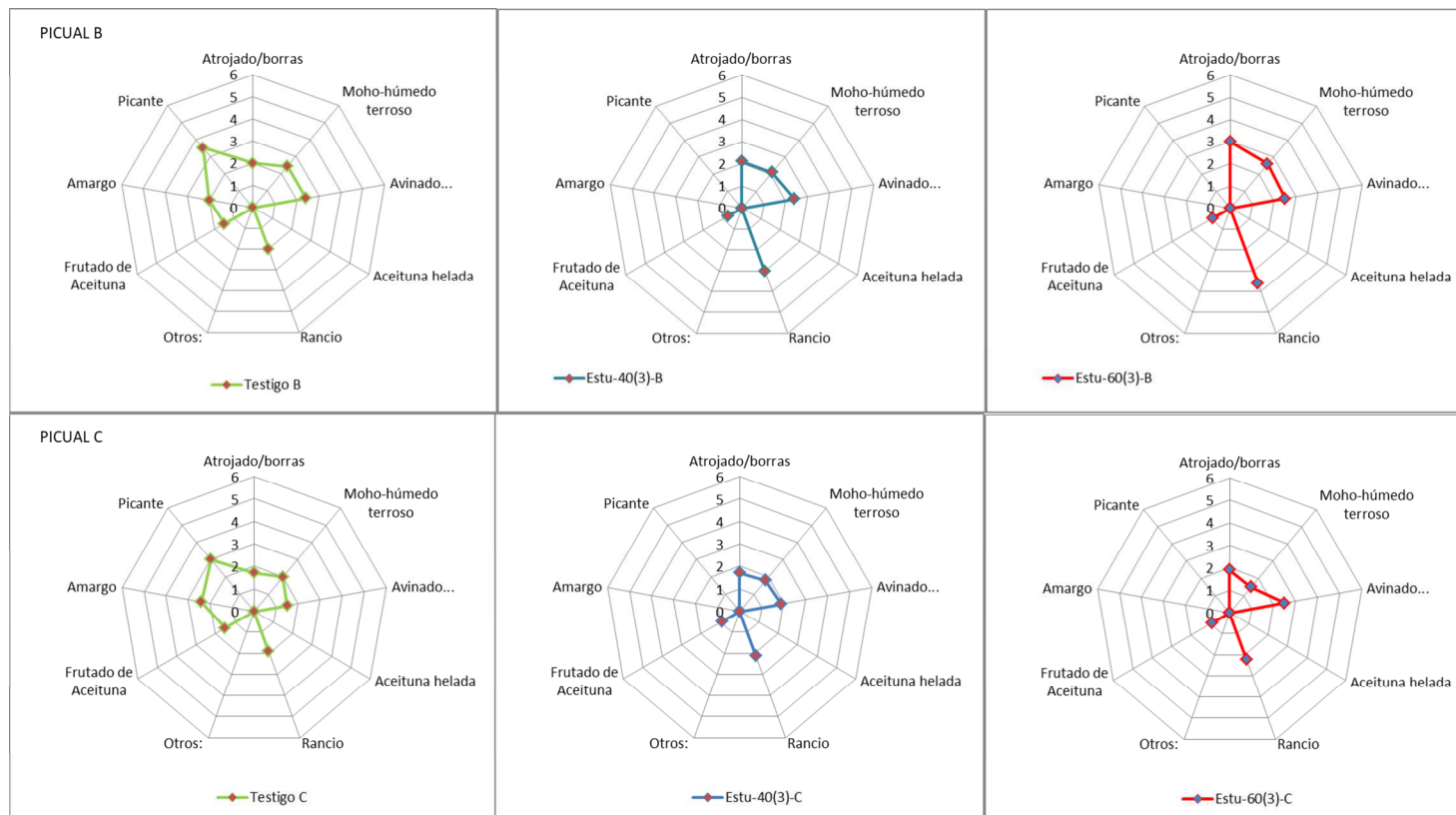


Figura 6.22. Perfil sensorial de los aceites ensayados sin tratamiento, después de 3 semanas a 40°C y de 3 semanas a 60°C

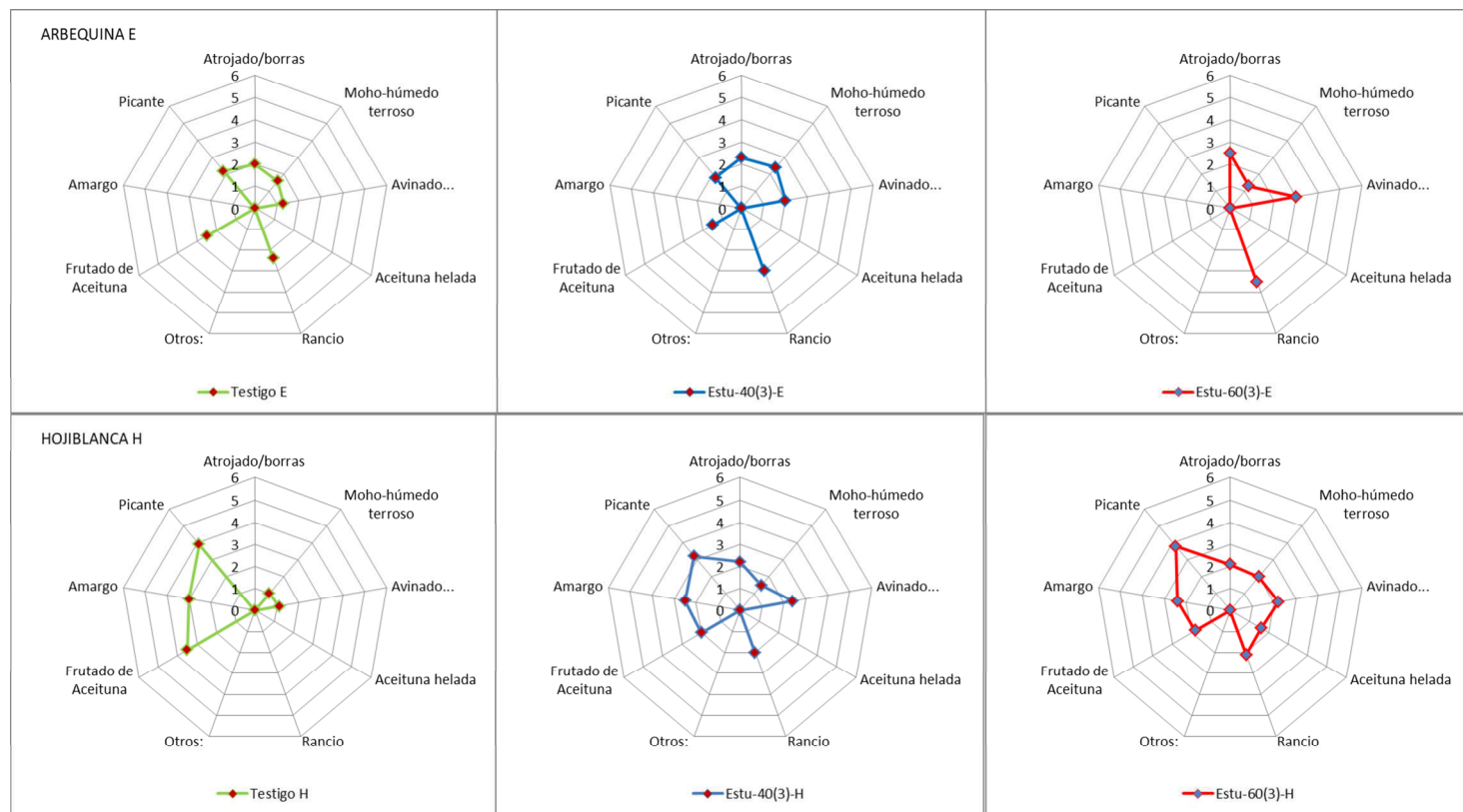


Figura 6.22. (Cont.)

6.2.3. Perfil de ácidos grasos

Los cambios en los porcentajes de los ácidos grasos, son consecuencia de las reacciones químicas (oxidación, hidrólisis), debidas a los tratamientos térmicos, pudiendo presentar algunos de ellos presiones de vapor suficientes, como para evaporarse.

Como se recoge en la Tabla 6.3 la composición de los ácidos grasos se conservó para todas las variedades de aceituna, manteniéndose en los límites e intervalos indicados en la legislación europea e internacional (COI/T.15/NC n° 3/Rev. 7, Mayo de 2013 y (UE) 2015/1.830 de la Comisión de 8 de julio de 2015) para la denominación del aceite de oliva virgen extra.

Solo el contenido de ácido araquídico (20:0) y ácido gadoleico (20:1) fue inicialmente un poco más alto que los límites de la UE (0,60 y 0,40 respectivamente). Los resultados de esta investigación son similares a los de otros estudios en los que los perfiles de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales después de los tratamientos de calentamiento por microondas y convencionales no se modificaron. La Tabla 6.3 por tanto, muestra los valores medios y la variabilidad expresada como desviación típica.

Tabla 6.3. Ácidos grasos

<i>Picual B</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
C16:0	10,52 ± 0,12	10,41 ± 0,04	10,38 ± 0,05	10,36 ± 0,35	10,43 ± 0,41
C16:1	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,81 ± 0,03	0,80 ± 0,01
C17:0	0,050 ± 0,007	0,050 ± 0,003	0,050 ± 0,004	0,050 ± 0,006	0,050 ± 0,006
C17:1	0,090 ± 0,001	0,090 ± 0,003	0,100 ± 0,001	0,100 ± 0,001	0,090 ± 0,001
C18:0	3,40 ± 0,03	3,30 ± 0,05	3,24 ± 0,02	3,23 ± 0,04	3,33 ± 0,02
C18:1	80,47 ± 0,45	80,01 ± 0,08	80,05 ± 0,09	80,20 ± 0,17	79,98 ± 0,08
C18:2	4,06 ± 0,03	4,08 ± 0,03	4,04 ± 0,01	4,04 ± 0,03	4,02 ± 0,01
C20:0	0,620 ± 0,023	0,640 ± 0,003	0,660 ± 0,002	0,650 ± 0,005	0,640 ± 0,001
C:20:1	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,04
C18:3	0,23 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,03
<i>Picual C</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
C16:0	10,92 ± 0,05	10,73 ± 0,09	10,41 ± 0,22	10,60 ± 0,16	6,01 ± 0,02
C16:1	0,90 ± 0,01	0,89 ± 0,07	0,91 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,47 ± 0,42
C17:0	0,060 ± 0,005	0,040 ± 0,003	0,040 ± 0,001	0,050 ± 0,001	0,040 ± 0,007
C17:1	0,090 ± 0,003	0,130 ± 0,039	0,090 ± 0,004	0,080 ± 0,001	0,090 ± 0,004
C18:0	3,11 ± 0,02	3,08 ± 0,04	2,90 ± 0,04	3,03 ± 0,06	3,33 ± 0,21
C18:1	80,14 ± 0,080	80,39 ± 0,082	80,89 ± 0,232	80,57 ± 0,230	85,09 ± 4,956
C18:2	3,44 ± 0,09	3,43 ± 0,02	3,47 ± 0,03	3,44 ± 0,06	3,60 ± 0,20
C20:0	0,660 ± 0,007	0,660 ± 0,003	0,670 ± 0,011	0,670 ± 0,003	0,70 ± 0,041
C:20:1	0,410 ± 0,001	0,400 ± 0,002	0,380 ± 0,004	0,410 ± 0,008	0,420 ± 0,028
C18:3	0,280 ± 0,018	0,260 ± 0,005	0,250 ± 0,001	0,270 ± 0,001	0,270 ± 0,015
<i>Arbequina E</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
C16:0	11,45 ± 0,02	11,06 ± 0,24	10,80 ± 0,51	11,31 ± 0,05	12,06 ± 0,07
C16:1	1,38 ± 0,07	1,44 ± 0,07	1,42 ± 0,02	1,43 ± 0,07	1,40 ± 0,01
C17:0	0,130 ± 0,010	0,120 ± 0,003	0,130 ± 0,001	0,120 ± 0,009	0,130 ± 0,001
C17:1	0,280 ± 0,009	0,260 ± 0,008	0,270 ± 0,001	0,270 ± 0,001	0,270 ± 0,002
C18:0	1,95 ± 0,04	2,03 ± 0,06	2,03 ± 0,01	2,06 ± 0,07	2,07 ± 0,04
C18:1	74,13 ± 0,02	74,43 ± 0,17	74,64 ± 0,34	74,18 ± 0,04	73,62 ± 0,06
C18:2	9,02 ± 0,07	9,10 ± 0,04	9,12 ± 0,10	9,00 ± 0,04	8,88 ± 0,07
C20:0	0,690 ± 0,014	0,650 ± 0,005	0,640 ± 0,002	0,670 ± 0,032	0,630 ± 0,002
C:20:1	0,410 ± 0,015	0,410 ± 0,002	0,430 ± 0,020	0,440 ± 0,018	0,420 ± 0,001
C18:3	0,350 ± 0,020	0,370 ± 0,020	0,370 ± 0,010	0,360 ± 0,016	0,360 ± 0,002

Tabla 6.3. (Cont.)

<i>Hojiblanca H</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
C16:0	9,93 ± 0,02	8,72 ± 0,01	10,12 ± 0,06	10,47 ± 0,08	10,44 ± 0,04
C16:1	0,820 ± 0,001	0,850 ± 0,008	0,850 ± 0,007	0,820 ± 0,006	0,820 ± 0,006
C17:0	0,100 ± 0,002	0,100 ± 0,001	0,100 ± 0,002	0,110 ± 0,002	0,450 ± 0,002
C17:1	0,570 ± 0,003	0,180 ± 0,003	0,170 ± 0,001	0,170 ± 0,001	0,240 ± 0,004
C18:0	3,18 ± 0,05	3,03 ± 0,01	3,08 ± 0,02	3,32 ± 0,01	3,31 ± 0,02
C18:1	77,25 ± 0,07	78,82 ± 0,06	77,63 ± 0,03	77,14 ± 0,07	76,82 ± 0,32
C18:2	6,58 ± 0,04	6,78 ± 0,01	6,56 ± 0,05	6,48 ± 0,02	6,45 ± 0,02
C20:0	0,760 ± 0,005	0,780 ± 0,003	0,760 ± 0,001	0,750 ± 0,003	0,730 ± 0,001
C:20:1	0,430 ± 0,003	0,420 ± 0,004	0,420 ± 0,001	0,440 ± 0,001	0,430 ± 0,006
C18:3	0,300 ± 0,003	0,310 ± 0,008	0,300 ± 0,007	0,300 ± 0,000	0,310 ± 0,008

6.2.4. Componentes minoritarios

Los componentes minoritarios analizados en los aceites de oliva virgen (Tabla 6.4) son pigmentos, polifenoles y tocoferoles. A diferencia de los resultados obtenidos por Malheiro *et al.* (2009) y Yahyaoui *et al.* (2014), el tratamiento de calentamiento a 40°C y 60°C durante dos y tres semanas, no influye en las concentraciones de clorofila y carotenoides (Figura 6.23 a y b). De hecho, se pueden considerar valores constantes para todos los aceites, excepto en una muestra *Picual* cuyo valor disminuyó en un 50% a medida que fue aumentando el tiempo y la temperatura.

Tabla 6.4. Componentes minoritarios

<i>Picual B</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Polifenoles	116,6 ± 18,1	146,5 ± 4,9	192,6 ± 9,0	176,4 ± 25,7	164,2 ± 2,7
Clorofilas	1,43 ± 0,06	1,32 ± 0,12	1,24 ± 0,17	1,27 ± 0,07	1,24 ± 0,01
Carotenoides	1,03 ± 0,04	0,95 ± 0,11	0,88 ± 0,09	0,91 ± 0,05	0,88 ± 0,02
Tocoferoles	169,7 ± 6,4	162,3 ± 4,5	167,5 ± 11,7	109,9 ± 5,5	90,1 ± 1,5
<i>Picual C</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Polifenoles	144,0 ± 0,4	177,7 ± 4,0	113,8 ± 15,6	130,9 ± 10,5	115,3 ± 2,4
Clorofilas	1,78 ± 0,02	1,82 ± 0,02	1,79 ± 0,04	1,63 ± 0,12	1,74 ± 0,02
Carotenoides	1,14 ± 0,01	1,13 ± 0,04	1,16 ± 0,07	1,00 ± 0,07	1,04 ± 0,01
Tocoferoles	148,9 ± 7,6	165,4 ± 6,2	158,5 ± 3,4	145,8 ± 0,1	135,3 ± 2,7

Tabla 6.4. (Cont.)

<i>Arbequina E</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Polifenoles	69,4 ± 0,5	60,6 ± 2,5	59,4 ± 0,263	50,8 ± 0,4	57,1 ± 12,2
Clorofilas	1,58 ± 0,02	1,53 ± 0,08	1,51 ± 0,01	1,59 ± 0,03	1,50 ± 0,03
Carotenoides	0,76 ± 0,04	0,77 ± 0,03	0,75 ± 0,04	0,78 ± 0,00	0,75 ± 0,02
Tocoferoles	151,5 ± 4,0	168,4 ± 4,1	158,9 ± 10,0	181,0 ± 7,1	160,6 ± 0,8
<i>Hojiblanca H</i>	Testigo	Estu-40(2)	Estu-40(3)	Estu-60(2)	Estu-60(3)
Polifenoles	176,0 ± 2,6	186,1 ± 6,2	185,5 ± 2,9	168,7 ± 0,5	164,1 ± 6,0
Clorofilas	1,02 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,03 ± 0,02	0,98 ± 0,02	1,01 ± 0,02
Carotenoides	0,83 ± 0,05	0,82 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,84 ± 0,02
Tocoferoles	116,1 ± 5,9	69,6 ± 2,0	59,6 ± 2,0	41,8 ± 1,1	35,8 ± 0,2

El contenido de polifenoles expresado como mg de ácido cafeico por kg de aceite, permanece relativamente sin cambios con los tratamientos de calentamiento en estufa. Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que los tratamientos de calentamiento por microondas disminuyen el contenido de componentes antioxidantes entre 55% y 85%.

Con respecto al contenido de tocoferoles, expresado como mg/kg de α -tocoferol, en la Figura 6.23 (d) se muestran diferentes tendencias. El contenido de tocoferol no ha cambiado para la muestra *Picual C*. Se observa un aumento de este contenido para los aceites de variedad *Arbequina E*, y los aceites de variedad *Picual C* y *Hojiblanca H* disminuyen este contenido entre 47% y 70%, respectivamente, a medida que aumenta el tiempo y la temperatura, con un valor máximo después de 3 semanas a 60°C.

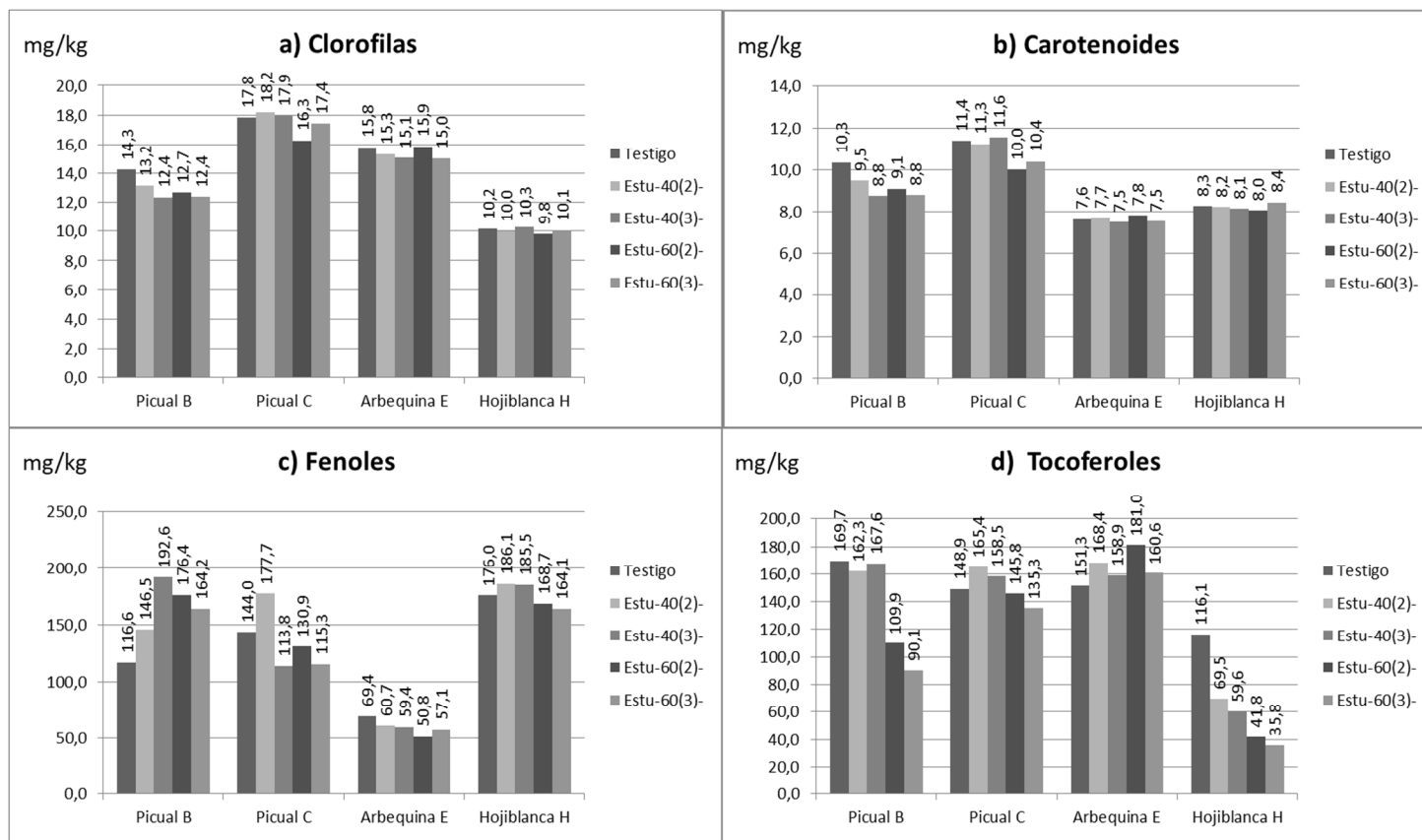


Figura 6.23. Influencia de los tratamientos de calentamiento en los compuestos minoritarios (mg/kg): (a) Clorofilas (b) Carotenoides (c) Fenoles (d) Tocoferoles

6.2.5. Análisis estadístico. Influencia del tiempo y la temperatura

El análisis estadístico multifactorial, ANOVA, se realiza con el objetivo de comprobar la influencia de las tres variables estudiadas (variedad, tiempo y temperatura) sobre los parámetros de calidad, recogiendo los resultados en la Tabla 6.5. Los valores de P (valor de probabilidad)¹ muestran que la variable más significativa es la variedad con $P < 0,05$ para todos los parámetros. La temperatura muestra $P < 0,05$ en el 50% de los parámetros y el tiempo es el factor que tiene menos importancia.

Los parámetros que experimentan una alta variabilidad son K_{232} , K_{268} , peróxidos y tocoferoles, seguidos del grado de acidez, polifenoles y carotenoides; siendo la variedad de aceituna, el factor con mayor influencia en la variabilidad.

Tabla 6.5. Análisis de varianza (ANOVA)

Parámetros	GA	IP	K_{232}	K_{268}	Polifenoles	Clorofilas	Carotenoides	Tocoferoles
	P	P	P	P	P	P	P	P
Efectos principales								
Variedad (Var)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Temperatura (T)	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0422	0,0696	0,0252	0,0000
Tiempo (t)	0,2936	0,0135	0,0000	0,0000	0,3150	0,5975	0,6030	0,0000
Interacciones								
Var-T	0,0011	0,0001	0,0027	0,0000	0,4174	0,0542	0,0025	0,0000
Var-t	0,0000	0,1596	0,0001	0,0000	0,0078	0,1279	0,0909	0,4787
T-t	0,0956	0,0071	0,0000	0,0000	0,8857	0,3909	0,4272	0,0272

¹ P. Por convenio suele establecerse que si este valor de probabilidad es menor del 5% (0,05) es lo suficientemente improbable que se deba al azar y así afirmar que la diferencia es real. Si es mayor del 5%, no tendremos la confianza necesaria como para poder negar que la diferencia observada sea obra del azar (Molina, 2017).

6.3. CONTAMINANTES Y METALES TRAZA

6.3.1. Calibración y parámetros analíticos

En este apartado se estudian los parámetros analíticos del método, es decir, rango dinámico lineal, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

6.3.1.1 Rango dinámico lineal (RDL).

El RDL del método analítico se conoce como el intervalo de concentración del analítico en el que la señal registrada es proporcional a la concentración. El límite superior se establece cuando la señal queda constante al aumentar la concentración, y el inferior cuando la concentración queda establecida por una señal de dos o tres veces el ruido de fondo del detector.

La determinación del RDL se ha hecho utilizando disoluciones estándar de concentraciones definidas en el intervalo 0,1-140 $\mu\text{g/kg}$, preparado a partir de una disolución acuosa estándar con 10 mg/kg de los seis metales estudiados. El RDL del método para cada a partir de curvas de calibración.

Tabla 6.6. Rango dinámico lineal del método

Metales	RDL ($\mu\text{g/kg}$)
As	0,5-100
Cd	
Sb	
Pb	5-500

6.3.1.2. Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método

El límite de detección de un método analítico se define como la menor concentración o cantidad detectada con una seguridad razonable en una disolución problema (Blanch, 1998). Ese límite de detección está basado en un tratamiento

estadístico del análisis del blanco, y está aprobado por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en 1975 (Lai, 1995). Se expresa como C_L correspondiente a una señal analítica X_L según la ecuación referida a continuación, donde X_B es el valor medio de la respuesta del blanco, σ_B es la desviación estándar de la señal del blanco, y K es el factor numérico según el nivel de confianza pretendido.

$$X_L = X_B + K * \sigma_B \quad (6.2)$$

La concentración C_L se relaciona con el valor de X_L mediante la ecuación siguiente, donde m es la sensibilidad analítica (pendiente de la recta de calibrado).

$$C_L = \frac{X_L - X_B}{m} \quad (6.3)$$

De las dos ecuaciones anteriores se obtiene:

$$C_L = \frac{K * \sigma_B}{m} \quad (6.4)$$

El C_L será un fiel reflejo del límite de detección cuando m se encuentre bien definida y el valor de la ordenada en el origen de la curva de calibrado sea esencialmente cero.

El uso de $K = 3$ en la anterior ecuación permite un nivel de confianza de 99,86%, asegurándose así que una señal analítica $X_L \geq X_B + 3\sigma_B$ se deba a la presencia de un analítico en una disolución problema, y no a fluctuaciones del blanco.

También se debe indicar el límite de cuantificación, que es la concentración de analito correspondiente a una señal analítica X_Q expresada en la ecuación siguiente, para la que se recomienda un valor de $K = 10$:

$$X_Q = X_B + K * \sigma_B \quad (6.5)$$

Por otro lado, la concentración C_Q correspondiente al límite de cuantificación se resolverá mediante la ecuación siguiente:

$$C_Q = \frac{(K \cdot \sigma_B)}{m} \quad (6.6)$$

Entonces, aplicando la Ecuación 4 con los valores recomendados para K de 3 y 10, se pueden calcular los límites de detección y cuantificación. Según el método desarrollado en este trabajo estos límites se han determinado con un ensayo en blanco. Así, la Tabla 6.7 muestra esos límites de detección y cuantificación para cada uno de los seis metales estudiados.

Tabla 6.7. Límites de detección y cuantificación

Metales	LD ($\mu\text{g/kg}$)	LQ ($\mu\text{g/kg}$)
As	0,02	0,27
Cd	0,05	0,15
Pb	0,81	2,69
Sb	0,08	0,32

6.3.1.3. Precisión del método

La precisión del método se ha calculado estudiando la desviación estándar relativa (DER) de la señal analítica. Es un procedimiento que consiste en analizar 10 muestras idénticas de concentración correspondiente al punto central de la curva de calibración (Marigheto, 1998). Esa DER se representa con un porcentaje según la Ecuación 6.7, donde σ_{n-1} es el valor de la desviación estándar, y $\bar{X}$ el valor medio de las 10 muestras.

$$DER = \frac{\sigma_{n-1}}{\bar{X}} * 100 \quad (6.7)$$

De este modo, la precisión del método se evaluó con diez muestras de aceite que contenían 10 y 100 $\mu\text{g/kg}$. En la Tabla 6.8 se expresan los resultados obtenidos para los metales analizados, con valores que fluctúan entre 2,62% y 5,11%, lo que justifica la precisión del método analítico.

Tabla 6.8. Precisión del método para la determinación de metales mediante ICP-MS

Metales	<i>DER</i> (%)	
	10 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$
As	3,08	2,69
Cd	2,68	2,62
Pb	5,11	3,33
Sb	5,02	3,24

6.3.1.4. Exactitud del método

La exactitud del método ha sido verificada mediante un estudio de recuperación para comprobar la robustez del método, añadiendo concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/L}$, y realizando tres réplicas para cada uno. Los porcentajes de recuperación se muestran en la Tabla 6.9. Como puede apreciarse, el método es exacto, dado que los porcentajes de recuperación presentan valores entre 97 y 104.

Tabla 6.9. Estudio de recuperación del método

Metales	Concentración añadida	
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$
As	101 $\pm$ 1	102 $\pm$ 2
Cd	98 $\pm$ 2	100 $\pm$ 1
Pb	97 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3
Sb	101 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1

6.3.2. Análisis de antimonio

El análisis del antimonio en las muestras de los AOVE elegidos han ofrecido variaciones de las concentraciones de antimonio debidas al fenómenos de migración. Los resultados han cambiado según las muestras hayan estado sometidas a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo, o expuestas a la luz solar en distintos periodos de tiempo, o a un almacenamiento prolongado en el tiempo. A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos para el caso de las muestras de aceite según el tratamiento al que han sido sometidas. En todos los casos, se ha tomado como referencia de Límite Máximo de Residuos (LMR) el contemplado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y que es de $20 \mu\text{g/L}$. También, se comparan los resultados obtenidos en las muestras de aceite con otros alimentos estudiados en la bibliografía.

6.3.2.1. Efecto del almacenamiento prolongado

En primer lugar se van a analizar los resultados obtenidos tras un almacenamiento prolongado de 18 meses.

En la Figura 6.24 de la página siguiente, se muestra la evolución de la migración de Sb, según aceites muestreados, para las exposiciones a almacenamiento prolongado. Se aprecia que mientras la concentración de Sb en los testigos está dentro del rango $1,67 \mu\text{g/L}$ - $16,19 \mu\text{g/L}$, en el caso de las muestras de almacén las concentraciones están dentro del intervalo $3,12 \mu\text{g/L}$ - $26,55 \mu\text{g/L}$, llegando a superarse el LMR establecido por la OMS.

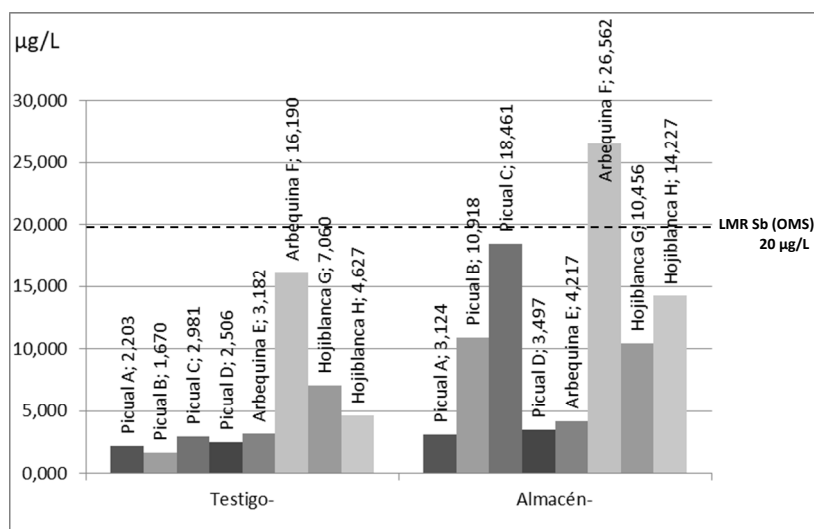


Figura 6.24. Migración del antimonio durante un periodo de almacenamiento prolongado

Para cada caso, concretamente se ha calculado el incremento en porcentaje de la concentración de Sb con respecto al Testigo, que se puede consultar en la Tabla 6.10, apreciándose que en el caso de las muestras *Picual B* y *C* y la *Hojiblanca H* el aumento ha sido notorio.

Tabla 6.10. Incremento de migración de Sb por aceites entre Testigo y Almacén

VARIEDAD	% de incremento	
	Referencia	Almacén
<i>Picual A</i>	Testigo	41,81
<i>Picual B</i>	Testigo	553,77
<i>Picual C</i>	Testigo	519,29
<i>Picual D</i>	Testigo	39,55
<i>Arbequina E</i>	Testigo	32,53
<i>Arbequina F</i>	Testigo	64,06
<i>Hojiblanca G</i>	Testigo	48,10
<i>Hojiblanca H</i>	Testigo	207,48

En la Figura 6.25, también se exponen resultados relacionados con el almacenamiento de los aceites, en este caso se muestran las tendencias de migración media agrupadas por variedades.

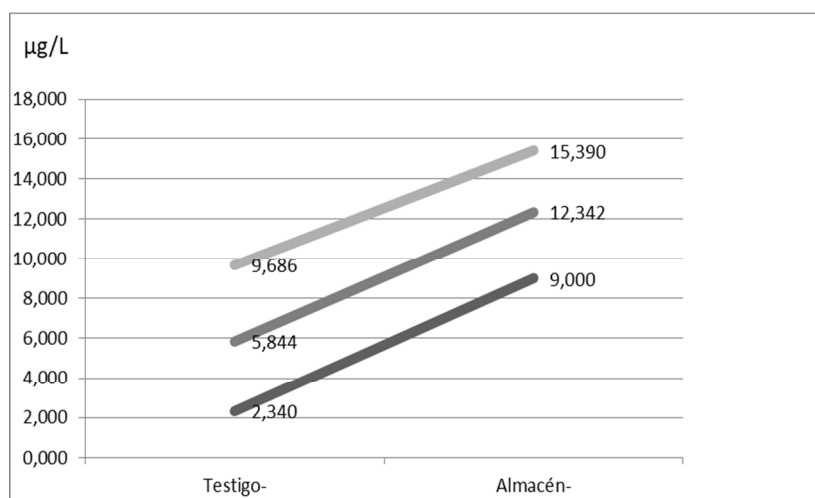


Figura 6.25. Migración media de Sb por variedades durante un periodo de almacenamiento prolongado

Como se ve, la tendencia media de todas las variedades es similar, siendo la *Arbequina* la más próxima al LMR de $20 \mu\text{g/L}$, establecida por la OMS para el Sb en agua embotellada, que se toma como referencia al no existir un límite para el aceite.

Así mismo, para comparar los incrementos de migración entre variedades, se presenta la Tabla 6.11.

Tabla 6.11. Incremento de migración de Sb por variedades entre Testigo y Almacén

VARIEDAD	% de incremento entre muestras De Testigo a Almacén
<i>Picual</i>	284,62
<i>Arbequina</i>	58,88
<i>Hojiblanca</i>	111,20

En dicha tabla se aprecia que los mayores incrementos se producen en los aceites de la variedad *Picual*, seguidos por los de la variedad *Hojiblanca* y por último, los de la variedad *Arbequina*.

En la bibliografía existen pocos trabajos en los que se aborde la determinación de Sb en aceites, concretamente en la investigación desarrollada por Juranovic *et al.*, (2007) se determinaron concentraciones de Sb entre $0,23 \mu\text{g/L}$ – $0,41 \mu\text{g/L}$, muy por debajo de los determinados en esta investigación en los testigos. Investigaciones más recientes desarrolladas por Llorent-Martínez *et al.*, (2011a y b) en la que se analizaron

diversos aceites vegetales incluido el aceite de oliva y no se detectaron concentraciones de Sb en ellos.

6.3.2.2. Efecto de los tratamientos Temperatura-tiempo sobre la migración del Sb

Se van a comentar los resultados obtenidos en las muestras sometidas a tratamientos de temperaturas de 40 y 60°C durante 2 y 3 semanas.

En la Figura 6.26 se muestra la evolución de la migración de Sb, según variedades muestreadas (4 muestras de *Picual*, y 2 muestras de *Arbequina* y *Hojiblanca* respectivamente), desde el Testigo, pasando por los distintos tratamientos térmicos de 40 y 60°C; y 2 y 3 semanas de exposición. Como se puede comprobar, la curva de evolución de antimonio presente en las distintas muestras, conforme se van sometiendo a temperaturas más altas y mayores tiempos de exposición, es ascendente.

A continuación, la Figura 6.27 muestra la evolución del antimonio según variedades tras los tratamientos térmicos. Y, si se compara entre las variedades existentes en las muestras (A, B, C y D de *Picual*; E y F de *Arbequina*; y G y H de *Hojiblanca*), también se puede observar cómo las variedades *Picual* y *Hojiblanca* presentan una línea suave y similar de evolución, y cómo la variedad *Arbequina*, además de soportar mayores niveles de migración de antimonio, traza un incremento más brusco. Estos niveles de Sb de la *Arbequina* llegan a superar algunos las 20 µg/L, que es el límite máximo de residuos (LMR en adelante) permitido por la OMS para el Sb en agua embotellada, límite que se toma como referencia a lo largo de este apartado al no existir uno específico para aceites de oliva.

Por último, en la Figura 6.28 se expresa la evolución del Sb según variedades.

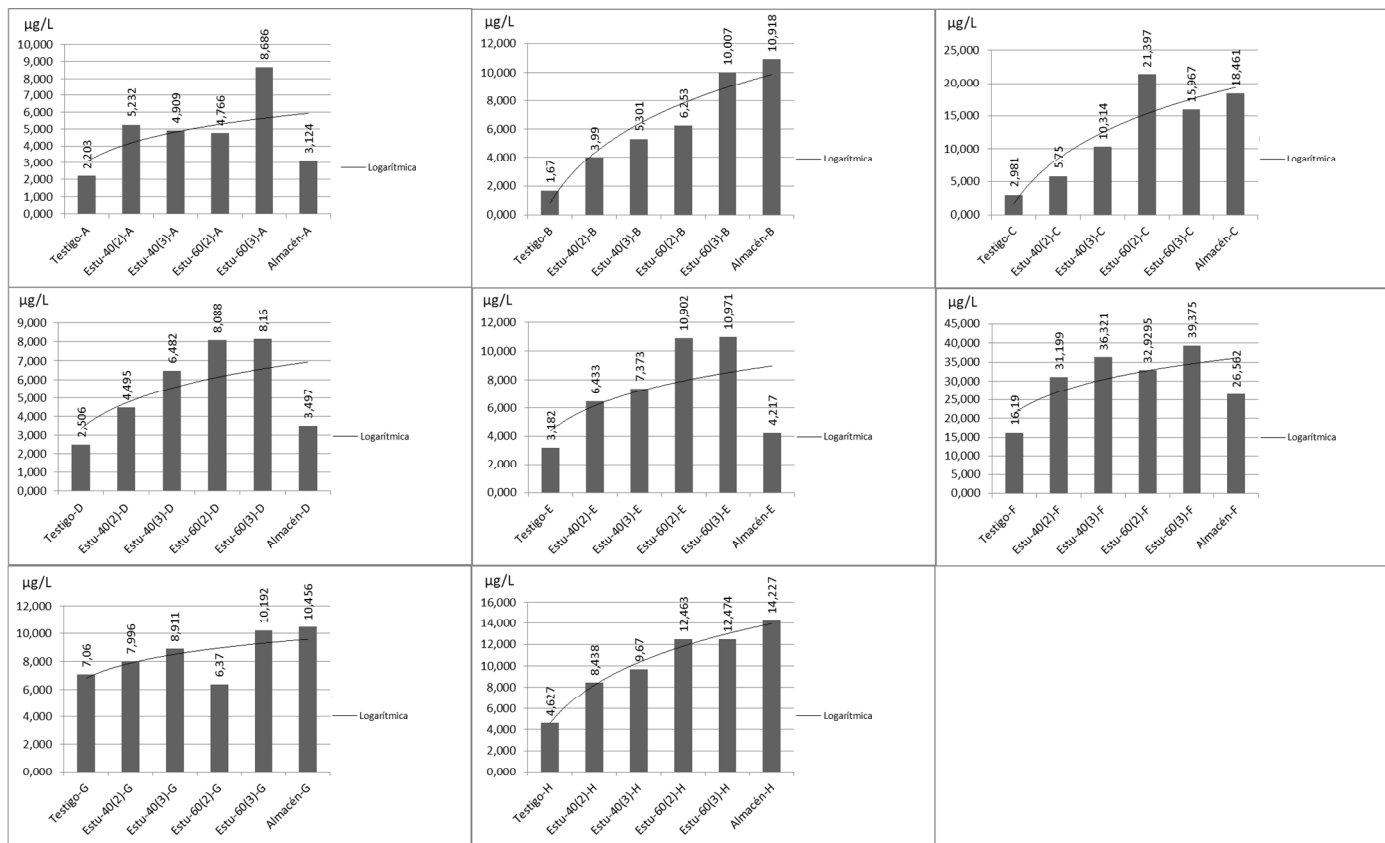


Figura 6.26. Evolución del antimonio en todas las muestras (diferentes tiempos y exposiciones térmicas, y almacén)

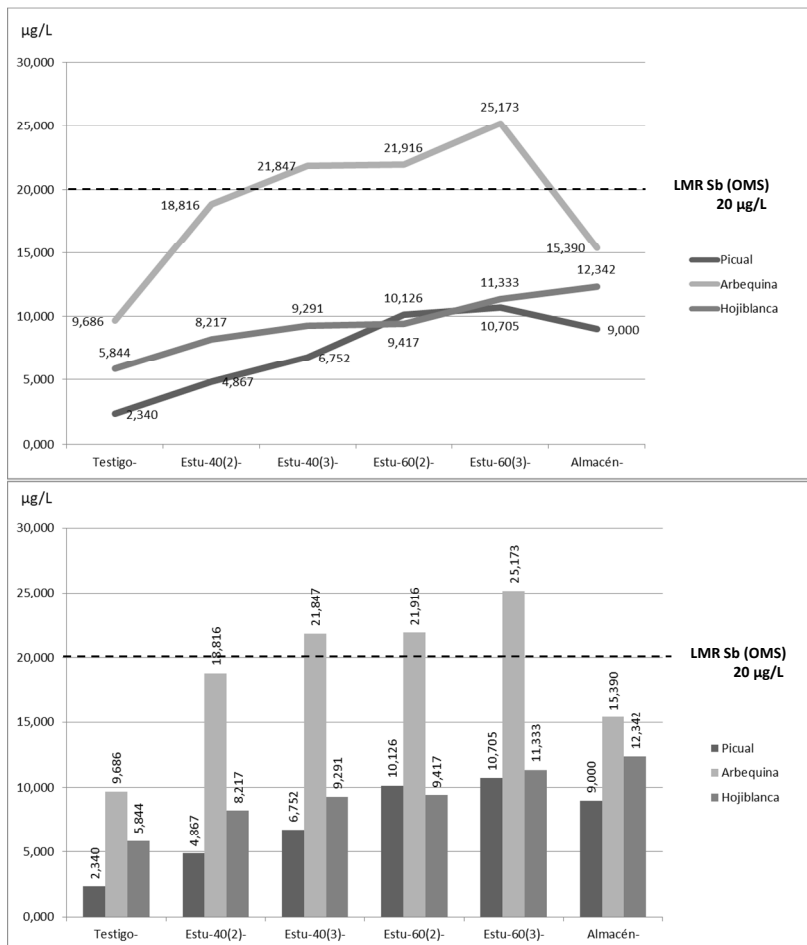


Figura 6.27. Evolución del antimonio según variedades (diferentes tiempos y exposiciones térmicas, y almacén)

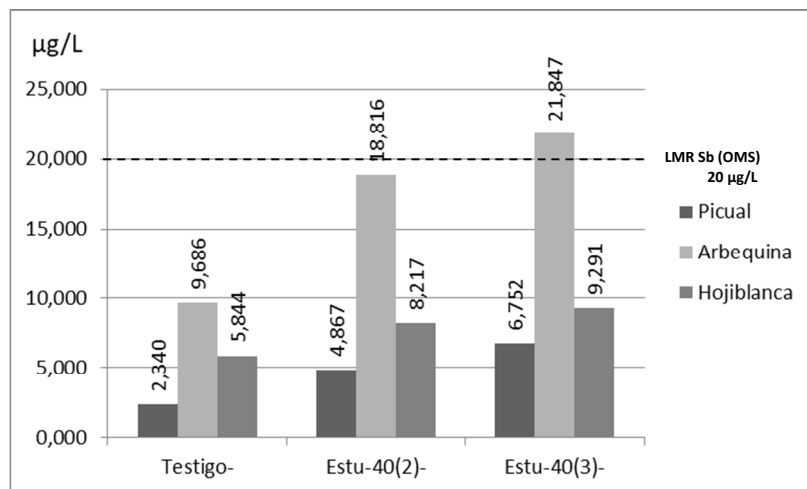


Figura 6.28. Evolución del antimonio según variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 40°C)

En la Figura 6.28 se puede comprobar cómo el Sb está cada vez más presente en el aceite, conforme va aumentando el tiempo de exposición a una misma temperatura, que en este caso es de 40°C. Es la variedad *Arbequina* la que mayor cantidad de Sb contabiliza, incluso sobrepasando el límite de 20 µg/L establecido por la OMS como LMR. En la Tabla 6.12 se recogen los incrementos de Sb entre cada muestra, tomando como referencia tanto el testigo como la medida de 40°C y 2 semanas (40°C (2s)).

Tabla 6.12. Incremento de migración de Sb por variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 40°C)

VARIEDAD	% de incremento entre muestras		
	Referencia	40°C (2s)	40°C (3s)
<i>Picual</i>	Testigo	107,99	188,54
	40°C (2s)	-	38,73
<i>Arbequina</i>	Testigo	87,75	125,55
	40°C (2s)	-	20,13
<i>Hojiblanca</i>	Testigo	40,60	58,98
	40°C (2s)	-	13,07

Si se analizan las variedades, en la tabla se aprecia que a 40°C (2s) el incremento mayor se produce en la variedad *Picual*, seguida de *Arbequina* y finalmente *Hojiblanca*. Esta tendencia se mantiene de la segunda a tercera semana de tratamiento. También, se observa que el aumento de Sb por migración al aceite, es mayor desde la no exposición hasta las dos semanas en exposición a 40°C, que desde esa segunda semana de exposición hasta la tercera. Estos resultados indican que la migración está muy favorecida por la temperatura y que al inicio se produce con una gran rapidez y va estabilizándose con el tiempo.

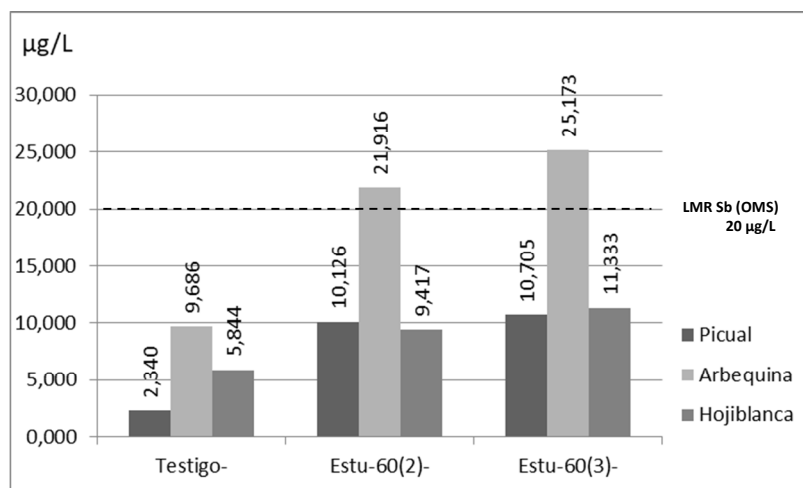


Figura 6.29. Evolución del antimonio según variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 60°C)

En la Figura 6.29, los comportamientos para variación de las exposiciones desde el Testigo hasta la segunda y tercera semana de tiempo, a una temperatura constante de 60°C, son similares a los ya explicados para una temperatura de 40°C.

No obstante, los porcentajes de variación de antimonio en el aceite fueron bastante mayores que los reflejados para temperatura constante de 40°C en las dos primeras semanas, según queda reflejado en la Tabla 6.13, destacando sobremanera el aumento del 332,73% de la variedad *Picual*. En cambio, los porcentajes de aumento fueron muchísimo menores que los de 40°C en el periodo de dos a tres semanas. También, se observa cómo las cantidades de antimonio en el aceite superan, para los dos periodos de tiempo ensayados, el LMR de 20 ppb.

Tabla 6.13. Incremento de migración de Sb por variedades (diferentes tiempos y exposición térmica de 60°C)

VARIEDAD	% de incremento entre muestras		
	Referencia	60°C (2s)	60°C (3s)
<i>Picual</i>	Testigo	332,73	357,47
	60°C (2s)	-	5,71
<i>Arbequina</i>	Testigo	126,26	159,89
	60°C (2s)	-	14,86
<i>Hojiblanca</i>	Testigo	61,14	93,92
	60°C (2s)	-	20,34

La Figura 6.30 muestra ahora la tendencia de la migración del antimonio al aceite, dependiendo de si la temperatura de exposición es de 40 o de 60°C, para un mismo periodo de tiempo de 2 semanas.

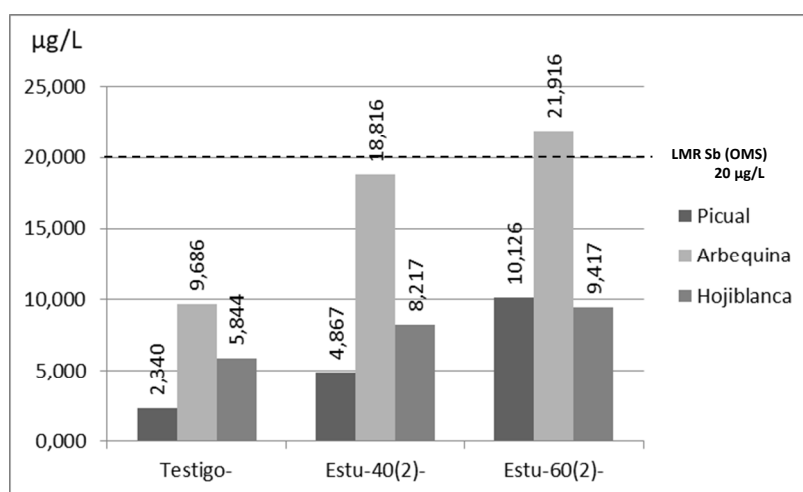


Figura 6.30. Migración del antimonio según variedades (40 y 60°C, durante 2 semanas)

Consultando la citada gráfica de la Figura 6.30 y la Tabla 6.14, se puede apreciar la gran evolución de variedad *Picual* conforme aumenta la temperatura. En cambio, las otras dos variedades apenas sufren incremento de migración desde los 40 a los 60°C.

Tabla 6.14. Incremento de migración de Sb por variedades (40 y 60°C, durante 2 semanas)

VARIEDAD	% de incremento entre muestras		
	Referencia	40°C (2s)	60°C (2s)
<i>Picual</i>	Testigo	108	332,70
	40°C (2s)	-	108,05
<i>Arbequina</i>	Testigo	94,26	126,26
	40°C (2s)	-	16,48
<i>Hojiblanca</i>	Testigo	40,61	61,14
	40°C (2s)	-	14,60

A continuación, en la Figura 6.31, la variación de temperaturas desde 40 a 60°C, para un periodo de 3 semanas, mantiene las tendencias de migración de las anteriores.

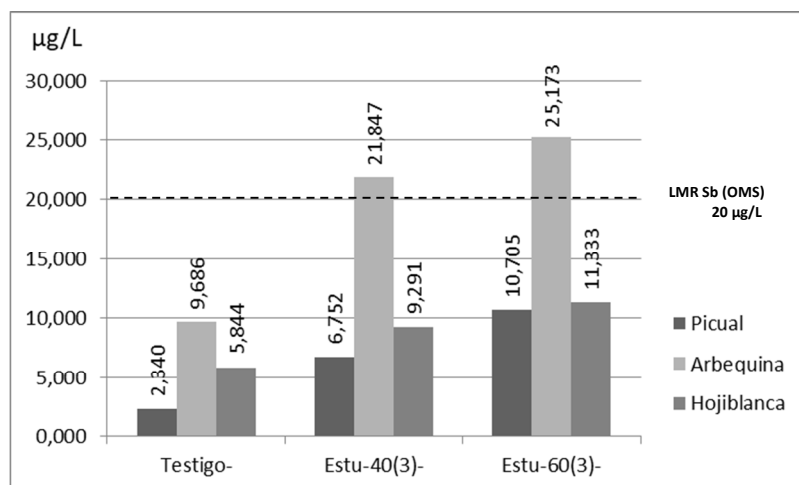


Figura 6.31. Migración del antimonio según variedades (40 y 60°C, durante 3 semanas)

Y en la Tabla 6.15 se compara los porcentajes de evolución de dichas migraciones.

Tabla 6.15. Incremento de migración de Sb por variedades (40 y 60°C, durante 3 semanas)

VARIEDAD	% de incremento entre muestras		
	Referencia	40°C (3s)	60°C (3s)
<i>Picual</i>	Testigo	188,55	357,48
	40°C (3s)	0	58,55
<i>Arbequina</i>	Testigo	125,55	159,89
	40°C (3s)	0	15,22
<i>Hojiblanca</i>	Testigo	58,98	93,93
	40°C (3s)	0	21,98

Por todo lo anterior, se puede indicar que es la temperatura el factor que más afecta a la migración sobre todo en los tiempos iniciales y que los aceites de la variedad *Picual* son los que más incremento de Sb presentan, seguidos por los de la variedad *Arbequina* y después *Hojiblanca*. Es probable que características propias de los aceites de cada variedad (composición, propiedades físicas, tensión superficial, etc.) sean las que justifiquen estos resultados.

6.3.2.3. Efecto de la exposición solar en la migración del Sb

En la Figura 6.32 se muestran los resultados obtenidos de los aceites que se sometieron a la exposición solar continuada durante 1, 2, 3 y 4 semanas. Las concentraciones de Sb obtenidas para las distintas muestras están comprendidas entre: 1) 2,98 $\mu\text{g/L}$ – 23,90 $\mu\text{g/L}$ para la muestra de aceite *Picual* (muestra C), que sobrepasa el límite de residuos máximo establecido por la OMS en 20 $\mu\text{g/L}$; 2) el intervalo 3,18 $\mu\text{g/L}$ – 7,19 $\mu\text{g/L}$ para la muestra de aceite *Arbequina* (muestra E); y 3) 4,63 $\mu\text{g/L}$ – 11,48 $\mu\text{g/L}$ para la muestra de aceite *Hojiblanca* (muestra H). Se aprecia que, aunque los intervalos son más amplios para el aceite *Picual*, los incrementos son parecidos en los tres aceites.

No obstante, se observa que no hay una relación ascendente completa en todos los distintos tratamientos de exposición, pues aunque existe un incremento en la primera semana de exposición – el más notable – luego la progresión no es plena, pues incluso hay muestras que contienen menor cantidad de antimonio aun habiendo estado expuestas a más semanas. En este sentido, parece ser que el sistema tiende a estabilizarse.

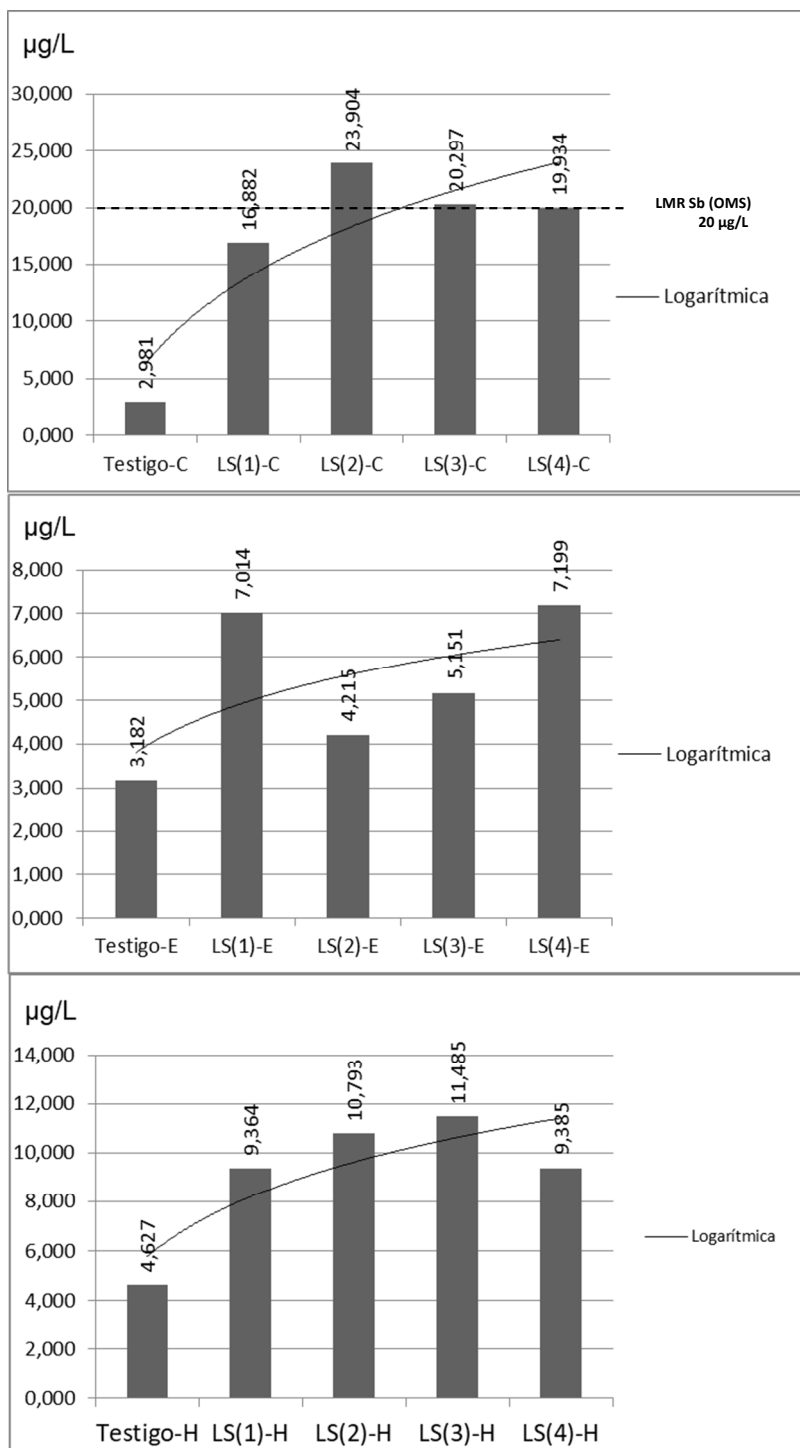


Figura 6.32. Migración del antimonio según variedades y exposición a luz solar

En la Tabla 6.16, se recogen los incrementos en la concentración de Sb de las muestras con respecto al testigo.

Tabla 6.16. Incremento de migración de Sb por variedades (exposiciones a luz solar)

VARIEDAD	Referencia	% de incremento entre muestras				Media
		LS (1s)	LS (2s)	LS (3s)	LS (4s)	
<i>Picual</i>	Testigo	466,32	701,88	580,88	568,70	579,44
<i>Arbequina</i>	Testigo	120,43	32,46	61,88	126,24	85,25
<i>Hojiblanca</i>	Testigo	102,38	133,26	148,22	102,83	121,67

En este caso se aprecia que el efecto de la radiación solar no es tan importante como el de la temperatura si comparamos estas tendencias con las obtenidas con los tratamientos térmicos. Sin embargo, resulta interesante relacionar el fenómeno de la migración con la degradación del PET tal y como se discutió en el apartado 6.1.

En la Figura 6.33, se recuerda el comportamiento del Índice de carbonilo en los PET analizados que sufrieron estas mismas exposiciones a la luz solar. En dicha gráfica se aprecia con claridad cómo existe cierta similitud en la evolución del índice de carbonilo y la migración de Sb, lo cual pone de manifiesto que en este estudio el efecto de la radiación en la matriz polimérica es de gran importancia para que se produzca en mayor o menor medida la migración.

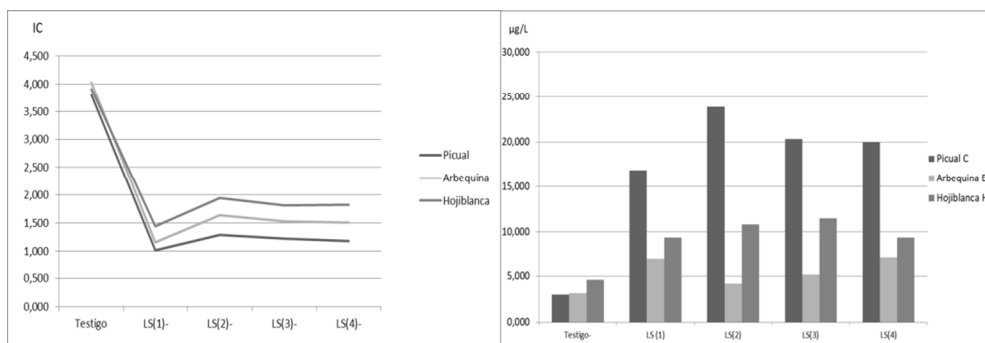


Figura 6.33. Índices de carbonilo del PET y Sb en el aceite, expuestos a la luz solar

6.3.2.4. Comparación con migración de Sb en otros alimentos

Se va a comparar los resultados obtenidos en esta Tesis con los de otros alimentos. Dado que los trabajos que existen en la bibliografía de determinación de Sb

en otros alimentos están enfocados en cuantificar el contenido de ese elemento en el alimento y no a evaluar su presencia como consecuencia de la migración, se compararán con agua embotellada en PET, ya que este alimento si está muy estudiado.

Si se comparan los resultados obtenido de la presencia de Sb en muestras de aceite almacenadas con muestras de agua con almacenamientos similares hay que indicar que mientras la cantidad de Sb medio de las muestras de aceite en almacén es de 3,12 $\mu\text{g/L}$ - 26,55 $\mu\text{g/L}$, en las muestras de agua es $0,332 \pm 0,015 \mu\text{g/L}$ (Payán *et al.*, 2017).

En el caso del agua, que pese a la presencia de cierta cantidad de Sb en las muestras de agua analizadas, en ninguno de los casos se alcanza el límite de 5 $\mu\text{g/L}$ establecido en la legislación vigente para Europa y España, como consecuencia de un periodo de almacenamiento durante seis meses a temperatura ambiente.

El efecto del almacenamiento a temperatura ambiente se ha obtenido, en el caso de otros autores, según lo reflejado en la Tabla 6.17.

Tabla 6.17. Almacenamiento a temperatura ambiente. Incremento de migración de Sb

Temperatura de exposición (°C)	Tiempo de exposición (meses)	Sb ($\mu\text{g/L}$)	Referencias
Temperatura ambiente	6	8,90-2.570 (1)	Shotyk <i>et al.</i> (2007)
22	3	0,226 $\mu\text{g/L}$	Westerhoff <i>et al.</i> (2008)
22	7 (3)	11,7-54,1 (1)	Reimann <i>et al.</i> (2012)
23	60 (3)	0,02-0,03 $\mu\text{g/L}$	Andra <i>et al.</i> (2012)
Temperatura ambiente	19	2,79 $\mu\text{g/L}$	Tukur <i>et al.</i> (2012)
Temperatura ambiente	2	3 (2)	Tukur <i>et al.</i> (2012)
25	440 (3)	0,6 $\mu\text{g/L}$	Rungchang <i>et al.</i> (2013)
25	7 (3)	$6,88 \pm 2,50$ (1)	Fan <i>et al.</i> (2014)
(1): ng/L (2): mg/L (3): días			

Si se comparan los resultados en el caso de alimentos sometidos a tratamientos térmicos, o en muestras de agua envasadas en PET y sometidas a tratamientos similares (Payan *et al.*, 2017), no se detecta la presencia de antimonio para 25°C y 40°C de

temperatura, aunque sus valores quedan próximos al límite de detección ($0,45 \pm 0,01 \mu\text{g/L}$). Sin embargo, a 60°C hay un incremento notable en la concentración de Sb, que se hace prácticamente del doble al pasar de una a dos semanas de tratamiento. Esto, guarda cierta similitud con los datos de Sb conseguidos tras los tratamientos a que se sometieron los aceites muestreados en esta Tesis Doctoral. Aunque en este caso, el mayor aumento de migración de antimonio al aceite se observó en el salto al tratamiento de 40°C , siendo el incremento mucho menor desde los 40°C a los 60°C de exposición.

Siguiendo con los estudios recopilados, para la temperatura y periodo de tiempo estudiados en el caso del agua, se observa que a partir de las condiciones de 60°C durante dos semanas, se alcanzan concentraciones de antimonio que sobrepasan el límite permitido. Concretamente, las concentraciones de Sb en el agua obtenidas en el estudio de Payán *et al.* (2017), variaron de $3,05 \mu\text{g/L}$ a $25,75 \mu\text{g/L}$ después de una semana de almacenamiento a 60 y 80°C , datos muchos más altos que los medidos en otros estudios como el de Reimann *et al.*, (2012). En este estudio que se presenta, también los datos más altos de migración al aceite de antimonio se han dado en los tratamientos de 60°C de exposición térmica, siendo el mayor el de tres semanas, con $25,17 \mu\text{g/L}$, aunque seguido de cerca por los $21,84 \mu\text{g/L}$ de antimonio en el aceite con exposición a 60°C durante dos semanas; y ambos por encima de los $20 \mu\text{g/L}$ de LMR establecido por la OMS.

En otros trabajos, como el de Bach *et al.* (2013) se observaron también aumentos de la concentración de Sb desde $0,5 \mu\text{g/L}$ a $3,5 \mu\text{g/L}$, después de 10 días a 40°C y 60°C , aunque en este caso concreto con mucha menor trascendencia y con unos datos muy alejados de los LMR establecidos por la OMS para la presencia del Sb en agua.

En cuanto a la influencia del tiempo y la temperatura, en el trabajo de Payán *et al.* (2017), las concentraciones de Sb obtenidas después de una y dos semanas de almacenamiento a 80°C fueron $25,75$ y $47,5 \mu\text{g/L}$, respectivamente (aumento de Sb de 1,8 veces). En los trabajos anteriores de Fan *et al.* (2014) se informaron valores medianos de concentración de Sb de 211 y 316 ng/L, después de una y dos semanas de almacenamiento a 70°C (aumento de 1,5 veces, similar al obtenido en el

mencionado trabajo de Payan *et al.* en 2017). En cambio, en un estudio de Bach *et al.* (2013) se detectó un aumento en la concentración de Sb de hasta siete veces el valor inicial, después de 10 días de almacenamiento a 40°C y 60°C (desde 0,5 µg/L a 40°C, hasta 3,5 µg /L a 60°C).

En otro estudio realizado en agua (Carneado *et al.*, 2015), detectó un notable incremento de la concentración de Sb (de 6,8 veces, parecido al indicado por Bach *et al.*, 2013), tras 15 días de exposición del agua a 60°C (pasó la migración de 0,5µg/L a 3,4µg/L de Sb en el agua).

En el caso de temperaturas de exposición de 80°C, la tendencia es similar aunque el aumento de Sb es mucho mayor, siendo prácticamente diez veces superior, tanto para una como para dos semanas, lo que viene a demostrar la importancia que estas variables presentan para la migración de antimonio desde el envase PET hasta el agua mineral. Así, cabe destacar cómo tras dos semanas de almacenamiento a 80°C la concentración de antimonio se incrementó más de un 9,5‰ con respecto a la concentración que presentaba inicialmente.

6.3.3. Análisis de As, Cd y Pb

En este apartado se van a presentar y discutir los resultados de las muestras Testigo y Almacén, para comparar entre los diferentes aceites qué cantidades de los metales pesados As y Pb contenían, ya que sus límites máximos residuales están especificados por el COI para los aceites de oliva. También, la cantidad de Cd en dichos aceites, al estar este metal pesado con frecuencia presente en los alimentos y ser muy tóxico, de ahí sus bajos LMR permitidos en la legislación. Al mismo tiempo, también se han comparado las concentraciones medias de cada metal pesado por variedad de aceite de las muestras Testigo y Almacén.

Las normativas que se han considerado para evaluar los límites de toxicidad han sido: la del COI para As y Pb en aceites (100 µg/kg); la del *Codex Alimentarius* para los tres metales en aguas minerales naturales, siendo para el As y el Pb 10 µg/kg y para el Cd 3 µg/kg. Y, por último, para el caso del Pb también se ha tenido como referencia el

valor de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido en la Unión Europea.

6.3.3.1. Análisis del arsénico

En la Figura 6.33 se muestran las concentraciones de As para cada muestra de aceite analizado. Se puede observar, cómo ninguna muestra se acerca al LMR de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido por el *Codex Alimentarius*, para agua embotellada. Esta diferencia es mayor si se comparan los resultados con el valor de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fijado por el COI, como LMR para el As en la norma comercial para los aceites de oliva y de orujo de oliva.

A vista de los resultados numéricos de la Figura 6.34, también se puede concluir que las muestras de la variedad *Picual*, tanto para los Testigos como para el Almacén, presentan valores superiores en comparación con las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, siendo esta última la que contiene menos cantidad de arsénico.

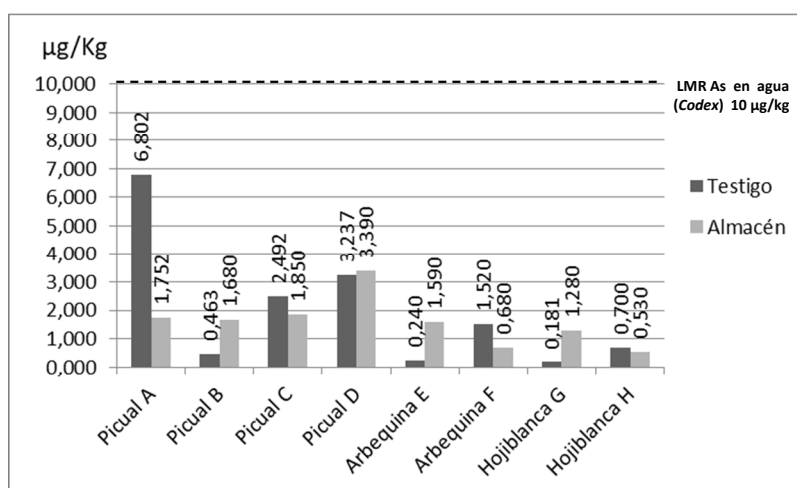


Figura 6.34. Concentraciones de As en Testigo y Almacén

Por tanto, se deduce que las concentraciones de As detectadas en todas las muestras de aceite analizadas, independientemente de la variedad, no presentan ningún riesgo para el consumo al no superar en ningún caso los valores críticos de las normativas consideradas.

En la Figura 6.35, se muestran las concentraciones medias de As presentes por variedad, donde se corrobora que es la variedad *Picual* la que mayor cantidad de arsénico contiene, con diferencia, frente a las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, tanto

para las muestras Testigo como para las muestras Almacén.

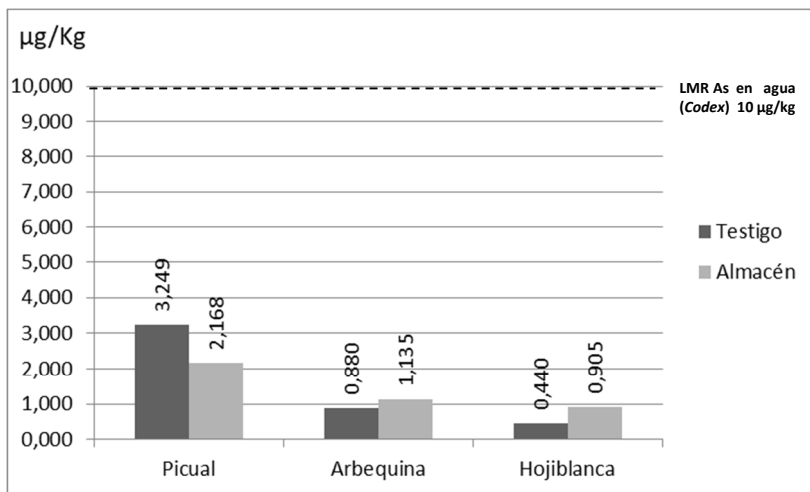


Figura 6.35. Valores medios de las concentraciones de As para Testigo y Almacén

6.3.3.2. Análisis del cadmio

En la Figura 6.36 se muestran las cantidades de cadmio para cada aceite, y se comparan con el LMR establecido por el *Codex Alimentarius*, que es de 3 µg/kg para el agua.

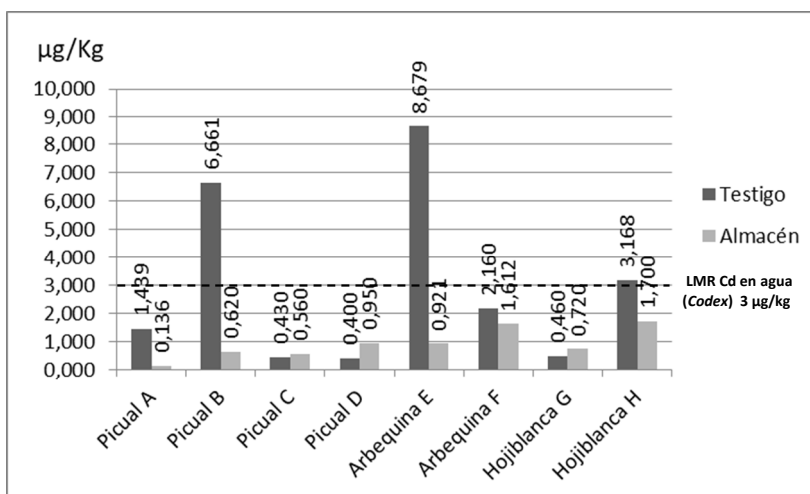


Figura 6.36. Concentraciones de Cd en Testigo y Almacén

Así, se puede observar cómo las muestras Testigo de *Picual* B, *Arbequina* E y *Hojiblanca* H superan el límite establecido por el *Codex Alimentarius* para este metal pesado. Entre estas cantidades, resaltar significativamente frente a las otras dos, el cadmio existente en la muestra *Arbequina* E. Las muestras de Almacén sin embargo se mantienen en todos los casos inferiores al LMR.

En la Figura 6.37 se presenta la gráfica de medias de concentración de cadmio por variedad, para Testigo y Almacén. En ellas se observa, en primer lugar para las muestra Testigo, que es la variedad *Arbequina* la que sigue destacándose por tener el mayor valor de concentración de cadmio, y la única que supera el LMR. Y para el periodo de almacenamiento, que las muestras se mantienen con valores por debajo de $3 \mu\text{g/kg}$.

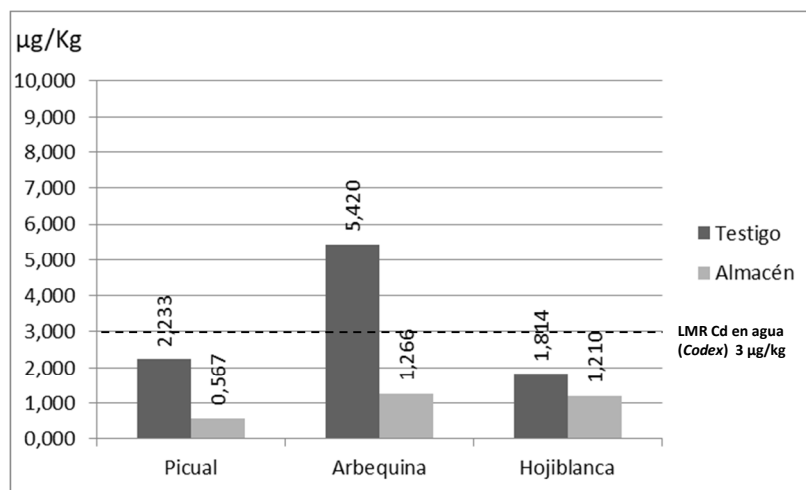


Figura 6.37. Valores medios de las concentraciones de Cd para Testigo y Almacén

6.3.3.3. Análisis del plomo

Por último, en la Figura 6.38 se muestran las cantidades de plomo para cada aceite, en Testigo y en Almacén, así como el LMR de $100 \mu\text{g/kg}$ establecido para el aceite, tanto en la legislación de la Unión Europea como por el COI. Ese límite baja hasta los $10 \mu\text{g/kg}$, según el *Codex Alimentarius* para el caso de las aguas minerales naturales.

Se puede observar cómo las concentraciones para los Testigos se encuentran entre los valores de 30,5 y 178,4 $\mu\text{g/kg}$, superando todos los LMR UE, COI y Codex Alimentarius. La misma tendencia presentan las muestras de Almacén.

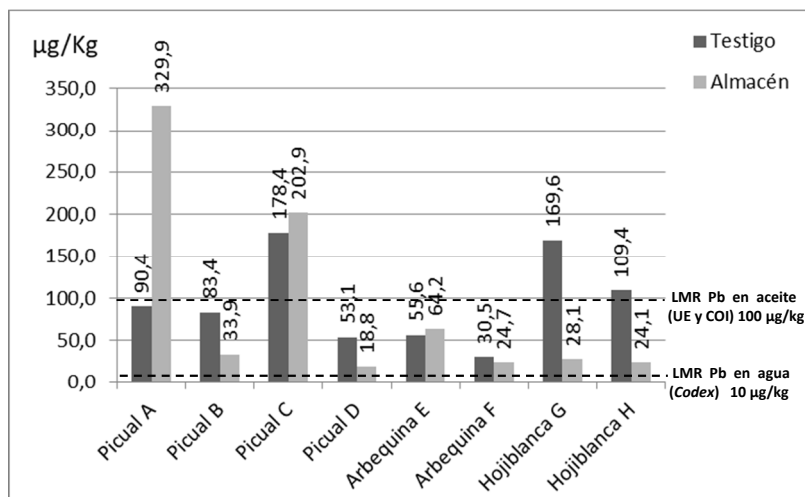


Figura 6.38. Concentraciones de Pb en Testigo y Almacén

En la Figura 6.39 se presenta la gráfica de los valores medios de las concentraciones de Testigo y Almacén para cada aceite, donde se puede comprobar que la variedad *Picual* contiene cantidades mayores de plomo, tanto en Testigo como en Almacén. Cabe destacar, el valor alcanzado por la *Hojiblanca* Testigo, casi tan alto como el máximo alcanzado en la gráfica, que es el de Almacén de *Picual*.

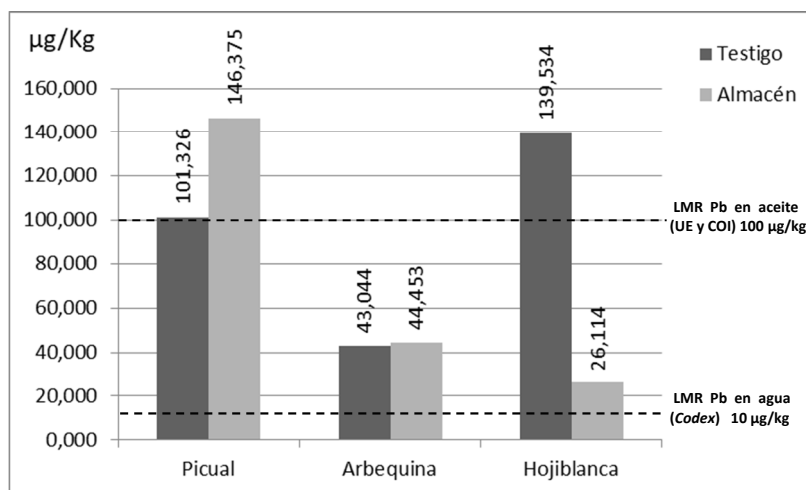


Figura 6.39. Valores medios de las concentraciones de Pb para Testigo y Almacén

Los niveles de concentración de Pb, no cumplirían en ningún caso (Testigo y Almacén) con la normativa Codex de 10 $\mu\text{g/kg}$. Sin embargo, en cuanto a las normativas de la UE y del COI, la variedad *Picual* y la *Hojiblanca* superarían los 100 $\mu\text{g/kg}$.

Como conclusión, y comparando la influencia que el almacenamiento presenta en los valores de concentración de los tres metales pesados medidos, se observa que afecta menos al As y el Cd. También, se aprecia que en general el almacenamiento ha propiciado que los valores de los metales presentes en el aceite tiendan a disminuir.

Una vez realizada la discusión particular sobre los resultados obtenidos para As, Cd y Pb en esta Tesis Doctoral de las muestras de AOVE correspondientes al testigo y período de almacenamiento, se procede a discutir éstos, con los datos encontrados de la revisión bibliográfica (Tablas 3.9 y 3.10) y establecer una comparativa para el cumplimiento de la normativa Codex, COI y UE.

Para facilitar su discusión, en la Figura 6.40 se han representado en las filas los alimentos y en primer lugar las muestras de AOVE de este estudio y, a continuación, los distintos grupos de alimentos de la revisión bibliográfica. Si bien hay que hacer una aclaración, pues la fila de “alimentos en general” agrupa a una gran variedad de alimentos, ensayados en los correspondientes artículos de Nardi *et al.* (2009) y Millour *et al.* (2011), entre los que se encuentran, agrupados, cereales, grasas, derivados lácteos, pescados, carnes, bebidas, productos snack, etc.

En esa Figura 6.40, también se representan las concentraciones de cada metal pesado, en forma de intervalos con máximos y mínimos de cada contaminante, para cada tipo de alimento; y los valores de los LMR específicos de las normativas seleccionadas del Codex, COI y de la Unión Europea.

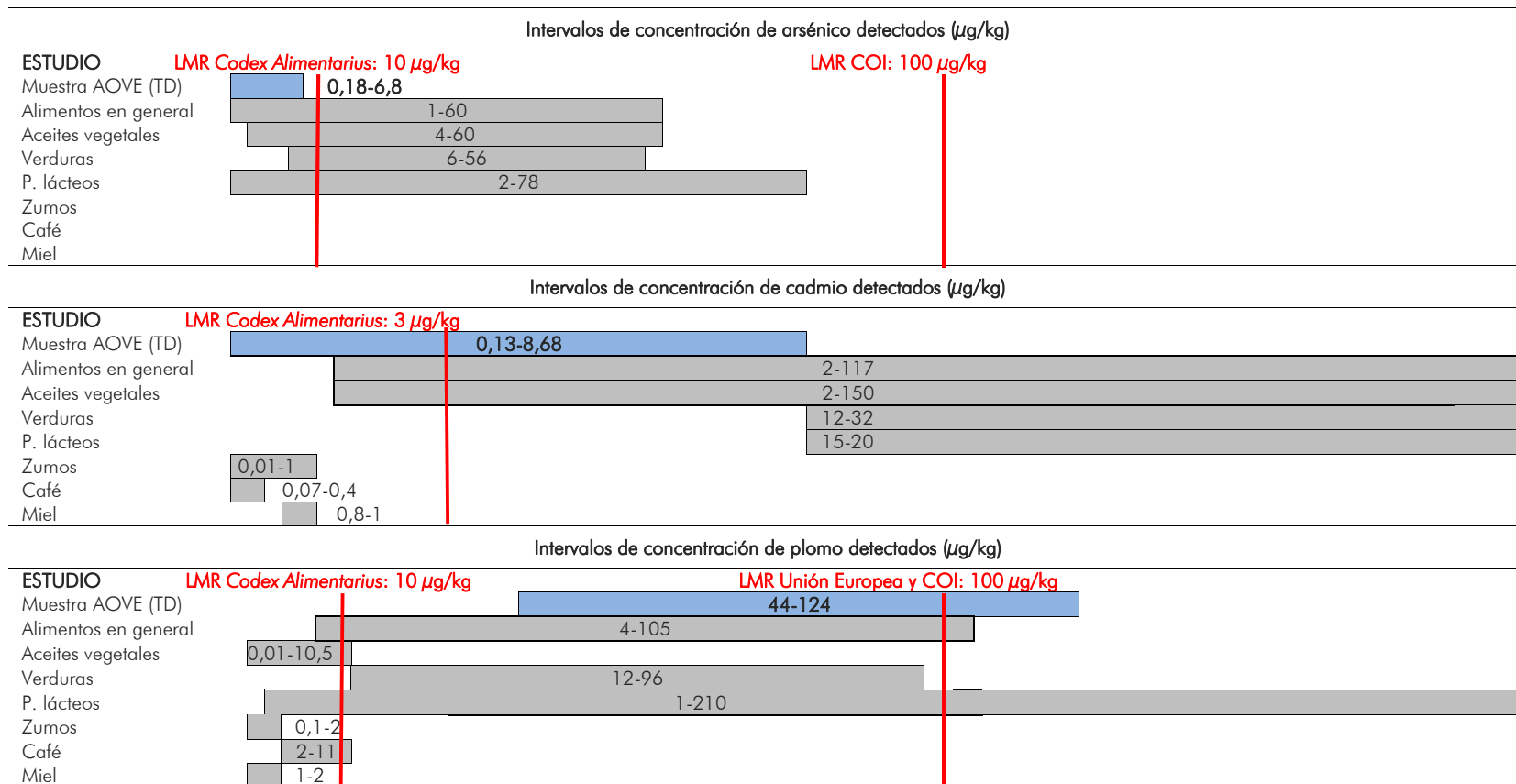


Figura 6.40. Intervalos de concentración de metales pesados (As, Cd y Pb) detectados en los trabajos consultados, frente a los LMR de UE y Codex Alimentarius

En términos generales, para los metales pesados se puede decir que los aceites vegetales, derivados lácteos y verduras tienen valores superiores, mientras que zumos, café, té y miel los tienen inferiores, incluso en estos el As no llega a detectarse. Esta diferencia puede venir asociada a la composición de la matriz de los alimentos, presentando las bebidas en general una matriz más simple.

En cuanto al resto de grupos de alimentos frescos, como las verduras no procesadas, la mayor presencia de As, Cd y Pb puede deberse a la mayor incidencia de determinadas prácticas agrícolas, o proceder de los focos de las emisiones industriales cercanos, o del propio suelo.

Sobre los derivados lácteos y grasas vegetales decir, que su composición es rica en una gran variedad de compuestos químicos. Estos, influenciados por el procesado industrial, pueden ayudar a retener los metales pesados en la matriz del alimento, mediante la formación de otros compuestos químicos más estables.

En el caso de la miel, hay que destacar que la presencia de estos metales puede ser algo particular, y su procedencia, principalmente ambiental, debido al contacto directo o indirecto de las abejas, durante la polinización, con el agente contaminante.

A modo de estudio comparativo de normativas, en primer lugar podemos afirmar que el As superaría en todos los casos el LMR del *Codex Alimentarius* (10 $\mu\text{g/kg}$) salvo para las muestras de aceite de oliva virgen extra. En el caso del Cd, teniendo en cuenta el único valor de LMR de 3 $\mu\text{g/kg}$ elegido, también correspondiente al *Codex Alimentarius*, todos los alimentos estudiados lo superarían, salvo los zumos, el café y la miel, siendo, en algunos casos, excesivamente elevado. Para la justificación de esta circunstancia habría que estudiar con más detalle el origen y la procedencia del alimento en particular. Por último, el Pb presentaría una tendencia similar a la del Cd, con valores de concentración no excesivamente altos si son comparados con el LMR de 100 $\mu\text{g/kg}$ establecido por el COI y en la UE. Sólo los productos lácteos superarían en dos veces aproximadamente el citado límite.

En concreto y para dar por finalizada esta discusión, observar que las muestras de aceite de oliva virgen extra estudiadas en esta Tesis Doctoral, si son comparadas con el LMR de 100 $\mu\text{g/kg}$ establecido por el COI en la normativa comercial para aceites de

oliva y de orujo de oliva para As y Pb, presentaron unas cantidades de As muy inferiores al mismo; aunque en el caso del Pb sí que la superaron, mostrando además un intervalo de concentraciones más corto que el de otros elementos (44-124 $\mu\text{g/kg}$), lo que supondría un riesgo para su consumo.

Todos los resultados de los apartados 6.2 y 6.3 de este capítulo, expresados como valor medio $\pm$ desviación típica, réplica de tres medidas, representados gráficamente, están en forma de tablas en el Anexo 1.

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se han deducido las siguientes conclusiones:

1. El análisis de las muestras de PET mediante FT-IR confirma que se ha producido deterioro del plástico, al observarse variaciones en determinadas bandas que indicarían la presencia de productos secundarios de degradación, que pueden alterar los aceites. Del mismo modo, estos productos de degradación, provocan que el índice de carbonilo aumente con el tiempo y la temperatura. Tras la comparación de los valores obtenidos en los tratamientos, se puede deducir que las altas temperaturas afectan de forma más desfavorable a la degradación de los plásticos que el tiempo.
2. La variedad *Picual*, en términos de parámetros de calidad, muestra valores cambiantes de acidez, índice de peróxidos, K_{232} y K_{268} en comparación con los límites establecidos por el Reglamento Europeo para los aceites de oliva virgen extra. La variedad *Arbequina* tiene un comportamiento similar pero sólo para el índice de peróxidos; y la variedad *Hojiblanca* mantiene sus parámetros dentro de la categoría de aceites de oliva virgen extra. Sin embargo, el análisis sensorial de todas las variedades determina que los aceites pasaron a categoría "virgen" o, incluso, "lampante" después de los tratamientos. En cuanto al perfil de ácidos grasos, prácticamente éste no cambia en ninguna de las tres variedades. Y en relación a los compuestos minoritarios, los pigmentos no se alteran, con la excepción del aceite *Picual* A; el contenido de polifenoles tampoco se ve afectado por los tratamientos; sin embargo, el contenido de tocoferoles cambia considerablemente en todos los aceites, excepto para el *Picual* B.
3. A la vista de los resultados, el análisis sensorial y, dentro del análisis físico-químico, los compuestos minoritarios son los más influenciados por los tratamientos sufridos de exposición a temperatura y tiempo. Por tanto, debido a la gran importancia de los mismos para el mantenimiento de la categoría "virgen extra", la conclusión a la que se ha llegado es de gran interés para el control y diseño de la trazabilidad del aceite de oliva virgen extra, en su fase de comercialización y distribución. El análisis de varianza (ANOVA) indica que todos los factores estudiados (variedad del fruto, tiempo y temperatura) tienen una gran influencia, aunque el factor variedad de olivo es el más relevante.

Cabe mencionar, que los parámetros de calidad más afectados (K_{232} , K_{268} e índice de peróxidos) son precisamente los que sirven para analizar cuál es el estado de oxidación del aceite de oliva. Por todo ello, los efectos de las condiciones extremas de temperatura y tiempo que se han ensayado en esta Tesis Doctoral, a modo de simulación de condiciones extremas de almacenamiento, manejo durante la distribución comercial y uso doméstico, son concluyentes sobre la calidad de los aceites de las tres variedades estudiadas, y pueden extrapolarse a otras variedades para condiciones similares.

4. El método analítico utilizado ha permitido cuantificar con éxito la concentración de As, Cd, Pb, Sb, para las muestras estudiadas, mediante el uso de la técnica analítica ICP-MS. Así lo demuestra el estudio de recuperación llevado a cabo para la validación del método.
5. En relación a la migración de Sb, el almacenamiento prolongado de las muestras de AOVE da lugar a un incremento de la concentración de Sb en los aceites con respecto a la muestra Testigo, siendo la variedad *Arbequina* la que obtiene valores más próximos al LMR de 20 ppb establecido por la OMS. Sin embargo, los mayores incrementos se producen en los aceites de la variedad *Picual*, seguidos a continuación por los de la variedad *Hojiblanca*, y por los de la variedad *Arbequina* en último lugar.
6. Los tratamientos en estufa provocan un aumento del antimonio presente en las distintas muestras, a medida que se aumenta la temperatura y el tiempo de exposición de los aceites, siendo similar la tendencia en las tres variedades. Sin embargo, es la variedad *Arbequina* la que muestra mayores valores de concentración de Sb, llegando a superar el LMR de 20 ppb establecido por la OMS, tras tres semanas de exposición a 60°C. Se observa, que la temperatura es el factor que más afecta a la migración, sobre todo en los tiempos iniciales. Concretamente, en los aceites de la variedad *Picual* es donde se miden mayores incrementos de Sb, seguidos de la variedad *Arbequina* y, por último, de la *Hojiblanca*. Es probable por tanto, que las características propias de cada variedad de aceite (composición, propiedades físicas, tensión superficial, etc.) sean las que justifiquen estos resultados.
7. El efecto de la luz solar en la migración de Sb es menor que el provocado por los demás tratamientos. El aceite de la variedad *Picual* es el que presenta

valores mayores de concentración de antimonio debido a la exposición a la luz solar, superando el LMR de 20 ppb establecido por la OMS. Los incrementos más altos los sufre el aceite *Picual*, seguidos del aceite *Arbequina* y, en último lugar, del *Hojiblanca*.

8. Si se observa el comportamiento del índice de carbonilo en las muestras de PET analizadas, que sufrieron las mismas exposiciones a la luz solar, se aprecia cómo existe cierta similitud en la evolución del citado índice de carbonilo y de la concentración de Sb en el aceite, fruto de la migración desde el plástico. En este estudio, esto pone de manifiesto que el efecto de la radiación en la matriz polimérica es de gran importancia para que se produzca en mayor o menor medida la migración.
9. En el análisis de As, las muestras de la variedad *Picual*, tanto para los Testigos como para el Almacén, presentan valores superiores en comparación con las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, siendo esta última la que contiene menor cantidad de arsénico. No se han detectado límites superiores a los permitidos por la legislación vigente.
10. La concentración medida para el Cd, en las muestras Testigo de *Arbequina* destaca sobre las demás, siendo la única que supera el LMR de 3 µg/kg, establecido para el agua por el *Codex Alimentarius*. En cuanto a las muestras de Almacén, se mantienen con valores por debajo de esos 3 µg/kg.
11. Las concentraciones de Pb determinadas en todos los aceites superan el límite del *Codex Alimentarius* de 10 µg/kg, establecido para el agua. Sin embargo y en relación con el LMR de 100 µg/kg marcado por el COI y la UE para los aceites de oliva, sólo las muestras de la variedad *Picual* y el Testigo de *Arbequina* lo superan.

8. BIBLIOGRAFÍA

ACANSKI, M.; REDZEPOVIC, A. S.; VUJIC, D. N.; LAZIC, V. L. (2014). Determinación de elementos traza en contenedores de PET diseñados para la conservación del agua. *Todo Empaque*, vol. 5, n° 1, enero-febrero, pp. 10-17. Certificado de licitud de título y contenido en trámite, reserva n° 04-2009-11-2013535700-102 del Instituto Nacional de Derecho de Autor- Registro postal PP09-1791 (México).

ADROVER-OBRAADOR, S.; COMAS, F.; DALMAU, M.E.; GONZÁLEZ-CENTENO, M.R.; ROSSELLÓ, C.; GARAU, M.C.; FEMENIA, A. (2012). Influencia de los tratamientos térmicos sobre las propiedades físicoquímicas del aceite de oliva virgen extra. En: S. ADROVER-OBRAADOR ET AL: *Libro de Actas del VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos (CESIA)*. Edita CESIA. Ciudad Real: p. 84. ISBN: 978-84-695-4196-8.

AGENCIA ESPAÑOLA DE CONSUMO, SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN (AECOSAN). *Materiales destinados al contacto con alimentos* (Tríptico divulgativo). Edita: AECOSAN. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. NIPO: 690-15-007-5. Disponible en web: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/seguridad_alimentaria/materiales_destinados_contacto_alimentos.pdf. [Consultado el 04/07/2019].

AGENCIA CATALANA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA, GENERALIDAD DE CATALUÑA, DEPARTAMENTO DE SALUD (2012). *Guía de prácticas correctas de higiene para la elaboración de aceite de oliva virgen*. 1ª edición. Barcelona: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. D.L.: B. 31912-2012.

AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN, GOBIERNO DE ESPAÑA, MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL (2009). *Guía para aplicación de trazabilidad en la empresa agroalimentaria*. 1ª edición. Madrid: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. D.L.: M-33-901-2009.

AGUILERA, M.A.; UCEDA, M.; BELTRÁN, G. (2017). La Calidad del Aceite de Oliva. En: D. BARRANCO; R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR; L. RALLO. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundiprensa, cap. 19, pp. 839-868. ISBN: 13 978-84-8476-714-5.

ALBI, T.; LANZÓN, A.; GUINDA, A.; PÉREZ-CAMINO, M.C.; LEÓN, M. (1997). Microwave and conventional heating effects on some physical and chemical parameters of edible fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 45, n° 8, pp. 3000-3003. DOI: 10.1021 / jf970168c.

ALCÁNTARA, C.; SORIANO, M.A.; SAAVEDRA, M.; GÓMEZ, J.A. (2017). Sistemas de manejo del suelo. En: D. BARRANCO; R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR; L. RALLO. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundiprensa, cap. 10., pp. 335-417. ISBN 13 9788484767145, ISBN 10 8484767140. ISBN: 978-84-8476-714-5.

ALONSO, R.; GROCIÍN, S. (2006). *Guía básica de gestión de trazabilidad en el sector alimentario de Navarra. Subsector aceites*. 1ª edición. Navarra: CONSEBRO - Asociación de Industrias Agroalimentarias. D.L.: NA 3292-2006.

ALT, A., HALDIMANN, M. (2008). *Diffusion coefficient of antimony catalysts in polyethylene terephthalate (PET) materials*. Disponible en web: <http://www.aks.ch/dwds/SMLSoftware-Diffusion-of-antimony-catalysts-in-PET.pdf>. [Consulta 14/06/2019].

ALTUNAY, N.; GÜRKAN, R. (2016). Separación / preconcentración de niveles ultra-traza de Sb y Se inorgánicos de diferentes matrices de muestra por emparejamiento de iones sensibilizados por transferencia de carga, utilizando extracción de punto de nube asistida por ultrasonidos antes de su especiación y determinación por generación de hidruro AAS. *Talanta*. Vol. 159, pp. 344-355. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.06.054.

AMEYUGO, U.; ACOSTA, M.; ANTÓN, F.; CARVAJAL, A.; CHAVERNAS, F.; CONEJO, J.; GUTIERREZ, M.; HIDALGO, M.; MENÉNDEZ, J.; PEINADO, J.; RUIZ, I.; SÁNCHEZ, R.; SANTOS, R. (2007). *Documento orientativo de especificaciones de los sistemas de autocontrol*. 3ª edición. Sevilla: Consejería de Salud (Junta de Andalucía).

ANDRA, S.S.; MAKRI, K.C.; SHINE, J.P.; LU, C. (2012). Coleaching of brominated compounds and antimony from bottled water. *Environmental International*. Vol. 38, pp. 45-53. DOI: 10.1016 / j.envint.2011.08.007.

ARIOSTI, A. (1999). Aptitud sanitaria de envases en contacto con alimentos, situación legislativa en el MERCOSUR. En: A. ARIOSTI. *Seminario iberoamericano de interacciones envases plásticos-alimentos*. Santiago de Chile (Chile): 20-21 de abril de 1999.

AUTORIDAD EUROPEA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA (EFSA) (2011). *Informe de ESCO WG sobre materiales no plásticos en contacto con alimentos*. Fecha de publicación: 25/07/2011. Número de pregunta: EFSA-Q-2009-00980. DOI: doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-139.

BACH C., DAUCHY X., CHAGNON M., ETIENNE S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*. Vol. 46, nº3, pp. 571 -583. DOI: 10.1016 / j.watres.2011.11.062.

BACH C., DAUCHY X., SEVERIN, Y.; MUNOZ, J.F.; ETIENNE S. (2013). Effect of temperature on the release of intentionally and non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and potential toxicity. *Food Chemistry*. Vol. 139, pp. 672-680. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.01.046.

BAKKALI, K.; RAMOS, N.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. (2009a). Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. *Food Chemistry*. Vol. 116, pp. 590-594. DOI: 10.1016/foodchem.2009.03.010.

BAKKALI, K.; BALLESTEROS, E.; SOUHAIL, B.; RAMOS, N. (2009b). Determinación de trazas metálicas en aceites vegetales de España y Marruecos mediante espectrometría de absorción con cámara de grafito después de la digestión en horno de microondas. *Grasas y Aceites*. Vol. 60, nº 5, pp. 490-497. DOI: 103989/gya.031909.

BAKKALI, K.; RAMOS, N.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. (2012). Determination of heavy metal content in vegetables and oils from Spain and Morocco by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Letters*. Vol 45, nº 8, pp. 907-919. DOI:10.1080/00032719.2012.655658.

BALTES, W. (2007). *Química de los alimentos*. 1ª edición. Zaragoza: Editorial Acirbia S.A. ISBN: 9788420010816.

BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L.(2017). *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundiprensa. ISBN: 978-84-8476-714-5.

BARRANCO, D. (2017). Variedades y Patrones. En: D. BARRANCO; R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR; L. RALLO. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundiprensa, cap. 3, pp. 65-95. ISBN: 978-84-8476-714-5.

BELTRÁN, M.; MARCILLA, A. (2012). *Tecnología de Polímeros. Procesado y Propiedades*. 1ª edición. Alicante: Publicaciones Universidad de Alicante. ISBN: 978-84-9717-232-5.

BLANCH, G.P.; VILLEN, J., HERRAIZ, M. (1998). Rapid analysis of free erythrodiol and uvaol in olive oils by coupled reversed phase liquid chromatography–gas chromatography. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 46, nº 3, pp. 1027-1030. DOI: 10.1021/jf970886z.

BIATA, R.; NYABA, L.; RAMONTJA, J.; MKETO, N.; NMNGONGO, P. (2017). Determination of antimony and tin in beverages using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid phase microextraction. *Food Chemistry*. Vol. 237, pp. 904-911. DOI: 10.1016/foodchem.2017.06.058.

BOE. DECRETO 2.484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el Código Alimentario Español. Cap. XVI-GRASAS COMESTIBLES, Sección 2ª-Aceites de Oliva. BOE de 19 de octubre de 1967, p. 14.286, y BOE de 20 de octubre de 1967, p.14.326.

BOE. REAL DECRETO 3.000/1979, de 7 de diciembre, sobre regulación de procesos industriales en el sector del aceite de oliva. BOE nº 16, de 18 de enero de 1980, pp. 1.339-1.340.

BOE. REAL DECRETO 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles. BOE nº 44, de 21 de febrero de 1983, pp. 4.853-4.858.

BOE. REAL DECRETO 2.813/1983, de 13 de octubre, por el que se modifica el último párrafo del apartado d) del punto 2.1, «Etiquetas», del epígrafe VI, «Envasado, etiquetado y rotulación», de la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles, aprobada por el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero. BOE nº 270, de 11 de noviembre de 1983, p. 30.389.

BOE. REAL DECRETO 259/1985, de 20 de febrero, por el que se complementa la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles con la aplicación de la determinación de eritrodiol en los aceites de oliva. BOE nº 56, de 6 de marzo de 1985, p. 5.638.

BOE. ORDEN de 13 de enero, por la que se aprueba la lista positiva de aditivos y coadyuvantes tecnológicos para uso en la elaboración de aceites vegetales comestibles. BOE nº 19, de 22 de enero de 1986, pp. 3.089-3.090.

BOE. REAL DECRETO 2.551/1986, de 21 de noviembre, de regulación de la elaboración y comercialización de aceites de orujo refinado y de oliva. BOE nº 302, de 18 de diciembre de 1986, pp. 41.336-41.337.

BOE. REAL DECRETO 1.043/1987, de 24 de julio, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles, aprobada por el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero. BOE nº 207, de 29 de agosto de 1987, p. 26.772.

BOE. REAL DECRETO 475/1988, de 13 de mayo, por el que se establecen los límites máximos permitidos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, en alimentos para consumo humano. BOE nº 121, de 20 de mayo de 1988, p. 15.329.

BOE. ORDEN de 26 de enero, por la que se aprueba la norma de calidad para los aceites y grasas calentados. BOE nº 26, de 31 de enero de 1989, pp. 2.665-2.667.

BOE. REAL DECRETO 494/1990, de 16 de marzo, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles, aprobada por el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, en cuanto a las características físico-químicas que deben reunir los aceites de girasol. BOE nº 98, de 24 de abril de 1990, pp. 11.127-11.128.

BOE. LEY 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. BOE nº 161, de 6 de julio de 2001, pp. 24.250-24.255.

BOE. REAL DECRETO 98/1992, de 7 de febrero, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de aceites vegetales comestibles aprobada por Real Decreto 308/1983, de 25 de enero. BOE nº 38, de 13 de febrero de 1992, pp. 5.015-5.992.

BOE. REAL DECRETO 538/1.993, de 12 de abril, por el que se modifica determinadas disposiciones relativas a los requisitos industriales de elaboración circulación y comercio de aceites vegetales comestibles. BOE nº 107, de 5 de mayo de 1993, pp. 13.358-13.359.

BOE. REAL DECRETO 1.909/1995, de 24 de noviembre, por el que se modifica el apartado 5.1.d) del Título III de la Reglamentación técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles, aprobada por el Real Decreto 308/1983, de 25 de Enero. BOE nº 20, de 23 de enero de 1996, p. 1.958.

BOE. REAL DECRETO 1431/2003, de 21 de noviembre, por el que se establecen determinadas medidas de comercialización en el sector de los aceites de oliva y aceite de orujo de oliva. BOE nº 285, de 28 de noviembre de 2003, pp. 42.415-42.416.

BOE. LEY 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios. Disposición final octava. Modificación de la Ley 11/2001, de 5 de julio, por la que se crea la Agencia Española de Seguridad Alimentaria. BOE nº 312, de 30 de diciembre de 2006, pp. 46.610-46.611.

BOE. CONVENIO INTERNACIONAL DEL ACEITE DE OLIVA Y LAS ACEITUNAS DE MESA, hecho en Ginebra el 29 de abril de 2005. BOE nº 268, de 8 de noviembre de 2007, pp. 45.932 -45.944.

BOE. REAL DECRETO 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. BOE nº 131, de 30 de mayo de 2008, páginas 25.070-25.120.

BOE. REAL DECRETO 846/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones que deben cumplir las materias primas a base de materiales poliméricos reciclados para su utilización en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. BOE nº 164, de 11 de julio de 2011, pp. 76.312-76.315.

BOE. REAL DECRETO 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos. BOE nº 164, de 11 de julio de 2011, pp. 76.316-76.330.

BOE. LEY 17/2011, de 5 de julio, de seguridad alimentaria y nutrición. BOE de 6 de julio de 2011, nº. 160, pp. 71.283-71.319.

BOE. REAL DECRETO 19/2014, de 17 de enero, por el que se refunden los organismos autónomos Instituto Nacional del Consumo y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en un nuevo organismo autónomo denominado Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición y se aprueba su estatuto. BOE nº 29, de 3 de febrero, pp. 7.264-7.290.

BOJA. RESOLUCIÓN de 27 de octubre, de la Secretaría General de Agricultura y Pesca, sobre buenas prácticas en el sector oleícola de Andalucía para mejorar la calidad de sus producciones. BOJA nº 215, de 7 de noviembre de 2003, pp. 23.346- 23.348.

BOJA. LEY 5/2011, de 6 de octubre, del Olivar de Andalucía. BOJA nº 205, de 19 de octubre de 2011, pp. 6-13.

BRADLEY, E.L.; STRATTON, J.S.; LEAK, J.; LISTER, L.; CASTLE, L. (2013). Printing ink compounds in foods: UK survey results. *Food Additives and Contaminant. Part B. Surveill.* Vol. 6, pp. 73-83. DOI: 10.1080/19393210.2012.725774

BRISTON, J.H.; KATAN, L. (1974). *Plastics in contact with food*. 1ª edición. Londres: Food Trade Press Ltd. ISBN: 090037909X.

CABALLERO, J.M.; DEL RÍO, C. (2017). Métodos de Plantación. En: D. BARRANCO; R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR; L.RALLO. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundiپrensa, cap. 4., pp.97-144. ISBN: 978-84-8476-714-5.

CALVO, M. C.; MENDOZA, E.(2012). *Toxicología de los Alimentos*. 1ª edición. México: Editorial Mc. Graw Hill. ISBN: 13 9786071507471.

CARLSSON, D.J.; WILES, D.M. (1976). The Photooxidative Degradation of Polypropylene. Part I. Photooxidation and Photoinitiation Processes. *Journal of Polymer Revision*. Vol. 14, pp. 65-106.

CARNEADO, S.; HERNÁNDEZ-NATAREN, E.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F.; SUHURQUILLO, A. (2015). Migration of antimony from polyethylene terephthalate used in mineral water bottles. *Food Chemistry*. Vol. 166, pp. 544-550. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2014.06.041.

CARRASCO, A.; GARCÍA, R.; ZARROUK, W.; FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. Calidad sensorial del aceite de oliva. En: A. FERNÁNDEZ; A. SEGURA. (2009). *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 13 perspectivas concatenadas*. 1º edición. Málaga: Fundación Unicaja, cap. 8, pp. 225-246. ISBN: 978-84-92526-30-7.

CASTAÑOS, E. *Lidia con la Química. Blog de Enrique Castaños dedicado a la enseñanza y la divulgación de la ciencia*. Disponible en web: <https://lidiaconlaquimica.wordpress.com/2015/07/02/las-grasas-o-acilglicerol/>. [Consulta 22/01/2019].

CATALÁ, R. (2000). Migración en envases de materiales poliméricos. En: R. CATALÁ. *II Congreso internacional de envases de alimentos, RISEA*. Hermosillo, Sonora, México: 14-16 de marzo 2000.

CATALÁ, R.; GAVARA, R. (2002) *Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos*. Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC.

CENTROS DE ASISTENCIA TÉCNICA E INSPECCIÓN DE COMERCIO EXTERIOR (CATICE). SECRETARÍA DE ESTADO DE COMERCIO. *Metales pesados. Revisión Febrero 2019*. Disponible en web: <http://plaguicidas.comercio.es/OtrosCont.pdf>. [Consulta 22/02/2019].

CENTRO DE INSTRUMENTACIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA (CICT). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, Edificio A2, Dependencia A2-105, 23071 Jaén. Disponible en web: <http://gsya.ujaen.es/>. [Consultado el 22/12/2018].

CERRETANI, L.; GÓMEZ, A. M.; BENDINI, A. (2009a). Aspectos Tecnológicos de la Producción de Aceite de Oliva. En: A. FERNÁNDEZ; A. SEGURA. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 13 perspectivas concatenadas*. 1ª edición. Málaga: Fundación Unicaja, cap. 6, pp. 171-193. ISBN: 978-84-92526-30-7.

CERRETANI, L., BENDINI, A., RODRÍGUEZ-ESTRADA, M.T., VITTADINI, E., CHIAVARO, E. (2009b). Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*. Vol. 115, nº 4, pp. 1381-1388. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.060.

CHAPA-MARTÍNEZ, C.A.; HINOJOSA-REYES, L.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; RUIZ-RUIZ, E.; MAYA-TREVIÑO, L.; GUZMÁN-MAR, J.L. (2016). An evaluation of the migration of antimony from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Science of the Total Environment*. Vol. 565, pp. 511-518. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.184.

CHELLIAH, A.; SUBRAMANIAM, M.; GUPTA, R.; GUPTA, A. (2017). Evaluation on the thermos-oxidative degradation of PET using prode. *Indian Journal of Science and Technology*. Febrero de 2017, vol.10, nº 6, pp.1–5. ISSN: 0974-6846.

CHEN, Z.; HAY, J.N.; JENKINS, M.J. (2013). The thermal analysis of poly(ethylene terephthalate) by FTIR spectroscopy. *Thermochimica*, Vol. 552, pp. 123-130. DOI: 10.1016/j.tca.2012.11.002.

CHEVALLIER, L. (2014). *El Libro Antitóxico*. 1ª edición. Barcelona: Ediciones B. ISBN: 978-84-9019-820-9.

CHOE, S.Y., KIM, S.J., KIM, H.G., LEE, J.H., CHOI, Y., LEE, H. (2003). Evaluation of estrogenicity of major heavy metals. *Sci Total Environ*. Vol. 312, nº 1-3, pp.15–21. DOI: 10.1016 / S0048-9697 (03) 00190-6.

COBOS, R.R. (2016). El polietilén tereftalato (PET) como envase de aguas minerales. *Boletín de la Sociedad Española de Hidrología Médica*. Vol. 31, nº 2, pp.179-190. DOI: 10.23853/bsehm.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen. COI/T.20/doc. nº 14, de 17 de noviembre de 1994.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº 3/Rev. 1. Madrid: COI, diciembre de 2003.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Guía de gestión de la calidad de la industria del aceite de oliva: Las almazaras. T.33/Doc. Nº 2-4. Madrid: COI, 2006.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº 3/Rev. 7.: COI, Mayo de 2013.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Análisis sensorial del aceite de oliva. Método valoración organoléptica del aceite de oliva virgen. COI/T.20/doc. nº 15/rev. 2, septiembre de 2007.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Estudio internacional sobre costes de producción del aceite de oliva Madrid: COI, octubre de 2015. Disponible en web: <http://www.internationaloliveoil.org/documents/index/339-economy/1815-international-olive-oil-production-costs-study/>. [Consultado el 22/05/2019].

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº 3/Rev. 11. Madrid: COI, julio de 2016.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). Norma de comercio aplicado a aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC Nº 3/Rev. 12. Madrid: COI, junio de 2018.

CONSEJO OLÉICOLA INTERNACIONAL (COI). Balances de aceite de oliva. Madrid: COI, 23 de noviembre de 2018. Disponible en web: http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/134-approved-balances?lang=es_ES. [Consultado el 21/05/2019].

CORRALES, I., BARCELÓ, J., BECH, B. AND POSCHENRIEDER, C. (2014). Antimony accumulation and toxicity tolerance mechanisms in *Trifolium* species. *Journal of Geochemical Exploration*. Vol. 147, pp.167–172. DOI: 10.1016/j.gexplo.2014.07.002.

COSSIGNANI, L.; SIMONETTI, M.S.; NERI, A.; DAMIANI, P.(1998). Changes in Olive Oil Composition Due to Microwave Heating. *Journal of American Oil Chemists 'Society*. Vol. 75, n° 8, pp. 931-937. ISSN: 0003-021X (Impresión) 1558-9331 (En línea).

COULTATE, T.P. (2007). *Manual de química y bioquímica de los alimentos*. 3ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. ISBN: 13 9788420010892.

DE ANDRADE, C.K.; DE BRITO, P.M.K.; DOS ANJOS, V.E. (2018). Determination of Cu, Cd, Pb, and Cr in yogurt by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry: a case study for Brazilian yogurt. *Food Chemistry*. Vol. 240, pp. 268-274. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.111.

DE JESUS, A.; DESSUY, M.B.; HUBER, CH.S.; ZMOZINSKI, A.V.; DUARTE, A.T.; VALE, M.G.R.; ANDRADE, J.B. (2016). Determination of antimony in pet containers by direct analysis of solid samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry and leaching studies. *Microchemical Journal*. Vol. 124, pp. 222-227. DOI: 10.1016/j.microc.2015.08.016.

DOUE. DIRECTIVA 78/142/CEE del Consejo, de 30 de enero, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre materiales y objetos que contengan cloruro de vinilo monómero, destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 44/15, de 15 de febrero de 1978.

DOUE. DIRECTIVA 80/590/CEE de la Comisión, de 9 de junio, relativa a la determinación del símbolo que puede acompañar a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE 13/Vol. 11, de 19 de junio de 1980.

DOUE. DIRECTIVA 80/766/CEE de la Comisión, de 8 de julio de 1980, relativa a la determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del contenido de cloruro de vinilo monómero en los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 213/42, de 16 de agosto de 1980.

DOUE. DIRECTIVA 81/432/CEE de la Comisión, de 29 de abril, sobre determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del cloruro de vinilo cedido por los materiales y objetos a los productos alimenticios. DOCE L 167/6, de 24 de junio de 1981.

DOUE. DIRECTIVA 82/711/CEE del Consejo, de 18 de octubre, que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 297/26, de 23 de octubre de 1982.

DOUE. Directiva 84/500/CEE del Consejo, de 15 de octubre, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre objetos de cerámica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 277/12, de 20 de agosto de 1984.

DOUE. Directiva 85/572/CEE del Consejo, de 19 de diciembre, por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. DOCE L 372/14, de 31 de diciembre de 1985.

DOUE. DIRECTIVA 89/109/CEE del Consejo, de 21 de diciembre, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 40/38, de 11 de febrero de 1989.

DOUE. REGLAMENTO (CEE) 2.568/91, de la Comisión, de 11 de julio, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DO L 248, de 5 de septiembre de 1991.

DOUE. REGLAMENTO (CEE) 2.081/92, del Consejo, de 14 de julio, sobre la protección de las indicaciones geográficas y las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. DOCE n° 46, de 20 de febrero de 1999, pp. 13-14.

DOUE. REGLAMENTO (CEE) n° 315/93, del Consejo, de 8 de febrero, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios. DOCE L 37/1, de 13 de febrero de 1993.

DOUE. DIRECTIVA 93/8/CEE de la Comisión, de 15 de marzo, por la que se modifica la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 90/22, de 14 de abril de 1993.

DOUE. Directiva 93/10/CEE de la Comisión, de 15 de marzo, relativa a los materiales y objetos de la película de la celulosa regenerada para entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 93/27, de 14 de abril de 1993.

DOUE. Directiva 93/11/CEE de la Comisión, del 15 de marzo, relativa a la cesión de N-nitrosaminas y de sustancias N-nitrosables por las tetinas y chupetes de elastómeros o caucho. DOCE 93/37, de 17 de abril de 1993.

DOUE. Directiva 93/111/CE de la Comisión, de 10 de diciembre, por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE de la Comisión del 15 de marzo, relativa a los materiales y objetos de la película de la celulosa regenerada para entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE L 310/41, de 14 de diciembre de 1993.

DOUE. DIRECTIVA 97/48/CE de la Comisión, de 29 de julio, por la que se modifica por segunda vez la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a los fines del EEE). DOCE L 222/10, de 12 de agosto de 1997.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 2.815/98 de la Comisión, de 22 de diciembre, relativo a las normas comerciales del aceite de oliva. DOUE L-349, de 24 de diciembre de 1998, pp. 56-64.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 379/1999 de la Comisión, de 19 de febrero, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 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° 46, de 20 de febrero de 1999, p. 15.

DOUE. COM (1999), de la Comisión de las Comunidades Europeas, de 12 de enero de 2000. Libro Blanco sobre seguridad alimentaria, pp. 719-final. Bruselas, 12 de enero de 2000 (Presentado por la Comisión), COM/99/0719-final.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 455/2001 de la Comisión, de 6 de marzo, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 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° 65, de 7 de marzo de 2001, pp. 9-12.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 1.513/2001 del Consejo, de 23 de julio, que modifica el Reglamento n° 136/66/CEE y el Reglamento (CE) n° 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva. DOCE n° 201, de 26 de julio de 2001, pp. 4-7.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DOCE n° 31, de 1 de febrero de 2002, pp. 1-24.

DOUE. DIRECTIVA 2002/16/CE de la Comisión, de 20 de febrero, relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. DOCE n° 51, de 22 de febrero de 2002, pp. 27-31.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 796/2002, de la Comisión, de 6 de mayo, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 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 las notas complementarias que figuran en el anexo del Reglamento (CEE) n° 2.658/87 del Consejo relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común. DOCE n° 128, de 15 de mayo de 2002, pp. 8-28.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 1.019/2002, de la Comisión, de 13 de junio, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. DOCE n° 155, de 14 de junio de 2002, pp. 0027-0031.

DOUE. DIRECTIVA 2002/72/CE DE LA COMISIÓN, de 6 de agosto, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). DOCE 220/18, de 15 de agosto de 2002.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 1.964/2002, de la Comisión, de 4 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1019/2002 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. DOCE nº 300, de 5 de noviembre de 2002, p. 3.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 692/2003, del Consejo, de 8 de abril, por el que se modifica el Reglamento (CEE) 2.081/92, del Consejo, de 14 de julio, sobre la protección de las indicaciones geográficas y las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. DOUE nº 99, de 17 de abril de 2003, pp. 1-7.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 1.176/2003 de la Comisión, de 1 de julio, por el que se modifica el citado Reglamento (CE) 1.019/2002, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. DOCE nº 164, pp. 12-13.

DOUE. REGLAMENTO (CE) nº 1.989/2003 de la Comisión, de 6 de noviembre, que modifica el Reglamento (CEE) nº 2.568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE nº 304, de 21 de noviembre de 2003.

DOUE. DIRECTIVA 2004/1/CE de la Comisión, de 6 de enero, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE en lo relativo a la suspensión de la utilización de la azodicarbonamida como agente expansor. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 7/45, de 13 de enero de 2004.

DOUE. DIRECTIVA 2004/13/CE de la Comisión, de 29 de enero, por la que se modifica la Directiva 2002/16/CE relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 27/46, de 30 de enero de 2004.

DOUE. DIRECTIVA 2004/14/CE, de 29 de enero, por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 27/48, de 30 de enero de 2004.

DOUE. DIRECTIVA 2004/19/CE de la Comisión, de 1 de marzo, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 71/8, de 10 de marzo de 2004.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 852/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. DOUE nº 139, de 30 de abril de 2004, pp. 1-54.

DOUE. REGLAMENTO (CE) nº 1.935/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. DOUE nº 338, de 13 de noviembre de 2004.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 166/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de enero, relativo al establecimiento de un registro europeo de emisiones y transferencias de contaminantes y por el que se modifican las Directivas 91/689/CEE y 96/61/CE del Consejo (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 33/1, de 4 de febrero de 2006.

DOUE. REGLAMENTO 1.881/2006, de 19 de diciembre, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios . DO L 364, de 20 de diciembre de 2006, p. 5.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 2.023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 384/75, de 29 de diciembre de 2006.

DOUE. DIRECTIVA 2007/19/CE de la Comisión, de 30 de marzo, por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 91/17, de 31 de marzo de 2007.

DOUE. DIRECTIVA 2007/19/CE de la Comisión, de 2 de abril, por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 47/50, de 12 de abril de 2007.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 702/2007 de la Comisión, de 21 de junio, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 161, de 22 de junio de 2007, pp. 11-27.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 282/2008 de la Comisión, de 27 de marzo, sobre los materiales y objetos de plástico reciclado destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2023/2006 (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 86/9, de 28 de marzo de 2008.

DOUE. REGLAMENTO (CE) n° 629/2008 de la Comisión, de 2 de julio, que modifica el Reglamento (CE) n o 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 173/6, de 3 de julio de 2008.

DOUE. REGLAMENTO (CE) N° 640/2008 de la Comisión, de 4 de julio, que modifica el Reglamento (CE) n° 2.568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 178, de 5 de julio de 2008.

DOUE. REGLAMENTO (CE) 1.183/2008, de la Comisión, de 28 de noviembre, que modifica el Reglamento (CE) 1.019/2002, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. DOCE n° 319, p. 51.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 12/1, de 15 de enero de 2011.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 61/2011, de la Comisión, de 24 de enero, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 23, de 27 de enero de 2011, pp. 1-2.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 420/2011 de la Comisión, de 29 de abril, que modifica el Reglamento (CE) n° 1.881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DOUE L 111/3, de 30 de abril de 2011.

DOUE. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) n° 29/2012 de la Comisión, de 13 de enero de 2012, sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. DOUE n° 12, de 14 de enero de 2012, pp. 14-21.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 1.183/2012 de la Comisión, de 30 de noviembre, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) no 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 338/11, de 12 de diciembre de 2012.

DOUE. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 299/2013, de la Comisión, de 26 de marzo, que modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 90, de 28 de marzo de 2013, pp. 52-70.

DOUE. REGLAMENTO (UE), N° 1.348/2013 de la Comisión de 16 de diciembre, que modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 338, de 16 de diciembre de 2013.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 1.308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 y (CE) n° 1.234/2007. DOUE L 347, de 20 de diciembre de 2013, pp. 671-854.

DOUE. RECOMENDACIÓN de la Comisión, de 4 de abril, sobre la reducción de la presencia de cadmio en los productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 104/80, de 8 de abril de 2014.

DOUE. REGLAMENTO (UE) N° 488/2014 de la Comisión, de 12 de mayo, que modifica el Reglamento (CE) n° 1.881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 138/75, de 13 de mayo de 2014.

DOUE. RECOMENDACIÓN (UE) 2015/1.381 de la Comisión, de 10 de agosto, sobre el control del arsénico en los alimentos. DOUE L 213/9, de 12 de agosto de 2015.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 2015/1.005 de la Comisión, de 25 de junio, que modifica el Reglamento (CE) n° 1.881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 161/9, de 26 de junio de 2015.

DOUE. REGLAMENTO (UE) 2015/1006 de la Comisión, de 25 de junio, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1.881/2006 en cuanto al contenido máximo de arsénico inorgánico en los productos alimenticios. (Texto pertinente a efectos del EEE). DOUE L 161/14, de 26 de junio de 2015.

DOUE. REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2015/1.830, de la Comisión, de 8 de julio, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE n° 266, de 13 de octubre de 2015, pp. 9-13.

DOUE. REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2016/2.095 de la Comisión, de 26 de septiembre, que modifica el Reglamento (CEE) n° 2.568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. DOUE L 326/1, de 1 de diciembre de 2016.

ESCUDERO, M. J. (2015). *Técnicas de almacén*. 1ª edición. Madrid: Ediciones Paraninfo, S.A. ISBN: 9788497322577.

ESCUDERO, S. (2015) *Protocolo de actuaciones orientado al diseño de marcas y adecuación del producto para su internacionalización*. Tesis del Programa de Doctorado en Diseño, Fabricación y Gestión de Proyectos Industriales. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011). Report of ESCO WG on non-plastic food contact materials. En: *EFSA Supporting Publications*. Vol. 8, n° 7, 139E. DOI: 10.2903 / sp.efsa.2011.EN-139.

EVGENAKIS, E.; CHRISTOPHORIDIS, C.; FYTIANOS, K. (2017). Method optimization for heavy metal determination in milk powder: application to milk samples from Greece. *Environ Sci Pollut Res*. DOI: 10.1007/s11356-017-9863-y.

FAGERBURG, D.R.; CLAUBERG, H.(2003). Fotodegradación de poli (tereftalato de etileno) y poli (etileno / 1,4-ciclohexilendimetileno tereftalato). En: SCHIERS, J.; LONG, T.E. *Modern polyesters, chemistry and technology of polyesters and copolyester*. Edita Wiley - John Schiers y Timothy E Long., cap. 18, p. 609. ISBN: 0-471-49856-4.

FAN Y-Y, ZHENG J-L, REN J-H, CUI X-YI MA AND LENA Q. (2014). Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution*. Vol.192, pp.113-120. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.05.012.

FAO/OMS. Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos. Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. Codex Stan 19-1981. Anteriormente CAC/RS 19-1969. Adoptado en 1981. Revisión: 1987 y 1999. Enmienda: 2009, 2013 y 2015.

FAO/OMS. *Codex Alimentarius*. Normas internacionales de los alimentos. Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. CODEX STAN 33-1981 (anteriormente CAC/RS 33-1970). Roma: 1981 (Revisada en 1989, 2003, 2015 y 2017; y enmendada en 2009 y 2013).

FAO/OMS. *Codex Alimentarius*. Normas internacionales de los alimentos. Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. *Codex Stan* 193-1995. (Adoptada en 1995. Revisión: 1997, 2006, 2008, 2009. Enmienda: 2010, 2012, 2013, 2014, 2015)

FAO/OMS. Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial. Roma (Italia). Cumbre Mundial sobre la alimentación, 13-17 de noviembre de 1996.

FAO/OMS. *Codex Alimentarius*. Normas internacionales de los alimentos. Principios Generales de Higiene de los Alimentos. CAC/RCP 1-1969; REV. 4, 2003.

FAO/OMS. Declaración de la cumbre mundial sobre la seguridad alimentaria. Roma (Italia): Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria, 16-18 de noviembre de 2009.

FAO/OMS. *Codex Alimentarius*. Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius. Vigésima 3ª edición. Roma: Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, 2015. ISBN: 978-92-5-308703-7.

FELLOWS, P.J. (2007). *Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y práctica*. 2ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. ISBN: 978-84-200-1093-9.

FINELLI, L.; LORENZETTI, C.; MESSORI, M.; SISTI, L.; VANNINI, M.J. (2004). Comparison between titanium tetrabutoxide and a new commercial titanium dioxide based catalyst used for the synthesis of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 92, nº 3, pp. 1887-1892. DOI: 10.1002/app.20171.

GACHTER, R.; MULLER, H. (1990). *Manual de aditivos plásticos*. 3ª edición. Suiza: Edita Carl Hanser Verlag GmbH & Co. ISBN: 10 3446156801.

GÓMEZ, A. M. (2015). *Extracción, identificación y cuantificación de la fracción fenólica del AOVE*. En: A. M., GÓMEZ. Simposio científico-técnico de Expoliva. Foro de industria oleícola, Tecnología y calidad (TEC-24). Jaén. ISBN: 978-84-938900-5-6.

GÓMEZ-ESCALONILLA, M.; VIDAL HERNÁNDEZ, J. (2006). *Variedades del Olivar*. 1ª edición. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Hojas divulgadoras (nº 2117HD). ISBN: 84-491-0688-5.

GREIFENSTEIN, M.; WHITE, D.; STUBNER, A.; HOUT, A.; WHELTON, A. (2013). Impact of temperature and storage duration on the chemical and odor quality of military packaged water in polyethylene terephthalate bottles. *Science of the Total Environment*. Vol. 456-457, pp. 376-383. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.092.

GUCLU, G.; YALCINYUVA, T.; ÖZGÜMÜŞ, S.; ORBAY, M. (2003). Hydrolysis of waste polyethylene terephthalate and characterization of products by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*. Vol.404, nº1-2, pp. 193-205. DOI: 10.1016 / S0040-6031 (03) 00160-6.

HANSEN, H.R.; PERGANTIS, S.A. (2006). Detection of antimony species in citrus juices and drinking water stored in PET containers. *Journal of Spectrometry*. Vol. 21, nº 8, pp. 731-733. DOI: 10.1039/b606367e.

HERRANZ, N. (2010). La seguridad y la calidad del producto garantizadas mediante las nuevas tecnologías aplicadas al envase. [www. itene.es](http://www.itene.es).

HERRERA, O. Estructura de flavonoides (figura). En: *ResearchGate*. Disponible en web: https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Estructura-basica-de-flavonoides-y-sistema-de-numeracion-Benitez-2006-Esta_fig3_303960971. [Consultado el 22/01/2019].

HUREIKI, L.; MOUNEIMNE, Y. (2012). Antimony release in PET bottled natural water in Lebanon. *Water Science and Technology: Water Supply*. Vol. 12, nº 2, pp. 193-199. DOI: 10.2166/ws.2012.128.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE (ILSI).(2000). *Packaging Materials: 1. Polyethylene Terephthalate (PET) for Food Packaging Applications*. Brussels: ILSI.

JAENES, M.(2007). Los SIG en la trazabilidad del aceite de oliva: Una propuesta de recurso integrado para la certificación de calidad, control e información. En: M. JAENES. *I Congreso de Cultura del Olivo*. Jaén: Edita Instituto de Estudios Jiennenses, pp. 385-396. ISBN: 978-84-96047-57-0.

JAROSOVÁ, M.; MILDE, N.; KUBA, M. (2014). Elemental analysis of coffee: comparison of ICP-MS and AAS methods. *Czech J. Food Sci*. Vol. 32, nº 4, pp. 354-359. DOI: 10.17221 / 399/2013-CJFS.

JURANOVIC, I.; ZEINER, M.; STEFFAN, I. (2007). Trace elemental characterization of edible oils by ICP–AES and GFAAS. *Microchemical Journal*. Vol. 85, nº 1, pp. 136-139.

KERESZTES, S.; TATÁR, E.; MIHUCZ, V.G.; VIRÁG, I.; MAJDIK, C.; ZÁRAY, G.(2009). Leaching of antimony from polyethylene terephthalate (PET) bottles into mineral water. *The Science of the Total Environment*. Vol. 407, nº16, pp. 4.731-4.735. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.04.025.

KHAN, N.; JEONG, I.S.; HWANG, I.M.; KIM, J.S.; NHO, E.Y.; CHOI, J.Y.; PARK, K.S.; KIM, K.S. (2014). Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*. Vol. 147, pp. 220-224. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2013.09.147.

LAI, H.M.; GREY J.I.; Zabik, M.E. (1995). Evaluación de la extracción en fase sólida y la cromatografía de gases para la determinación de productos de oxidación del colesterol en huevos enteros liados por pulverización. *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 43 , nº 5 , pp. 1122-1126.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M.L.; RUIZ-MEDINA, A. (2011a). Analysis of the legislated metals in different categories of olive and olive-pomace oils. *Food Control*. Vol. 22, pp. 221-225. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.07.002.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M.L.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; RUIZ-MEDINA, A. (2011b). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*. Vol. 127, pp. 1.257-1.262. DOI: 10.1016/foodchem.2011.01.064.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M.L.; RUIZ-MEDINA, A.; ORTEGA-BARRALES, P. (2012). Analysis of 20 trace and minor elements in soy and dairy yogurts by ICP-MS. *Microchemical journal*. Vol. 102, pp. 23-27. DOI: 10.1016/j.microc.2011.11.004.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M.L.; ORTEGA-BARRALES, P.; RUIZ-MEDINA, A. (2014). Quantitation of Metals during the Extraction of Virgin Olive Oil from Olives Using ICP-MS after Microwave-assisted Acid Digestion. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 91 n° 10, pp. 1823-1830. DOI: 10.1007/s11746-014-2511-5.

LÓPEZ, P. (2007). *Interacciones especiales envase-alimento: alta temperatura y envase activo antimicrobiano*. Premio Tesis doctoral del Consejo Económico y Social de Aragón. Consejo Económico y Social de Aragón (CEAS). Zaragoza.

LOZANO, J.; SEGURA, A.; FERNÁNDEZ, A. (2009). Composición del Aceite de Oliva. En: A. FERNÁNDEZ; A. SEGURA. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 13 perspectivas concatenadas*. 1º edición. Málaga: Fundación Unicaja, cap. 7, pp. 197-234. ISBN: 978-84-92526-30-7.

LUCENA, B.; MANRIQUE, T.; MÉNDEZ, M.A. (2017). La Olivicultura en el Mundo y en España. En: D. BARRANCO; R. FERNÁNDEZ-ESCOBAR; L. RALLO. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, cap. 1, pp. 1-33. ISBN: 978-84-8476-714-5.

MALHEIRO, R.; OLIVEIRA, I.; VILAS-BOAS, M.; FALCAO, S.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. (2009). Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology*, Vol 47, n° 1, pp. 92-97. ISSN: 0278-6915.

MARIGHETO, N. A.; KEMSLEY E. K.; DEFERNEZ, M. Y WILSON, R. H.(1998). A Comparison of mid-infrared and Raman spectroscopies for the authentication of edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 75, n° 8, 987-992.

MARINO, O. (2009) Los elementos traza. En: O. MARINO. *Rev. Médica de la Extensión Portuguesa-ULA*, vol. 4, n° 3

MARKWO, A.; ADONGO, A.; EDEM, D.; CARBOO, D.; JUSTICE, F.; DORLEKU, M.; (2017). Migration of inorganic antimony into polyethylene terephthalate bottled water marketed in the Greater Acra Region of Ghana. *Journal of Natural Sciences Research*. Vol. 7, n° 24. ISSN: 2224-3186.

MCNEILL, I.C.; BOUNEKHEL, M. (1991). Estudios de degradación térmica de poliésteres de tereftalato: 1. Poli (alquileno tereftalatos). *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 34, nº 1-3, pp. 187-204. DOI: 10.1016/0141-3910(91)90119-C.

MENDIL, D.; DOGAN, Ö.; TÜZEN, M.; SOYLAC, M. (2008). Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*. Aceptado 11/10/2008.

MERCADOLIBRE. Granulado PET (imagen). Disponible en web https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-563870460-pet-plastico-granulado-virgen-preformas-standar-y-especiales-_JM. [Consultado el 03/07/2019].

MERCK. (2019a). Estructuras de hidrocarburos terpénicos (figura). Disponible en web: <http://www.merckmillipore.com>. [Consultado el 22/01/2019].

MERCK. (2019b). Estructuras de pinosinol-lignanós (figura). Disponible en web: <http://www.merckmillipore.com>. [Consultado el 22/01/2019].

MILLOUR, S.; NOËL, L.; KADAR, A.; CHEKRI, R.; VASTEL, C.; SIROT, V. (2011). Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. *Food Chemistry*. Vol. 126, pp. 1.787-1.799. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.086.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; REJANO-NAVARRO, L.; GANDUL-ROJAS, B.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, A.H.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. 68, nº 5, pp. 332-336.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. (1972). Regiones de la España olivarera (ilustración). En: *El olivar español*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Dirección General de la Producción Agraria. 136 pp.

MOLINA, M. (2017). ¿Qué significa realmente el valor de p?. *Revista Pediatría Atención Primaria*. Vol.19, pp. 377-81. ISSN: 1139-7632.

MOLL, M.; MOLL, N. (2006). *Compendio de riesgos alimentarios*. 1ª edición. Zaragoza (España): Edita Acribia, S.A. ISBN: 978-84-200-1068-7.

MUNCKE, J. (2014). Hazards of food contact material: Food packaging contaminants. *Reference Module in Food Science*. Vol. 2, pp. 430-437.

NACIONES UNIDAS. Sexto Convenio Internacional del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa. TD/OLIVE OIL.11/5. Ginebra: Conferencia Internacional de Comercio y Desarrollo, del 5 al 9 de octubre de 2015. Disponible en web: http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/101-basic-texts?lang=es_ES. [Consultado el 15/05/2019].

NARDI, E.; EVANGELISTA, S.; TORMEN, L.; SAINTPIERRE, T.; CURTIUS, A.; SOUZA, S.; BARBOSA, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*. Vol. 112, pp. 727-732. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.010.

NORDBERG, G.; SUNDERMAN, F.W.(2001). Metales: propiedades y toxicidad. En *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 3ª edición. Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, cap. 63, pp.1-76. ISBN: 84-7434-995-8.

OMC. (2008). Diferencia DS-341-México-Medidas compensatorias definitivas sobre el aceite de oliva procedente de las Comunidades Europeas. Temas comerciales-Solución de diferencias.

ORTEGA, J.A.; FERRÍS I TORTAJADA, J.; ORTÍ, A.; LÓPEZ, J.A.; CÁNOVAS, A.; GARCIA I CASTELL, J.; ALIAGA, J.; ALCÓN, J.J.; BESELER, B.; ANDREU, E.; MOLINI, N.; NAVARRO, I. (2002). *Contaminantes medio-ambientales en la alimentación*. Disponible en web: <http://www.afanion.org/documentos/Contaminantes%20medioambientales%20en%20la%20alimentaci%C3%B3n.pdf> [Consultado el 30/03/2019].

PACHECO DE OLIVEIRA, A. Estructura de α -tocoferol (figura). En: *Ifoescuela. Navegando e aprendiendo*. Disponible en web: <https://www.infoescuela.com/bioquimica/vitamina-e/>. [Consultado el 22/01/2019].

PANG, K.; KOTEK, R.; TONELLI, A. (2006) Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. *Progress Polymer Science*. Vol. 31, nº11, pp. 1.009-1.037. DOI: 10.1016 / j.progpolymsci.2006.08.008.

PARRAS, M.; MOYA, M.; GALLEGO, S.; VILAR, J.; CÁRDENAS, R. (2013). *El Sector de Elaboración de aceite de oliva, un estudio multidisciplinar*. 1ª edición. Úbeda: Edita Centro Internacional de Excelencia para Aceite de Oliva de GEA Westfalia Separator Ibérica S.A. ISBN: 978-84-616-3992-2.

PAYÁN, L.; POYATOS, M.T.; MUÑOZ, L.; LA RUBIA, M.D.; PACHECO, .R.; RAMOS, N. (2017). Study of the influence of storage conditions on the quality and migration levels of antimony in polyethylene terephthalate-bottled water. *Food Science and Technology International*. Vol. 23, nº 4, pp. 318–327. DOI: 10.1177 / 1082013217690300.

PEHLIVAN, E.; ARSLAN, G.; GODE, F.; ALTUN, T.; MUSA, M. (2008). Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Grasas y Aceites*. Vol. 59, nº 3, pp 239-244. ISSN: 0017 3495.

PIERALISI GRUPPO. Pionalisi “Bravo” (fotografía). Pionalisi España S.L. Disponible en web: http://www.pionalisi.com/arg/Viewdoc?co_id=411. [Consultado el 10/02/2019].

PIRES, H.M.; MENDES, L.C.; LESTARI, S.P.; RODRÍGUEZ, V.J. (2015). Effect of weahering and accelearted photoaging on PET/PC (80 wt/wt%) melt extruded blend. *Material Research*. Vol. 18, nº 4.

POTORTI, A.; DI BELLA, G.; LO TURCO, V.; RANDO, R.; DUGO, G. (2013). Non-toxic and potentially toxic elements in italian donkey milk by ICP-MS and multivariate analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 31, pp. 161-172. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.05.006.

PUERTA de la, C.; BORRERO, L.; FLORES, V. (1972). *El olivar español*. Madrid: Ministerio de Agricultura-Dirección General de la Producción Agraria.

QUIRANTES, R.; DOMÍNGUEZ, J.J.; SEGURA, A.; FERNÁNDEZ, A. (2009). Técnicas de análisis del aceite de oliva. En: A. FERNÁNDEZ; A. SEGURA. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 13 perspectivas concatenadas*. 1º edición. Málaga: Fundación Unicaja, cap. 9, pp. 247-285. ISBN: 978-84-92526-30-7.

RAE. Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua. Disponible en web: <https://dle.rae.es>. [Consultado el 17/02/2019].

RAJAKUMAR, K.; SARASVANTHY, V.; THANARAI, A.; CHITRA, R.; VIJAYAKUMAR, C.T. (2011). *Effect of Iron Carboxylates on the photodegradability of Polypropylene. I. Natural Weathering Studies*. Journal of Applied Polymer Science. Vol. 123, nº 5, pp. 2.968-2.976. DOI: 10.1002/app.34946.

RALLO, L.. *El reto de adaptarse a los sistemas de plantación (fotografía)*. En: artículo “Nuevas variedades de olivo”. Sección: La Opinión Invitada. Diario de Sevilla. Edición de 20 de enero de 2019. Disponible en web https://www.diariodesevilla.es/agr_andalucia/Nuevas-variedades-olivo_0_1182481752.html. [Consultado el 02/05/2019].

REIMANN, C.; BIRKE, M.; FILZMOSER, P. (2012). Temperature-dependent leaching of chemical elements from mineral water bottle materials. *Applied Geochemistry*. Vol. 27, nº 8, pp. 1.492-1.498. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2012.05.003.

RICHARDSON, A.J.; LOKENSGARD, E. (2000). *Industria del plástico. Plástico industrial*. 1º edición. Madrid: Paraninfo. ISBN: 9788428325691.

ROWELL, C.; KUIPER, N.; PREUD'HOMME, H. (2016). Is container type the biggest predictor of trace element and BPA leaching from drinking water bottles?. *Food Chemistry*. Vol. 202, pp. 88-93.

RUNGCHANG, S.; NUMTHUAM, S.; QIU, X.; LI, Y.; SATAKE, T. (2013). Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages. *Journal of Food Engineering*. Vol. 115, pp. 322–329. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.10.025.

SÁNCHEZ –MARTÍNEZ, M.; PÉREZ-CORONA, T.; CÁMARA, C.; MADRID, Y. (2013). Migration of antimony from PET containers into regulated EU food simulants. *Food Chemistry*. Vol. 141, pp 816-822. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.067.

SENSAOVE. Olivar intensivo – Olivar extensivo (fotografías). En: Qué hacemos-Olivicultura. Disponible en web <http://sensaove.com/que-hacemos/olivicultura/>. [Consultado el 12/12/2018].

SERRANO, L.; LEZCANO, C. El aceite: valor nutritivo. En: J.R. MARTÍNEZ; A. VILLARINO; L. SERRANO; C. LEZCANO; R. URRIALDES; FCO. J. SÁNCHEZ; M. J. CASTRO; M. J. CAO. (2005). *El Aceite de oliva y la dieta mediterránea. Colección Nutrición y Salud, n° 7*. 1ª edición. Madrid: Edita Consejería de Sanidad y Consumo-Comunidad de Madrid. D.L.: M-8.347-2005.

SHOTYK, W.; KRACHLER, M.; CHEN B. (2006). Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers. *Journal of Environmental Monitoring*. Vol. 8, n° 2, pp. 288-292. ISSN: 1464-0325.

SHOTYK, W.; KRACHLER, M. (2007). Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage. *Environmental Science & Technology*. Vol. 41, pp. 1.560-1.563. DOI: 10.1021/es061511+.

STUART, B.(2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 1ª edición. Hoboken, NJ (EEUU): John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-85428-0.

SUPLEMENTACIÓNACTIVA (BLOGSPOT). Estructura de la luteína, carotenoide principal (figura). Disponible en web: <http://suplementacionactiva.blogspot.com/2013/11/luteina-protector-ocular.html>. [Consultado el 22/01/2019].

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M. (2013). Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*. Vol. 141, pp. 3.466-3.472. DOI: 10.1016/foodchem.2013.06.067.

TÉLLEZ, C.A.; HOLLAUER, E.; MONDRAGÓN, M.A.; CASTAÑO, V.M. (2001). Espectros infrarrojo y raman de transformada de Fourier, asignación vibracional y cálculos ab initio de ácido tereftálico y compuestos relacionados. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. Vol. 57-A, pp. 993-1.007. DOI: 10.1016 / S0032-3861 (01) 00775-3.

THIELE U. (2004). Quo vadis polyester catalyst?. *Chemical Fibers International*. Vol. 54, n° 3, pp. 162-163. ISSN: 1.434-3.584.

THOMAS, R. (2008). *Practical Guide to ICP-MS. A Tutorial for Beginners*. 2ª edición. Gaithersburg, Maryland: (Practical Spectroscopy a series) Scientific Writing Solutions.

TIAGO, J.; SANTOS, C.; PERALVA, V.; FLORES, E.; KORN, M.; NÓBREGA, J.; KORN, M.G. (2014). Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry*. Aceptado 16/11/2014.

TORMEN, L.; PLACIDO, D.; DITTERT, I.M.; ARAÚJO, R.; FRESCURA, V.; CURTIUS, A.J. (2011). Rapid assessment of metal contamination in comercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 24, pp. 95-102. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.06.004.

TOUS, J.; ROMERO, A.; PLANA, J.; GUERRERO, L.; DÍAZ, I.; HERMOSO, J.F. (1997). Características químico-sensoriales de los aceites de oliva "Arbequina" obtenidas en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*. Vol. 48, fasc. 6, pp. 415-424. ISSN: 0017-3495.

TUKUR, A.; SHARP, L.; STERN, B.; TIZAOUI, C.; BENKREIRA, H. (2012). PET bottle use patterns and antimony migration into bottled water and soft drinks: the case of British and Nigerian bottles. *Journal of Environmental Monitoring*. Vol. 14, pp. 1.237-1.247. ISSN: 1464-0325.

UCEDA, M.; AGUILERA, M.P.; BELTRÁN, G.; JIMÉNEZ, A. (2000). *Aceites de Oliva Vírgenes Extra. Calidad y Diversidad*. 1ª edición. Zaragoza: Edita PROEDI SL- CIFA Venta del Llano-Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. ISBN: 8489640-10-6.

UCEDA, M.; PAZ AGUILERA, M. P.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G. (2009). Variedades de olivo y aceituna. Tipos de aceites. En: A. FERNÁNDEZ; A. SEGURA. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía, 13 perspectivas concatenadas*. 1º edición. Málaga: Fundación Unicaja, cap. 4, pp. 107-137. ISBN: 978-84-92526-30-7.

ULRICH K., THIELE. (2001). El estado actual de la catálisis y el desarrollo de catalizadores para el proceso industrial de policondensación de poli (terefalato de etileno). *Revista Internacional de Materiales Poliméricos y Biomateriales Poliméricos*. Vol. 50, Nº 3-4. DOI: 10.1080/00914030108035115.

UNE - ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN. UNE 87-004-79. Comité CTN 87 - ANÁLISIS SENSORIAL. Relación internacional ISO/TC 34/SC 12 - Análisis sensorial.

UNE- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN. UNE-ISO 690. Directrices para la redacción de referencias bibliográficas y de citas de recursos de información. AENOR, mayo de 2013.

UNE- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN. UNE-ISO 690-2. Información y Documentación. Referencias bibliográficas. Parte 2. Documentos electrónicos y partes de los mismos.

VALLE, P.; LUCAS, B. (2000). *Toxicología de Alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. Mexico D.F. Disponible en web: <http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf>. [Consultado el 17/02/2019].

VÁZQUEZ RONCERO, A.; JANER DEL VALLE, C.; JANER DEL VALLE, M. L. (1973). Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*. Vol. 24, nº 6, pp. 350-357. ISSN: 0017-3495.

VENKATACHALAM, S.; NAYAK S. G.; LABDE, J.V.; GHARAL, P.R.; RAO, K.; KELKAR, A.K. (2012). *Degradation and Recyclability of Poly (Ethylene Terephthalate)*. *IntechOpen*. Cap. 4, pp. 75-98. DOI: 10.5772 / 48612.

VOM BRUCK, C.G.; FIGGE, K.; RUDOLPH, F. (1981). Interaction of fat-containing food with plastics packaging. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 58, nº8, pp. 811-815.

WELLE, F.; FRANZ, R. (2011). Migration of antimony from PET bottles into beverages: Determination of the activation energy of diffusion and migration modelling compared with literature data. *Food Additives & Contaminants*. Vol. 28, nº 1, pp.115-126.

WESTERHOFF P., PRAPAIPONG P., SHOCK E., HILLAIREAU A. (2008). Antimony leaching from PET plastic used for bottled drinking water. *Water Research*. Vol. 42, pp. 551-556. DOI: 10.1016 / j.watres.2007.07.048.

WIKIPEDIA. Estructuras de hidroxitirosol, ácidos fenólicos y secoiridoides (figuras). Disponible en web: <https://es.wikipedia.org>. [Consultado el 22/01/2019].

YAHIA, E.M. Estructura de las clorofilas (figura). En: *ResearchGate*. Disponible en web: https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-7-ESTRUCTURA-QUIMICA-DE-LASCLOROFILAS-A-Y-B_fig5_277891626. [Consultado el 22/01/2019].

YAHYAOUI, A.; RIGANE, G.; SALEM, R.B. (2014). Microwave heating of different commercial Tunisian olive oil: regarding to exposure times on physical and chemical parameters properties. *Biochemistry and Physiology*. Vol. 3, artículo 131. DOI:10.4172/2168-9652.1000131.

ZAMUDIO, A.; CASTRO, E.; NIETO, A.; DÍAZ-MORENO, D. (2016). Determinación de metales tóxicos en miel de abejas mediante digestión ácida vía microondas. *Agronomía Colombiana*. Vol. 34 (supl.), pp. 1.308-1.311. DOI: 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58519.

ZEFIRO-JAPAN. *España cuenta principalmente con 18 variedades de aceitunas* (fotografía). En: Tipos de olivos y aceitunas. Disponible en web <https://zefiro-japan.com/tipos-olivo-aceitunas/>. [Consultado el 12/02/2019].

ZHONG, W.; REN, T.; ZHAO, L. (2016). Determinación de Pb, Cd, Cr, Cu y Ni en té chino con espectrometría de absorción atómica de horno de grafito de fuente continua de alta resolución. *Science Direct*. Vol. 24, pp. 46-55. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.04.010.

ZHU, F.; FAN, W.; WANG, X.; QU, L.; YAO, S. (2011). Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 49, pp. 3.081–3.085. DOI: 10.1016/j.fct.2011.09.019.

9. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

9.1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

ESCUDERO, A.; RAMOS, N.; LA RUBIA, M.D.; PACHECO, R. Influence of Extreme Storage Conditions on Extra Virgin Olive Oil Parameters: Traceability Study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2016, volumen 2016, artículo ID 7506807, 10 páginas. Disponible en web <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7506807>



Research Article

Influence of Extreme Storage Conditions on Extra Virgin Olive Oil Parameters: Traceability Study

Alfredo Escudero,¹ Natividad Ramos,¹ M. Dolores La Rubia,² and Rafael Pacheco²

¹Physical and Analytical Chemistry Department, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

²Chemical, Environmental and Materials Engineering Department, University of Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

Correspondence should be addressed to Natividad Ramos; nramos@ujaen.es

Received 20 July 2016; Revised 7 October 2016; Accepted 2 November 2016

Academic Editor: Vito Verardo

Copyright © 2016 Alfredo Escudero et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study reflects the effect of extreme storage conditions on several extra virgin olive oil (EVOO) varieties (arbequina, hojiblanca, and picual). The conditions were simulated in the laboratory, by means of heating treatments in stove at different temperatures (40 and 60°C) and times (two and three weeks). The aim is the evaluation of the deterioration of the quality parameters and minority components, which are responsible for the nutritional and therapeutic properties (fatty acids, polyphenols, pigments, and tocopherols), and organoleptic qualities. The quality criteria and limits used in this work are according to International Olive Council. The results contribute to the control of the traceability for the commercialization of the EVOO.

1. Introduction

Actually, consumers and public authorities consider food safety and quality a fundamental priority because they are closely connected with the health of consumers.

Therefore, to guarantee the food safety, the policies must be based on a global and integrated approach of every link in the food chain (traceability), since all of them affect the innocuousness and the quality of the food. Likewise, the conservation and manipulation by the consumer are intimately related to the food safety, for which it is a fundamental aspect to know in which conditions the food will be altered as a consequence of the influence of different physical or chemical factors or environmental conditions.

The Regulation (EC) number 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs [1] states the need of working under a self-checking system to ensure food safety throughout the food chain. The olive oil elaboration presents multiple risk steps that can concern its qualities and the food safety. The identification of any hazards and the application of preventive measures are crucial to obtain a safe final product with high quality. At the same time it is necessary to consider the

Spanish Law 12/2013 of 2 August which gives measures to improve the functioning of the food chain [2].

The virgin olive oil is the only cooking oil that is made without the use of chemicals and industrial refining and its consumption in countries outside Mediterranean area is quickly rising. The main reasons are its sensory, antioxidant, and therapeutics properties derived from components and especially from the minor ones, as polyphenols and tocopherols, with antioxidant properties, which prevent cancer and degenerative diseases [3–6]. The health benefits of olive oil are unrivaled, and research reveals more benefits nearly every day. However, over time, oil deteriorates and its properties are altered or modified, in particular if they are used under thermal conditions which affect its stability and quality.

Every stage of the olive oil elaboration affects the organoleptic characteristics (flavor, smell, etc.) and the quality of the oil, specially of the virgin olive oil (VOO) and extra virgin olive oil (EVOO), growth, plant health, phytosanitary treatments, harvest and transport, storage, or paste preparation. During the storage and transport the VOOs and EVOOs are affected by unstable temperatures over time which alter the oil quality as a consequence of the degradation of some components.

Different papers considered the evolution of the quality parameters and the VOOs self-life during storage periods between 12 and 24 months in oil mill storage tanks [7], in bottles [8–11], in tin containers [12], in commercial conditions [13], and in home conditions [14]. The results of these studies have contributed to a better understanding of the chemical oxidation process, but they were inconclusive.

In the last decade the VOO quality prediction and the evolution of the antioxidant components during storage are themes of great interest. Several authors have analyzed the alteration of the fatty acid composition, minor components, and antioxidant activity during storage [5, 15–17]. The latter authors reported the evolution of major and minor components and oxidation indices of seven VOO samples, which differed in their initial contents of natural antioxidants significantly, during 21 months of storage at room and in darkness. The correlation between the initial composition and time to reach the upper limits established by EU Regulation is also reported.

Morelló et al. [18] observed a great decrease in the minor components in particular for the phenolic fraction and pigments while the oleic acid percentage increases in commercial arbequina VOO after 12 months at room temperature. Also, the influence of the VOO elaboration methods on the quality parameters during 18 months of storage has been studied [19]. Other research studies evaluate the oxidative capacity of the VOO under high temperature accelerated storage conditions (50°C during 8 months) [20].

In recent years, several authors [21–23] have reported results of different olive oil varieties under storage conditions between +4°C and –20°C during 12 months. The quality of the VOO remains better at low temperatures, the phenolic content decreased slightly, and the volatile compounds were unaltered. Low temperatures preserve the organoleptic properties of a fresh oil better than room temperatures.

Mulinacci et al. [24] compared the effect of a long storage period on EVOO at –23°C with the same specimens at room temperature in dark. The evolution of the phenolic composition and aromatic profile were monitored during 18 months. Increments of the phenolic composition were observed for oils stored at room temperature starting from 3 months of storage, and the frozen oils showed negligible differences in aromatic profile until 12 months of storage.

The influence of storage conditions and packing materials (clear PET, can, glass, and tetrabrick) on olive oil quality has been considered in different papers [25–30].

The tetrabrick packing preserves the original olive oil quality better than PET and glass which were responsible for a decrease of the quality parameters and minor components (pigments and tocopherols). This reveals the influence of the packing materials on the protection and quality of the olive oil.

Finally, the influence of the temperature on the vegetable oils during thermal treatment (simulating cooking) and its influence on the physical-chemical parameters have been also studied [31–33]. The studied oils were VOO, EVOO, sunflower oil (refined and high oleic content), peanut oil, and cottonseed oil and a microwave oven was used as energy

source. A conventional oven was also used by some authors in order to compare results [34–37].

Therefore, as there has been little knowledge about the influence of high temperatures on the quality parameters and minor components of the EVOOs, in this research the long term storage at high temperatures is simulated. The objective of this study is to simulate inappropriate transport and storage conditions which affect the EVOO quality and could alter its “extra” denomination and evaluate the physical-chemical and sensorial properties of the EVOO under these conditions.

For these purposes, four extra virgin olive oils (picual (two brands), arbequina, and hojiblanca) from Jaén (Spain) were investigated. The accelerated assays were carried out in a laboratory oven at high temperatures and time simulating several transport or storage conditions in Andalusia region or areas with similar climatology where the temperatures in summer seasons are high.

In addition, the interest of this paper lies in the fact that the VOO export is increasing strongly and the influence of the long term transport and storage conditions has not been studied. The results will improve international transport conditions in terms of length, in order to guarantee the original characteristics in destination and to comply with the Food Safety Regulations.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of the Samples. Commercial samples of EVOO of the varieties: picual (two brands A and B), arbequina, and hojiblanca of the crop, in season 2012–2013 were collected from Andalusia. All the samples, bottled in clear PET, were purchased from local stores and oil mills. The olive oil samples were stored correctly up to the beginning of the experimental procedure.

Four studies were carried out: storage in a Mecánicas Científicas S.A. oven with air flow from the external environment at 40°C during two and three weeks (treatment T1 and treatment T2) and 60°C during two and three weeks (treatment T3 and treatment T4). After each treatment the samples were coded, placed in amber glass, and frozen until analysis. All the measurements were made in triplicate.

2.2. Quality Parameters. The quality parameters were determined according to the analytical methods described in the COI/T.15/NC number 3/Rev. 7 May of 2013 and (UE) 2015/1830 Regulation of the Commission 8 of July of 2015 [38, 39].

The content of free fatty acids is expressed as acidity calculated conventionally. For this determination 20 g of oil is dissolved in 50 mL of the previously neutralized mixture of ethanol-ether (1:1 v/v). The sample is titrated with potassium hydroxide using phenolphthalein as indicator. The acidity is expressed as percentage of oleic acid.

Peroxide value (PV) was expressed as milliequivalent of active oxygen per kilogram of oil. 1.2–2.0 g of oil was dissolved in a mixture of chloroform and acetic acid (2:3 v/v). Then 1 mL of KI saturated solution was added and 75 mL of deionized water was also added after stirring and 5 min in darkness. Finally the sample is titrated with sodium thiosulphate and starch solution as indicator.

TABLE I: Quality parameters.

	Control sample	T1	T2	T3	T4
<i>Picual A</i>					
Acidity grade	0.090 ± 0.001	0.140 ± 0.001	0.180 ± 0.002	0.130 ± 0.001	0.130 ± 0.001
K_{232}	1.77 ± 0.05	1.66 ± 0.01	1.74 ± 0.01	1.84 ± 0.02	1.71 ± 0.01
<i>Picual B</i>					
Acidity grade	0.110 ± 0.001	0.140 ± 0.002	0.110 ± 0.001	0.110 ± 0.001	0.110 ± 0.002
K_{232}	1.89 ± 0.04	1.79 ± 0.06	1.80 ± 0.02	1.88 ± 0.07	1.97 ± 0.06
<i>Arbequina</i>					
Acidity grade	0.060 ± 0.003	0.080 ± 0.001	0.090 ± 0.001	0.080 ± 0.002	0.090 ± 0.003
K_{232}	0.93 ± 0.01	0.96 ± 0.04	0.98 ± 0.01	0.94 ± 0.01	2.15 ± 0.02
<i>Hojiblanca</i>					
Acidity grade	0.030 ± 0.002	0.100 ± 0.004	0.090 ± 0.003	0.080 ± 0.002	0.080 ± 0.002
K_{232}	0.72 ± 0.03	0.73 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.72 ± 0.03	1.84 ± 0.05

Results expressed as mean value ± typical deviation.

K_{232} and K_{268} extinction coefficients were calculated by spectrophotometric examination in the ultraviolet. 100 mg of oil was dissolved in 25 mL of isooctane and the extinction of the solution is then determined at the specified wavelengths with reference to pure solvent. Specific extinctions are calculated from the spectrophotometer readings (Varian Cary 4000) using a quartz cell with a 1 cm optical path.

The testing panel of The Technological Center of the Olive Grove and Olive Oil (CITOLIVA) carried out the sensory characterization and linked the flavor stimuli of the EVOOs with a numeric scale according to the analytical methods described in the European Commission Regulation number 2568/91 and subsequent amendments (number 1348/2013) [39].

2.3. Purity Parameters. The gas chromatography (GC) is the analytical technique used to determine the qualitative and quantitative fatty acid methyl-esters composition [39]. The samples were prepared by shaking a solution of oil in heptane (0.1 g in 2 mL) with 0.2 mL of 2 N methanolic potassium hydroxide stirred during 30 seconds. The methyl-esters were analyzed from the supernatant solution by gases chromatographer Shimadzu GC-2014AF/SP. The oven temperature was set at 185°C, and the injector and detector temperatures were set at 220°C. The chromatograms were read in ascending order of number of carbons and unsaturations.

2.4. Minor Components. The tocopherols were evaluated by HPLC following the method described by Cunha et al. [40] on a Shimadzu HPLC mod. Prominence serie 20. A Sigma-Aldrich (250 mg/L) α -tocopherol in acetonitrile was frozen at -20°C until being used as internal pattern. 0.2 g of oil was dissolved in 10 mL of n-hexane and 20 μ L of sample was analyzed. As mobile phase hexane was used: isopropanol (97:3 v/v) in isocratic conditions and 1 mL/min of flow rate. The chromatograms were recorded at 275 nm. The results are expressed as mg of α -tocopherol per oil kg.

Chlorophyll and carotenoids compounds were determined at 472 and 670 nm (maximum absorption wavelength of pheophytin and lutein) in cyclohexane by the method of

Mínguez [41], by a Varian Cary 4000 spectrophotometer. The chlorophyll and carotenoid concentration was expressed as milligrams of pigment per kilogram of oil.

The total polyphenols were determined following the method described by Vázquez-Roncero et al. [42], using the Folin-Ciocalteu reagent. The olive oil sample was dissolved in hexane and the phenolic compounds were extracted by triple extraction by methanol: water (60:40 v/v), by decantation. A mixture of 5 mL of polyphenols extract was mixed in 35 mL of water and 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was homogenized by agitation and finally 5 mL of Na_2CO_3 saturated was added. The absorption of the solution was measured at 725 nm. Results were given as mg/kg of caffeic acid.

2.5. Statistical Analysis. The multifactorial analysis of variance (ANOVA) was performed using Statgraphics Centurion software. This analysis is designed to build a statistical model describing the impact of two or more categorical factors of a dependent variable. Tests were done to find out any significant differences between the media values and any interactions between the factors. The ANOVA table shows the decomposition of the variability of the measurable parameter in contributions of different factors. As the sum of the squares (type III) was selected, the interaction of each factor is determined eliminating the other factors' effects. The values of *P* indicate the statistical significance of each factor.

3. Results and Discussion

Three monovarietal extra virgin olive oils have been studied in this research, arbequina, picual (two brands A and B), and hojiblanca, making a total of four EVOOs. This section describes the results obtained and discusses the influence of the experimental conditions on the quality parameter and minor components of the EVOOs.

Tables 1 and 2 show the values of the quality parameters and minor components of each sample of extra virgin olive oil at the beginning of the assay (control sample) and after each treatment (T1 to T4).

TABLE 2: Fatty acid composition.

	Control sample	T1	T2	T3	T4
<i>Picual A</i>					
C16:0	10.52 ± 0.12	10.41 ± 0.04	10.38 ± 0.05	10.36 ± 0.35	10.43 ± 0.41
C16:1	0.81 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.03	0.80 ± 0.01
C17:0	0.050 ± 0.007	0.050 ± 0.003	0.050 ± 0.004	0.050 ± 0.006	0.050 ± 0.006
C17:1	0.090 ± 0.001	0.090 ± 0.003	0.100 ± 0.001	0.100 ± 0.001	0.090 ± 0.001
C18:0	3.40 ± 0.03	3.30 ± 0.05	3.24 ± 0.02	3.23 ± 0.04	3.33 ± 0.02
C18:1	80.47 ± 0.45	80.01 ± 0.08	80.05 ± 0.09	80.20 ± 0.17	79.98 ± 0.08
C18:2	4.06 ± 0.03	4.08 ± 0.03	4.04 ± 0.01	4.04 ± 0.03	4.02 ± 0.01
C20:0	0.620 ± 0.023	0.640 ± 0.003	0.660 ± 0.002	0.650 ± 0.005	0.640 ± 0.001
C20:1	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.04
C18:3	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.03
<i>Picual B</i>					
C16:0	10.92 ± 0.05	10.73 ± 0.09	10.41 ± 0.22	10.60 ± 0.16	6.01 ± 0.02
C16:1	0.90 ± 0.01	0.89 ± 0.07	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.47 ± 0.42
C17:0	0.060 ± 0.005	0.040 ± 0.003	0.040 ± 0.001	0.050 ± 0.001	0.040 ± 0.007
C17:1	0.090 ± 0.003	0.130 ± 0.039	0.090 ± 0.004	0.080 ± 0.001	0.090 ± 0.004
C18:0	3.11 ± 0.02	3.08 ± 0.04	2.90 ± 0.04	3.03 ± 0.06	3.33 ± 0.21
C18:1	80.14 ± 0.080	80.39 ± 0.082	80.89 ± 0.232	80.57 ± 0.230	85.09 ± 4.956
C18:2	3.44 ± 0.09	3.43 ± 0.02	3.47 ± 0.03	3.44 ± 0.06	3.60 ± 0.20
C20:0	0.660 ± 0.007	0.660 ± 0.003	0.670 ± 0.011	0.670 ± 0.003	0.70 ± 0.041
C20:1	0.410 ± 0.001	0.400 ± 0.002	0.380 ± 0.004	0.410 ± 0.008	0.420 ± 0.028
C18:3	0.280 ± 0.018	0.260 ± 0.005	0.250 ± 0.001	0.270 ± 0.001	0.270 ± 0.015
<i>Arbequina</i>					
C16:0	11.45 ± 0.02	11.06 ± 0.24	10.80 ± 0.51	11.31 ± 0.05	12.06 ± 0.07
C16:1	1.38 ± 0.07	1.44 ± 0.07	1.42 ± 0.02	1.43 ± 0.07	1.40 ± 0.01
C17:0	0.130 ± 0.010	0.120 ± 0.003	0.130 ± 0.001	0.120 ± 0.009	0.130 ± 0.001
C17:1	0.280 ± 0.009	0.260 ± 0.008	0.270 ± 0.001	0.270 ± 0.001	0.270 ± 0.002
C18:0	1.95 ± 0.04	2.03 ± 0.06	2.03 ± 0.01	2.06 ± 0.07	2.07 ± 0.04
C18:1	74.13 ± 0.02	74.43 ± 0.17	74.64 ± 0.34	74.18 ± 0.04	73.62 ± 0.06
C18:2	9.02 ± 0.07	9.10 ± 0.04	9.12 ± 0.10	9.00 ± 0.04	8.88 ± 0.07
C20:0	0.690 ± 0.014	0.650 ± 0.005	0.640 ± 0.002	0.670 ± 0.032	0.630 ± 0.002
C20:1	0.410 ± 0.015	0.410 ± 0.002	0.430 ± 0.020	0.440 ± 0.018	0.420 ± 0.001
C18:3	0.350 ± 0.020	0.370 ± 0.020	0.370 ± 0.010	0.360 ± 0.016	0.360 ± 0.002
<i>Hojiblanca</i>					
C16:0	9.93 ± 0.02	8.72 ± 0.01	10.12 ± 0.06	10.47 ± 0.08	10.44 ± 0.04
C16:1	0.820 ± 0.001	0.850 ± 0.008	0.850 ± 0.007	0.820 ± 0.006	0.820 ± 0.006
C17:0	0.100 ± 0.002	0.100 ± 0.001	0.100 ± 0.002	0.110 ± 0.002	0.450 ± 0.002
C17:1	0.570 ± 0.003	0.180 ± 0.003	0.170 ± 0.001	0.170 ± 0.001	0.240 ± 0.004
C18:0	3.18 ± 0.05	3.03 ± 0.01	3.08 ± 0.02	3.32 ± 0.01	3.31 ± 0.02
C18:1	77.25 ± 0.07	78.82 ± 0.06	77.63 ± 0.03	77.14 ± 0.07	76.82 ± 0.32
C18:2	6.58 ± 0.04	6.78 ± 0.01	6.56 ± 0.05	6.48 ± 0.02	6.45 ± 0.02
C20:0	0.760 ± 0.005	0.780 ± 0.003	0.760 ± 0.001	0.750 ± 0.003	0.730 ± 0.001
C20:1	0.430 ± 0.003	0.420 ± 0.004	0.420 ± 0.001	0.440 ± 0.001	0.430 ± 0.006
C18:3	0.300 ± 0.003	0.310 ± 0.008	0.300 ± 0.007	0.300 ± 0.000	0.310 ± 0.008

3.1. *Acidity.* The acidity of the arbequina and hojiblanca EVOO control samples was lower than the fixed limit by the European and International Regulations, while, for both picual brands (A and B), the acidity values were slightly higher, 0.09 and 0.11, respectively.

As can be seen, the initial acidity grade of the arbequina and hojiblanca olive oils was unaltered after the heating treatment, and their values ranged from 0.08 to 0.09. According to this parameter these samples preserve the extra virgin olive oil category. However, the samples of picual variety changed

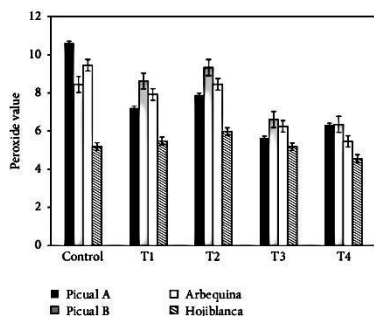


FIGURE 1: Influence of the heating treatments on the peroxide value of the olive oils.

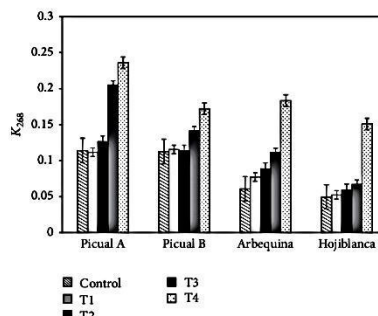


FIGURE 2: Variation of K_{268} with the treatments.

their designation to “virgin” due to an increase of the AG of 0.13 and 0.14, respectively.

This trend has been also noted by other authors who studied the olive oil stability after heating with different exposure times in microwave and conventional oven [34, 43–46].

The results indicate that the treatment at 40°C produces the largest increase of the acidity with increases of 86%, while treatment at 60°C during two and three weeks causes an increase of 67% and 64%, respectively. The acidity of the arbequina variety olive oil is the least affected with the treatment, two of the samples are unaffected, and the rest shows an acidity increase of 15% in comparison to 54% of the picual variety brand B, 37% of picual variety brand A, and 204% of hojiblanca variety.

3.2. Peroxide Value (PV). According to the current legislation, at the beginning of the storage the oil samples had low levels of PV and fall into the extra virgin olive oil category. These initial peroxide values were 10.60 picual A, 8.44 picual B, 5.19 hojiblanca, and 9.44 arbequina (Table 1).

A significant decrease in PV occurred in the picual and arbequina samples after the treatment with a decrease of 20–30%. However no significant changes were observed for the hojiblanca variety samples. These results confirm that all the olive oil varieties studied preserve their extra virgin olive oil category after the time-temperature treatments.

Figure 1 shows that the treatment at 60°C causes the greatest impact in the PV decreasing the PV levels in all the olive oil samples studied.

Comparing the results with other authors who use different energy sources [37], no significant changes in PV with time are observed in microwave heating while PV decreases are detected after heating in conventional oven or frying (about 50%).

However, there is no consensus in literature about the PV evolution of olive oils after heating treatments. Albi et al. [34] reported a slight increase of the PV of the extra virgin olive

oil after 120 min of microwave heating at 170°C while this parameter decreases in a virgin olive oil after being exposed to the same conditions. Cossignani et al. [31] also noted an increase of the PV of the extra virgin olive oil after a microwave heating of 8 minutes.

The behavior of the PV could be explained by the evolution of the oxidation process, the PV increase is caused by the hydroperoxide formation, and the appearance of secondary oxidation products reduces the PV.

3.3. K_{232} and K_{268} Extinction Coefficients. The UV spectrophotometric study provides information about the degree of olive oil oxidation and therefore its quality [38]. The K_{232} extinction coefficients indicate the conjugation of dienes formation of the polyunsaturated fatty acids (primary oxidation), while the K_{268} extinction coefficients are indicators of the presence of secondary oxidation products, including conjugated trienes and carbonyl compounds.

The maximum values permitted for K_{232} and K_{268} are, respectively, 2.50 and 0.22 for extra virgin olive oils and 2.60 and 0.25 for virgin olive oil, respectively.

Table 1 and Figure 2 show the K_{232} and K_{268} extinction coefficient evolution with the heating treatment.

All the olive oil samples presented K_{232} and K_{268} values lower than the maximum limits established for the extra virgin category (2.50 and 0.22 for K_{232} and K_{268} , resp.) at the initial stage and after each time-temperature treatment.

However only one sample of picual variety presents a K_{268} value of 0.24 after three weeks at 60°C, and this value is the nearest to the maximum limit established for EVOO category.

In relation to the effect of the heating treatment the highest increment of the coefficient K_{232} is observed after 3 weeks at 60°C for all the samples with the exception of the picual A olive oil whose coefficient reaches the highest increase after 2 weeks at 60°C. The treatments at 60°C have the greatest impact on the K_{268} coefficients (Figure 2).

The effect of the heating on the quality parameters of the olive oil has been also studied by several authors with

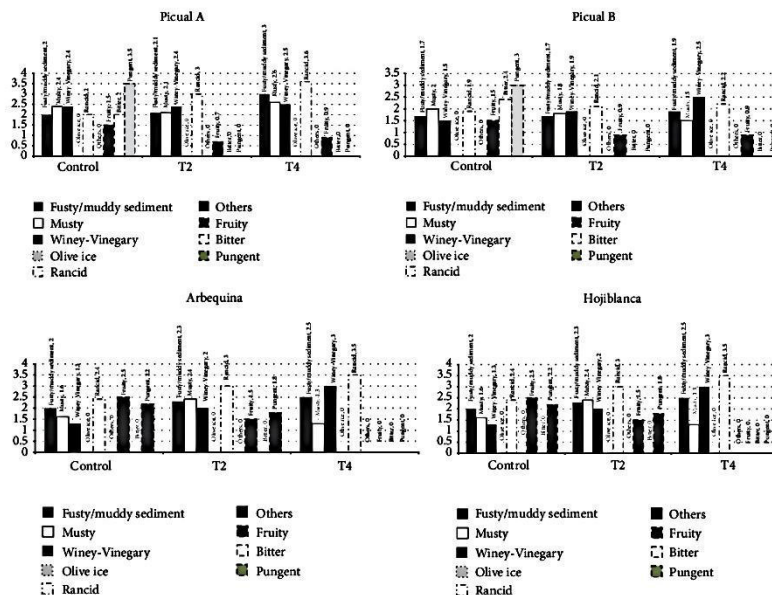


FIGURE 3: Influence of the heating treatments on the sensory analysis. Positive features and defects.

similar results. Malheiro et al. [32] reported increases of the K_{232} coefficient after microwave heating. In this study all oils presented K_{232} higher than 3.1 after 15 min of heating that indicates an accelerated degradation process and therefore the olive oils no longer correspond to the extra virgin category.

This behavior is observed in all the olive oil varieties studied. No relevant changes were observed in the olive oils after the treatment in the conventional oven or during frying. However a significant increase of the K_{268} extinction coefficient is observed in all the varieties after each heating treatment in both the conventional oven heating and microwave heating. This increase with the time is due to the formation of oxidation compounds which explained the PV decrease [32, 37, 43].

3.4. Sensory Evaluation. The sensory evaluation of the olive oils was developed following the Regulation (EEC) number 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis and the amendment in the Regulation (EEC) number 1348/2013 [39] which graded the olive oils categories in line with the median of the defects and the median for "fruity."

Figure 3 shows the median of the positive features and defects selected for each stove heating treatment. It can be observed that none of the olive oils studied preserves the "extra virgin" category, some of them became virgin category, and the picual and arbequina varieties of olive oils became "lampante" category after three weeks at 60°C. Figure 4 shows the sensory profiles of all the olive oils studied.

3.5. Fatty Acid Profile. The changes of the fatty acid percentages could be probably due to the chemical reactions (oxidation, hydrolysis) as a consequence of the heating treatments. The thermolability or volatility of these compounds has great influence [44].

As Table 2 shows, the fatty acid composition was unaltered for all the olive oil varieties. These profiles were in all the samples according to the "extra virgin" category in compliance with the requirements of the European Regulations [38] for the EVOO denomination. Only the arachidic acid and gadoleic acid content were initially slightly higher than the EU limits of 0.60 and 0.40, respectively. The results of this research are similar to other studies [35] where the fatty acid profiles of different vegetable oils after microwave and conventional heating treatments were unchanged. Table 2

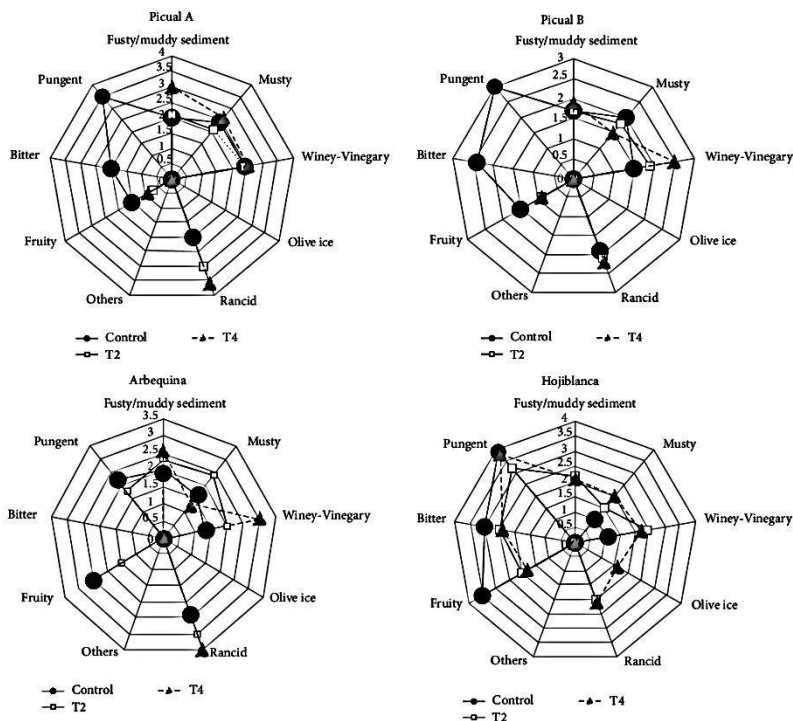


FIGURE 4: Sensory profile of the olive oils after 3 weeks at 40°C (T2) and 3 weeks at 60°C (T4).

shows medium values and the variability expressed as typical deviation.

3.6. Minority Compounds: Pigments, Polyphenols, and Tocopherols. Unlike the results obtained by Malheiro et al. [32] and Yahyaoui et al. [45], the heating treatments at 40°C and 60°C for two and three weeks have no influence on both chlorophyll and carotenoid concentrations (Figures 5(a) and 5(b)). Indeed they can be considered constant values for all the oils, except in the picual sample whose value diminished by 50% as time and temperature increase.

The polyphenols content expressed as mg of caffeic acid per kg of oil remains relatively unchanged with the heating treatments in stove. However, other researches [34, 36, 45, 46] have shown that the microwave heating treatments decrease the antioxidant components content between 55% and 85%.

With regard to the content of tocopherols, expressed as mg/kg of α -tocopherol, different trends are shown in

Figure 5(d). The tocopherol content is unchanged for the picual B sample. A rise of this content is observed for the arbequina variety oils and picual B and hojiblanca variety oils decrease this content between 47% and 70%, respectively, as time and temperature increase, with a maximum value after 3 weeks at 60°C.

3.7. Influence of the Variety, Time, and Temperature. The results of the multifactorial statistical analysis, ANOVA, with the objective of study being the influence of the three variables studied (variety, time, and temperature) on the quality parameters are shown in Table 3. The P values show that the most significant variable is the variety with $P < 0.05$ for all the parameters. Temperature shows $P < 0.05$ for 50% of the parameters and time is the factor that has less significance. The parameters experiencing high variability are K_{232} , K_{268} , peroxide, and tocopherols, followed by acidity grade,

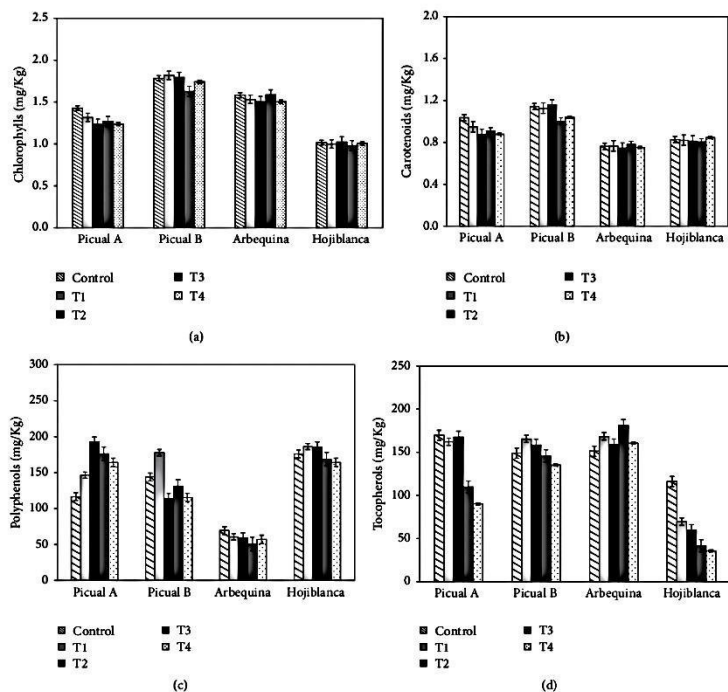


FIGURE 5: Influence of the heating treatments on the minority compounds: (a) chlorophylls, (b) carotenoids, (c) phenols, and (d) tocopherols.

TABLE 3: Analysis of variance (ANOVA).

Parameters	AG <i>P</i>	PV <i>P</i>	K_{232} <i>P</i>	K_{268} <i>P</i>	Polyphenols <i>P</i>	Chlorophylls <i>P</i>	Carotenoids <i>P</i>	Tocopherols <i>P</i>
Main effects								
Variety	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Temperature	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0422	0.0696	0.0252	0.0000
Time	0.2936	0.0135	0.0000	0.0000	0.3150	0.5975	0.6030	0.0000
Interactions								
Variety-temperature	0.0011	0.0001	0.0027	0.0000	0.4174	0.0542	0.0025	0.0000
Variety-time	0.0000	0.1596	0.0001	0.0000	0.0078	0.1279	0.0909	0.4787
Temperature-time	0.0956	0.0071	0.0000	0.0000	0.8857	0.3909	0.4272	0.0272

The *P* values show the statistical significance of each factor. Interaction level 2: nivel de integración "2."

For *P* < 0.005 the effects have a statistical significance over each parameter with a statistical confidence of 95.0%.

polyphenols, and carotenoids. The olive variety is the factor with the major influence on the variability.

4. Conclusions

This research simulates extreme storage, transport, or conservation conditions with high temperatures similar to the temperatures reached in countries with hot climate. The effects of these conditions on the quality of three olive oils varieties are conclusive about the quality of the olive oils of the three varieties studied and they can be extrapolated to other varieties for similar conditions.

The picual variety, in terms of quality parameters, shows changed values of AG, PV, K_{232} , and K_{268} compared to the limits established by the European Regulations for EVOO. The arbequina variety has similar behavior but only for the PV and the hojiblanca variety maintains its parameters within the EVOO category. However the sensory analysis of all the varieties samples determines that the oils became "virgin" and even "lampante" category after the heating treatments. The fatty acid profile is practically unchanged for the three varieties.

In relation to the minority compounds, the pigments are unaltered with the exception of picual A. The polyphenols content is also unaffected by the heating treatments. However the tocopherols content changes considerably with the exception of the picual B.

In view of the results the sensory analysis and the minority compounds are the most influenced after the treatments and due to their great influence in the preservation of the EVOO category the interest of this study to control all the traceability steps of the olive oil for commercialization is remarkable. The variance analysis (ANOVA) indicates that all the factors studied (olive variety, time, and temperature) have a great influence but the olive variety is the most relevant. It should be mentioned that the quality parameters more affected (K_{232} , K_{268} , and peroxide) show the oxidation state of the olive oil.

Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- [1] European Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs, Official Journal of the European Union L 139/1, 2004.
- [2] Law 12/2013, of 2 August, on measures to improve the functioning of the food chain. Spanish Official State Gazette, no. 185, 2013.
- [3] D. Boskou, "Olive oil composition," in *Olive Oil Chemistry and Technology*, AOCS Press, Champaign, Ill, USA, 1996.
- [4] J. L. Harwood and P. Yaquob, "Nutritional and health aspects of olive oil," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 104, no. 9-10, pp. 685-697, 2002.
- [5] M. Servili, R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G. Montedoro, and G. Morozzi, "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil," *Journal of Chromatography A*, vol. 1054, no. 1-2, pp. 113-127, 2004.
- [6] M. N. Vissers, P. L. Zock, A. J. Roodenburg, R. Leenen, and M. B. Katan, "Apparent absorption of olive oil phenols in humans," *Journal of Nutrition*, vol. 132, pp. 409-417, 2002.
- [7] L. di Giovacchino, M. R. Mucciarella, N. Costantini, M. L. Ferrante, and G. Surricchio, "Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 79, no. 4, pp. 339-344, 2002.
- [8] L. Cinquanta, M. Esti, and M. Di Matteo, "Oxidative stability of virgin olive oils," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 78, no. 12, pp. 1197-1202, 2001.
- [9] F. Gutiérrez and J. L. Fernández, "Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of 'extra' quality," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 571-577, 2002.
- [10] A. De Leonardi and V. Macciola, "Evaluation of the shelf life of virgin olive oils," *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, vol. 75, pp. 391-397, 1998.
- [11] O. Okogeri and M. Tasioula-Margari, "Changes occurring in phenolic compounds and α -tocopherol of virgin olive oil during storage," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 5, pp. 1077-1080, 2002.
- [12] E. Stefanoudaki, M. Williams, and J. Harwood, "Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 8, pp. 906-914, 2010.
- [13] E. Pagliarini, B. Zannoni, and G. Giovannelli, "Predictive study on tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 4, pp. 1345-1351, 2000.
- [14] G. Di Lecce, A. Bendini, L. Cerretani, M. Bonoli-Carbognin, and G. Lercker, "Evaluation of 'home consumption conditions' on shelf-life of extra virgin olive oils," *Industria Alimentare*, vol. 45, no. 461, pp. 873-880, 2006.
- [15] J. Velasco and C. Dobarganes, "Oxidative stability of virgin olive oil," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 104, no. 9-10, pp. 661-676, 2002.
- [16] S. Gómez-Alonso, V. Mancebo-Campos, M. D. Salvador, and G. Fregapane, "Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature," *Food Chemistry*, vol. 100, no. 1, pp. 36-42, 2007.
- [17] J. L. Guil-Guerrero and J. Urda-Romacho, "Quality of extra virgin olive oil affected by several packaging variables," *Grasas y Aceites*, vol. 60, no. 2, pp. 125-133, 2009.
- [18] J.-R. Morelló, M.-J. Motilva, M.-J. Tovar, and M.-P. Romero, "Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction," *Food Chemistry*, vol. 85, no. 3, pp. 357-364, 2004.
- [19] C. Fadda, A. Del Caro, A. M. Sanguinetti et al., "Changes during storage of quality parameters and *in vitro* antioxidant activity of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction technologies," *Food Chemistry*, vol. 134, no. 3, pp. 1542-1548, 2012.
- [20] D. Krichene, A. Allalout, V. Mancebo-Campos, M. D. Salvador, M. Zarrouk, and G. Fregapane, "Stability of virgin olive oil and

- behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions," *Food Chemistry*, vol. 121, no. 1, pp. 171–177, 2010.
- [21] D. Poljuha, B. Sladonja, K. B. Bubola et al., "Multidisciplinary approach to the characterization of autochthonous istrian olive (*Olea europaea* L.) varieties," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 46, pp. 347–354, 2008.
- [22] K. B. Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja, and I. Lukić, "Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buža, Črna and Rosinjola cultivars in Istria (Croatia)," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 50, no. 2, pp. 192–198, 2012.
- [23] K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, B. Sladonja, and I. Belobrajčić, "Influence of storage temperature on quality parameters, phenols and volatile compounds of Croatian virgin olive oils," *Grasas y Aceites*, vol. 65, no. 3, article e034, 2014.
- [24] N. Mulinacci, F. Ieri, G. Ignesti et al., "The freezing process helps to preserve the quality of extra virgin olive oil over time: a case study up to 18 months," *Food Research International*, vol. 54, no. 2, pp. 2008–2015, 2013.
- [25] T. Cecchi, C. De Marco, P. Passamonti, and F. Pucciarelli, "Analytical definition of the quality of extra-virgin olive oil stored in polyethylene terephthalate bottles," *Journal of Food Lipids*, vol. 13, no. 3, pp. 251–258, 2006.
- [26] A. I. Méndez and E. Falqué, "Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil," *Food Control*, vol. 18, no. 5, pp. 521–529, 2007.
- [27] G. Pristouri, A. Badeka, and M. G. Kontomina, "Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil," *Food Control*, vol. 21, no. 4, pp. 412–418, 2010.
- [28] C. Samaniego-Sánchez, M. J. Oliveras-López, J. J. Quesada-Granados, M. Villalón-Mir, and H. L.-G. Serrana, "Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 114, no. 2, pp. 194–204, 2012.
- [29] M. Savarese, N. Caporaso, E. De Marco, and R. Sacchi, "Extra virgin olive oil overall quality assessment during prolonged storage in PET containers," in *Proceedings in the CV- The 1st Global virtual Conference*, vol. 1, no. 1, pp. 761–770, 2013.
- [30] R. Korfić, J. Plard, Y. Le Déau, C. Rébua, D. Rutledge, and N. Dupuy, "Highlighting metabolic indicators of olive oil during storage by the AComDim method," *Food Chemistry*, vol. 203, pp. 104–116, 2016.
- [31] L. Cossignani, M. S. Simonetti, A. Neri, and P. Damiani, "Changes in olive oil composition due to microwave heating," *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 75, no. 8, pp. 931–937, 1998.
- [32] R. Malheiro, I. Oliveira, M. Vilas-Boas, S. Falcão, A. Bento, and J. A. Pereira, "Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 1, pp. 92–97, 2009.
- [33] T. Mostafa, M. Seid, A. Elham, N. Shahram, and A. Omran, "Optimization of microwave-assisted extraction of cottonseed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties," *Food Chemistry*, vol. 160, pp. 90–97, 2014.
- [34] T. Albi, A. Lanzón, A. Guinda, M. C. Pérez-Camino, and M. León, "Microwave and conventional heating effects on some physical and chemical parameters of edible fats," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, no. 8, pp. 3000–3003, 1997.
- [35] F. Caponio, A. Pasqualone, and T. Gomes, "Changes in the fatty acid composition of vegetable oils in model doughs submitted to conventional or microwave heating," *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 38, no. 4, pp. 481–486, 2003.
- [36] L. Cerretani, A. Bendini, M. T. Rodríguez-Estrada, E. Vittadini, and E. Chiavaro, "Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds," *Food Chemistry*, vol. 115, no. 4, pp. 1381–1388, 2009.
- [37] S. Adrover-Obrador, F. Comas, M. E. Dalmau et al., "Influencia de los tratamientos térmicos sobre las propiedades físico-químicas del aceite de oliva virgen extra," VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Ciudad Real, 84, 2012.
- [38] Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils. COI/T.15/NC no. 3/Rev. 7 May of 2013.
- [39] Regulation (EEC) 2015/1830 of the Commission of 8 of July of 2015 which modifies the Regulation (EEC) no. 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.
- [40] S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, and M. B. P. P. Oliveira, "Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 9, pp. 3351–3356, 2006.
- [41] M. E. Mínguez, *Clorofilas y Carotenoides, en Tecnología de Alimentos*, Ediciones Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, 1997.
- [42] A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, and M. L. Janer del Valle, "Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva," *Grasas y Aceites*, vol. 22, pp. 350–355, 1973.
- [43] S. Casal, R. Malheiro, A. Sendas, B. P. P. Oliveira, and J. A. Pereira, "Olive oil stability under deep-frying conditions," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 10, pp. 2972–2979, 2010.
- [44] A. Carrasco-Pancorbo, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, G. Lercker, and A. Fernández-Gutiérrez, "Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 12, pp. 4771–4780, 2007.
- [45] A. Yahyaoui, G. Rigane, and R. B. Salem, "Microwave heating of different commercial Tunisian olive oil: regarding to exposure times on physical and chemical parameters properties," *Biochemistry & Physiology*, vol. 3, article 131, 2014.
- [46] M. Brenes, A. García, A. Guinda, M. C. Dobarganes, J. Velasco, and C. Romero, "Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 5962–5967, 2002.

9.2. CONTRIBUCIÓN A CONGRESOS

Congreso: XVII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2015. Foro de la Industria Oleícola, Tecnológica y Calidad. ISBN: 978-84-938900-5-6

Comunicación científica, oral y póster: *Efectos de condiciones extremas de almacenamiento en el aceite de oliva virgen extra de la variedad Picual.*

Fecha: Del 6 al 8 de mayo de 2015.

Lugar: Jaén

Autores: Escudero, A.; Pacheco, R.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.

Congreso: XVII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2015. Foro de la Industria Oleícola, Tecnológica y Calidad. ISBN: 978-84-938900-5-6

Comunicación científica: *Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico.*

Fecha: Del 6 al 8 de mayo de 2015.

Lugar: Jaén

Autores: Ramos, N.; González, I; García, J.R.; Escudero, A.; García, J.A.; Fernández, A.

Congreso: Doctoral Conference for Young Researchers at the University of Jaén.

Comunicación científica, y póster: *Effects of extreme storage conditions on extra virgin olive oil of the Picual variety.*

Fecha: Del 23 al 27 de noviembre de 2015.

Lugar: Jaén

Autores: Escudero, A.; Pacheco, R.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.

Congreso: 6th EuCheMS Chemistry Congress.

Comunicación científica y poster: Determination of the diffusion coefficient of antimony in waters, oils and juices packaged in PET.

Fecha: Del 11 al 15 de septiembre de 2016.

Lugar: Sevilla.

Autores: La Rubia, M.D.; Blanca, F.; Escudero, A.; Saro, L.A.; Pacheco, R.; López, Ana B.; Ramos, N.

Congreso: 6th EuCheMS Chemistry Congress.

Comunicación científica y poster: Migration levels of antimony in juices, olive oils and waters bottled in PET. Study of the influence of storage conditions

Fecha: Del 11 al 15 de septiembre de 2016.

Lugar: Sevilla.

Autores: Pacheco, R.; Escudero, A.; Saro, L.A.; Soler, M.I.; López, L.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.

Congreso: XVIII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2017. Foro de la Industria, Tecnológica y Calidad Oleícola.

Comunicación científica, y póster: Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades

Fecha: Del 10 al 12 de mayo de 2017.

Lugar: Jaén

Autores: Escudero, A.; Pacheco, R.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.

Congreso: 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Libro del 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Alimentos y Bebidas. ISBN: 978-84-09-02880-1

Comunicación - poster: Determination of Sb levels in tee, dairy and isotonic drinks from polyethylene terephthalate (PET)

Fecha: Del 17 al 20 de junio de 2018.

Lugar: Murcia.

Autores: Roldán, L.; Escudero, A.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.

Congreso: 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Libro del 9º Congreso Internacional de Química de la ANQUE. Alimentos y Bebidas. ISBN: 978-84-09-02880-1

Comunicación - poster: Determination of heavy metals (As, Cd, Pb) in foodstuffs by ICP-MS.

Fecha: Del 17 al 20 de junio de 2018.

Lugar: Murcia.

Autores: Roldán, L.; Escudero, A.; López, L.; La Rubia, M.D.; Ramos, N.; Soler, M.I.

Efectos de condiciones extremas de almacenamiento en el aceite de oliva virgen extra de la variedad picual

Alfredo Escudero Pérez²; Rafael Pacheco Reyes²; M^a Dolores La Rubia García²; Natividad Ramos Martos¹*

¹ Grupo de Investigación "Química Analítica de la UJA" (FQM 323). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España. *E-mail: nramos@ujaen.es

² Grupo de Investigación "Bioprocesos" (TEP-138). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España

RESUMEN

El aceite de oliva virgen es un componente básico de la dieta mediterránea; su obtención a partir de las distintas variedades de aceitunas, exige un almacenamiento hasta su consumo, que puede corresponder al propio fabricante, empresa comercial o consumidor. En función de ello, en este tiempo, las condiciones de conservación, se pueden ver influenciadas por los factores climáticos de los países del Mediterráneo, caracterizados por temperaturas elevadas en épocas estivales, alterándose como consecuencia su calidad. Con este trabajo, se persigue simular condiciones de almacenamiento extremas en el laboratorio mediante tratamientos térmicos en estufa a diferentes temperaturas (40, 60 y 80°C) y tiempos (una, dos y tres semanas), y poder evaluar el deterioro que pueden sufrir sus parámetros de calidad y otros componentes minoritarios que le confieren sus propiedades nutritivas y terapéuticas [1], como son ácidos grasos, polifenoles totales, pigmentos y tocoferoles y sus características organolépticas. Los criterios de calidad y límites empleados, son los establecidos por el COI [2].

Las muestras de aceite estudiadas han sido de oliva virgen extra, de la variedad picual y los resultados obtenidos indican, que los parámetros de calidad no se alteran después de los tratamientos en el laboratorio, manteniendo pues su estabilidad y sus propiedades.

Palabras Clave: aceite de oliva virgen extra, picual, criterios de calidad, componentes minoritarios.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la seguridad de los alimentos que consumimos se ha convertido en una prioridad fundamental tanto para los consumidores como para los poderes públicos, ya que la Seguridad Alimentaria es un tema relacionado con nuestra salud.

Por tanto, para garantizar la seguridad alimentaria, las políticas deben basarse en un enfoque global e integrado de los eslabones de la cadena alimentaria (trazabilidad), es decir, un control que abarque todas las etapas del proceso productivo y procesado de alimentos, desde la fase primaria hasta el momento en que llegan al consumidor ("de la granja a la mesa"), puesto que todas ellas son determinantes de la inocuidad y calidad del producto alimenticio final.

Asimismo, la conservación y manipulación por parte del consumidor están íntimamente relacionadas con la Seguridad Alimentaria, por lo que es una cuestión fundamental conocer en qué condiciones los alimentos pueden verse alterados como consecuencia de la influencia de distintos factores físico-químicos, así como de las condiciones ambientales.

El Reglamento 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, expresa la necesidad de trabajar bajo sistemas de autocontrol en todos los eslabones de la cadena alimentaria. La elaboración del aceite de oliva para alimentación, está sujeta a múltiples peligros que pueden afectar a sus cualidades y a la seguridad alimentaria. El control de estos peligros y la puesta en marcha de medidas preventivas, son decisivos para obtener un producto final seguro y de calidad, y la Ley 12/2013 de 2 de agosto, da medidas para mejorar el funcionamiento de la cadena alimentaria.

Los aceites vegetales y de forma particular en la cuenca mediterránea, el aceite de oliva (AO), son productos ampliamente utilizados por el hombre como componente básico de su dieta alimentaria. Con el tiempo estos aceites sufren un proceso degradativo que altera o modifica sus propiedades, además de verse sometidos, en su posterior utilización a diversas condiciones térmicas que afectan a su estabilidad y, por tanto, a su calidad.

El aceite de oliva virgen, a diferencia de los demás aceites comestibles, se puede consumir en crudo, conservando todas las propiedades y componentes beneficiosos, como las vitaminas, polifenoles, esteroides y otros compuestos naturales de gran importancia o puede ser usado como agente vehicular del calor para la cocción de alimentos

Existen muchos factores que pueden influir en todo el proceso de elaboración del AOV, para obtener un aceite seguro y de calidad, como pueden ser:

- Madurez de la aceituna.
- Sistema de recolección.
- Método de transporte.



Efectos de condiciones extremas de almacenamiento en el aceite de oliva virgen extra de la variedad picual – A. Escudero; R. Pacheco; M^a D. La Rubia; N. Ramos

- Sanidad vegetal.
- Tratamientos fitosanitarios

Pero dada la importancia del papel del consumidor como, manipulador de los alimentos y en nuestro caso del AOV, en este trabajo se quiere simular el almacenamiento prolongado del AOVE, envasado en polietileno tereftalato (PET), que impliquen condiciones inadecuadas por parte del consumidor y determinar las principales modificaciones físico-químicas y sensoriales que experimentan los AOVE. Para ello, se han utilizado aceites de la variedad picual de la provincia de Jaén, y se han simulado las condiciones mediante variaciones de temperatura y tiempo de forma que se imite una mala conservación en los periodos estivales de Andalucía y otros países de clima similar, con temperaturas muy altas.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Tratamiento de las muestras

Las muestras una vez adquiridas, fueron almacenadas hasta el inicio del procedimiento experimental para su análisis, en condiciones de almacenamiento adecuadas, al abrigo de la luz y temperatura ambiente, para conservar todas sus propiedades. Los aceites de oliva eran de las características "Oliva Virgen Extra" (AOVE) de la variedad picual de la provincia de Jaén. Las muestras estaban envasadas en polietileno tereftalato (PET). Para el tratamiento térmico en estufa, las temperaturas fueron, 40°C y 60°C, durante dos y tres semanas, mientras que para 80 °C, el tiempo en la estufa fue de una semana, ya que a tiempos superiores se observaron deformaciones en el envase. Una vez finalizado cada tratamiento, volúmenes suficientes de cada muestra eran guardados en botellas de vidrio y en congelador.

Análisis de las muestras

Todos los análisis realizados en esta investigación, se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos para la caracterización de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva establecidos por la normativa del COI [1], o el reglamento de la UE [2].

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

Grado de acidez

El grado de acidez determina la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite y se expresa en porcentaje de ácido oleico. En la Figura 1, se observan los resultados de algunos AOVE ensayados, y se puede comprobar que el grado de acidez se mantiene por debajo de los valores

establecidos por la normativa para todos los tratamientos.

Oxidación: Índice de peróxidos y K_{268}/K_{232}

El índice de peróxidos valora el estado de oxidación inicial de un aceite y hace referencia a la cantidad (expresada como miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de hidroperóxidos en la muestra, que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas en el Reglamento. El yodo liberado se valora con disolución contractada de tiosulfato sódico.

En la Figura 2, se presentan los resultados de los valores del índice de peróxidos comprobándose que se mantiene inferior a 20mEq, valor que le corresponde por su denominación de AOVE.

El examen espectrofotométrico en el ultravioleta proporciona información sobre la calidad de la materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones producidas por los procesos tecnológicos. La absorción a las longitudes de onda del método, se debe a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados.

De igual forma, de la Figura 3 se deduce que se mantiene la calidad de la materia grasa en cuanto a su estado de oxidación, no encontrándose ningún valor de la extinción específica superior a 2,50.

Análisis sensorial

Este método clasifica el aceite de oliva en una escala numérica, relacionada con la percepción de los estímulos de su flavor, según el juicio de un grupo de catadores seleccionados constituidos en panel. La evaluación sensorial ha sido llevada a cabo por el Panel de Cata, del Centro Tecnológico del Olivar y Aceite de oliva (CITOLIVA), de acuerdo con los métodos de análisis oficiales de la UE [2] y posteriores modificaciones). Como se puede apreciar en la Figuras 4 y 5, mostradas a modo de ejemplo, para uno de los aceites estudiados. Se observa que mantiene las características de "virgen", hasta que alcanza la temperatura de 80 °C.

Composición de ácidos grasos por cromatografía de gases

El método, está basado en la separación y determinación por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, según el Reglamento (CEE) N°2568/91 [3]. Es aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo de oliva con un contenido en ácidos grasos libres inferior al 3.3 %. El hidróxido potásico no produce la esterificación de los ácidos grasos libres, y los ésteres metílicos, se forman por la transesterificación con una disolución metanólica de hidróxido potásico como una fase intermedia antes que se produzca la saponificación.



Efectos de condiciones extremas de almacenamiento en el aceite de oliva virgen extra de la variedad picual – A. Escudero; R. Pacheco; M^a D. La Rubia; N. Ramos

En las Figuras 6 y 7, se puede comprobar que la composición de los ácidos grasos de los AOVE representados, corresponden al perfil característico de un aceite de la variedad de aceituna picual.

COMPONENTES MINORITARIOS

Tocoferoles

El análisis de tocoferoles totales se realizó con un método de cromatografía líquida [5], empleando como patrón α -tocopherol de Sigma-Aldrich. Se preparó el patrón de α -tocopherol (250 mg/L) en acetonitrilo, conservándose en congelador a -20°C. Como ejemplo, en la Figura 8 se muestra la variación de la composición de tocoferoles, expresados en mg/kg para dos AOVE, presentando niveles similares a otros aceites españoles [4].

Polifenoles totales

La determinación de los polifenoles totales se ha realizado mediante el método descrito por Vázquez y col. [6], introduciendo como modificación la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu en vez de Folin-Denis. El procedimiento consta de dos partes: una extracción de los polifenoles del aceite de oliva, y su posterior determinación colorimétrica. Para estos compuestos el estudio arroja resultados similares a los obtenidos en el análisis de tocoferoles (Figura 9).

Pigmentos clorofílicos y carotenoides

La valoración global del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides, se ha realizado siguiendo el método propuesto por Minguez y col. [7] y sus variaciones se representan en las Figuras 10 y 11. El método consiste, en determinar la absorbancia de una disolución de AOVE, a la longitud de onda de máxima absorción del componente mayoritario de la fracción clorofílica y carotenoides, es decir, la feofitina y la luteína respectivamente.

CONCLUSIONES

1. Los aceites de oliva ensayados de la variedad picual, mantienen las características propias de la denominación, "virgen" a la vista de los resultados obtenidos.

2. Los compuestos minoritarios estudiados, conservan la composición propia de un AOVE, lo que le permite mantener propiedades tan importantes como la estabilidad frente a la oxidación.
3. El análisis sensorial pone de manifiesto que las características correspondientes a la denominación de aceite de oliva virgen, se mantienen hasta la temperatura de 80°C.
4. Los resultados de todos los análisis físico-químicos realizados a los AOVE, después de cada tratamiento térmico en estufa, a las temperaturas y tiempos ensayados, para simular una mala conservación o almacenamiento por parte del consumidor o distribuidor comercial, confirman que siguen siendo un alimento seguro y conservando sus propiedades físico-químicas y nutricionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC nº 3 (Rev. 2 24 de noviembre de 2006).
2. Reglamento (CE) No 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008 que modifica el 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.
3. Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la comisión de 6 de noviembre de 2003. Modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea (13.11.2003).
4. M.D. Salvador, F. Aranda, G. Fregapane. Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. Journal of the American Oil Chemists Society 11 (1998) 1305-1311.
5. S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, M.B. Oliverira. Quantification of tocopherols and tocotrienols in portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. J. Agric. Food Chem. 54, (2006) 3351-3356.
6. A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, M.L. Janer del Valle. Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. Grasas y Aceites 22 (1973) 350-355.
7. Minguez. Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos. Ediciones Universidad de Sevilla. España (1997) Capítulos VI 103-107; VII, p. 111-148; VIII, 155-157.

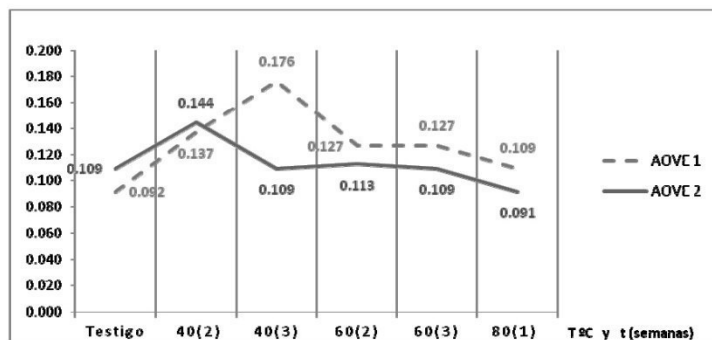


Figura 1. Variación del grado de acidez

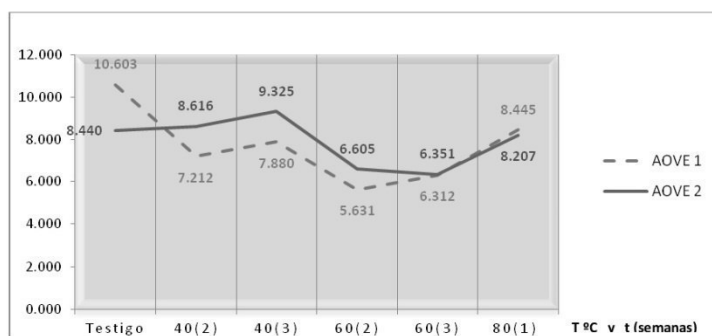


Figura 2. Variación del índice de peróxidos

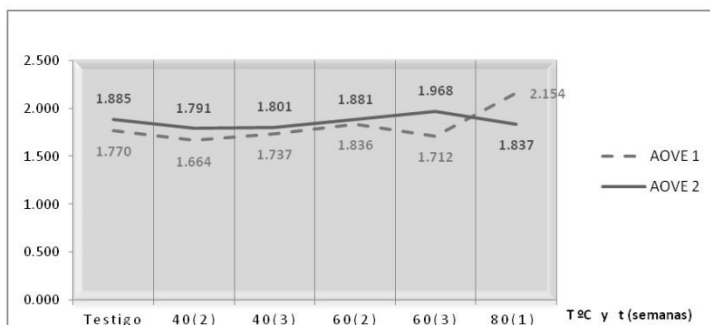


Figura 3. Variación del K₂₃₂

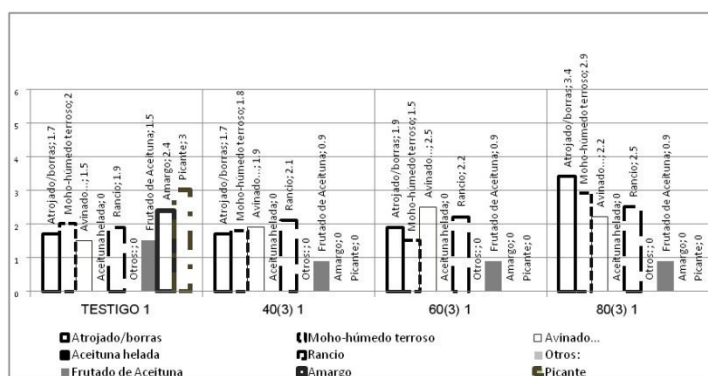


Figura 4. Análisis sensorial. Comparación de atributos

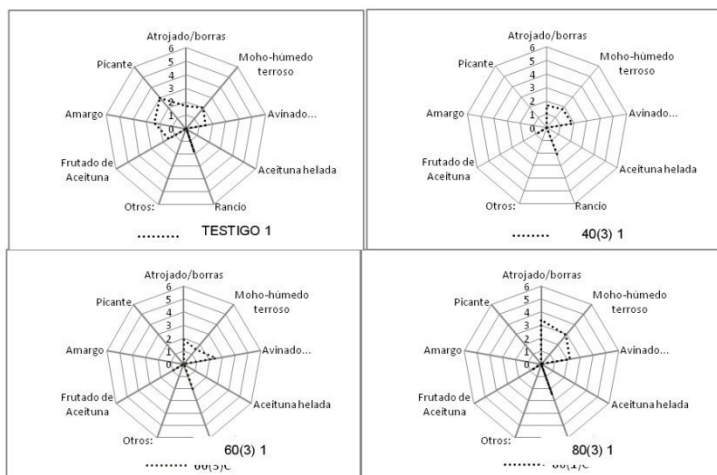


Figura 5. Perfil del análisis sensorial

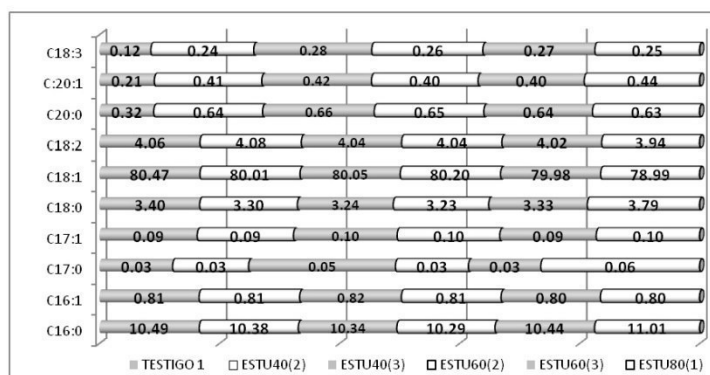


Figura 6. Evolución de los ácidos grasos según el tratamiento térmico del AOVE 1 (%)

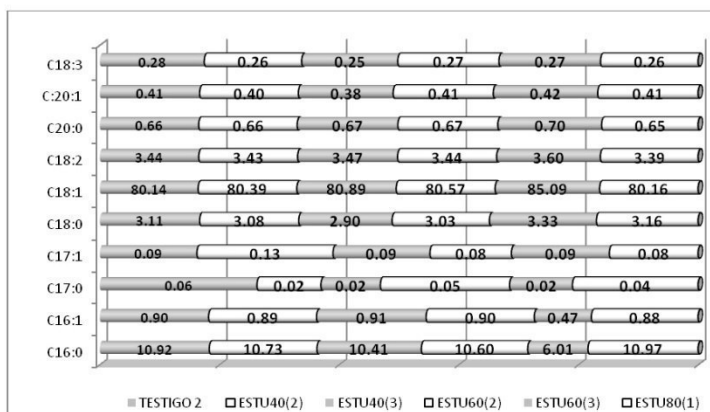


Figura 7. Evolución de los ácidos grasos según el tratamiento térmico del AOVE 2 (%)

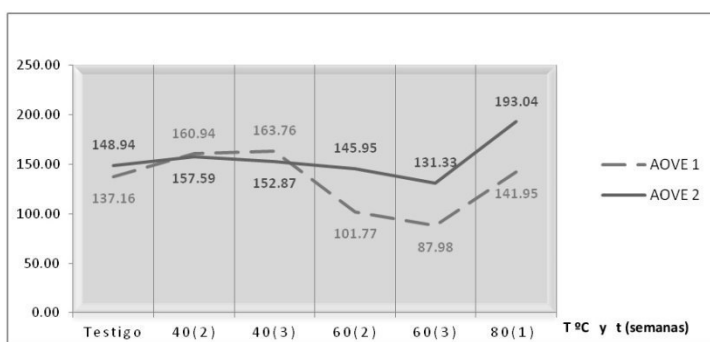


Figura 8. Variación de la composición de tocoferoles (mg/kg)

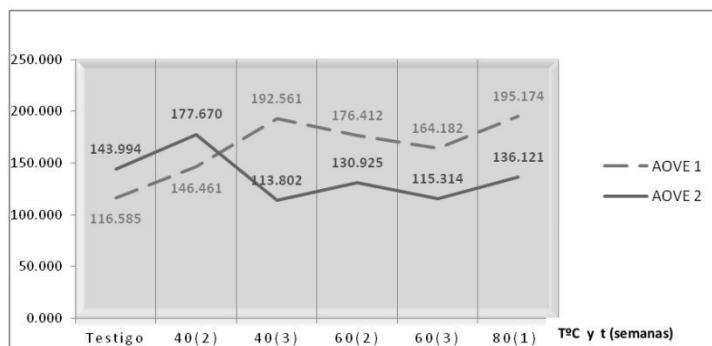


Figura 9. Variación de la composición de polifenoles totales (mg/kg)

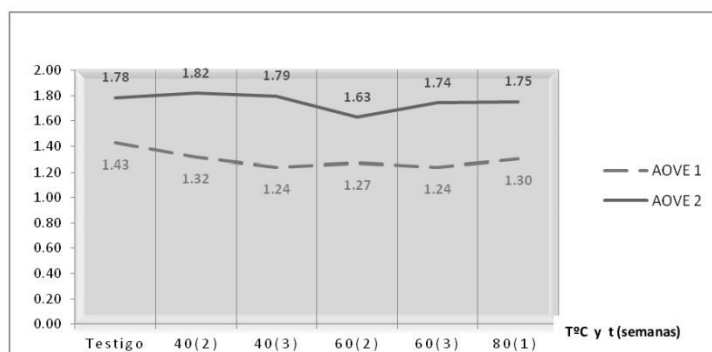


Figura 10. Determinación de pigmentos (clorofilas) de dos AOVE (mg/kg)

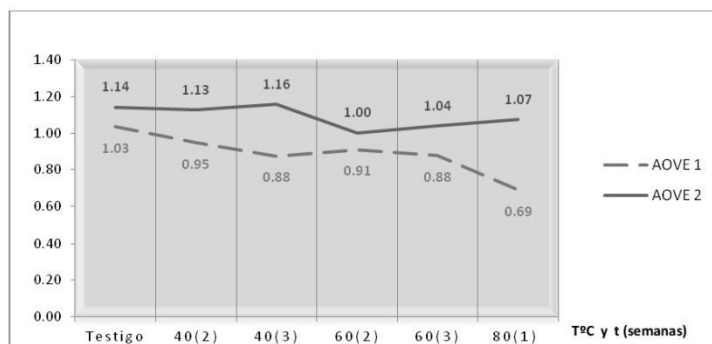


Figura 11. Determinación de pigmentos (carotenoides) de dos AOVE (mg/kg)



EFFECTOS DE CONDICIONES EXTREMAS DE ALMACENAMIENTO EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE LA VARIEDAD PICUAL



Alfredo Escudero Pérez²; Rafael Pacheco Reyes²; M. Dolores La Rubia García²; Natividad Ramos Martos¹

¹Grupo de Investigación "Química Analítica de la UJA" (FOM 323). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España. E-mail: nramos@uja.es

²Grupo de Investigación "Bioprocesos" (TEP-136). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España.

Resumen

El aceite de oliva virgen es un componente básico de la dieta mediterránea; su obtención a partir de las distintas variedades de aceitunas exige un almacenamiento hasta su consumo, que puede corresponder al propio fabricante, empresa comercial o consumidor. En función de ello, en este tiempo, las condiciones de conservación se pueden ver influenciadas por los factores climáticos de los países del Mediterráneo, caracterizados por temperaturas elevadas en épocas estivales, alterándose como consecuencia su calidad.

Con este trabajo, se persigue simular en el laboratorio condiciones de almacenamiento extremas mediante tratamientos térmicos en estufa a diferentes temperaturas (40, 60 y 80°C) y tiempos (una, dos y tres semanas), y poder evaluar el deterioro que pueden sufrir sus parámetros de calidad y otros componentes minoritarios que le confieren sus propiedades nutritivas y terapéuticas [1], como son ácidos grasos, polifenoles totales, pigmentos y tocoferoles, y sus características organolépticas. Los efectos de calidad y límites establecidos por el COI [2]. Las muestras de aceite estudiadas han sido de oliva virgen extra, de la variedad picual y los resultados obtenidos indican que los parámetros de calidad no se alteran después de los tratamientos en el laboratorio, manteniendo pues su estabilidad y sus propiedades.

Resultados

Parámetros de calidad



Ácidos Grasos

DEL AOVE 1

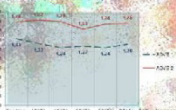


DEL AOVE 2

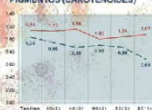


Componentes Minoritarios

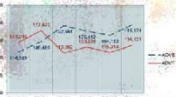
PIGMENTOS (CLOROFILAS)



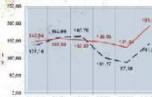
PIGMENTOS (CAROTENOIDES)



POLIFENÓLES



ALFA-TOCOFEROLES



Método Experimental

Tratamiento de las muestras

Las muestras, una vez adquiridas, fueron almacenadas hasta el inicio del procedimiento experimental para su análisis en condiciones de almacenamiento adecuadas, al abrigo de la luz y temperatura ambiente, para conservar todas sus propiedades.

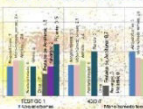
Los aceites de oliva eran de las características "Oliva Virgen Extra" (AOVE) de la variedad picual y de la provincia de Jaén. Las muestras estaban envasadas en polietileno (PET). Para el tratamiento térmico en estufa, las temperaturas fueron 40°C y 60°C durante dos y tres semanas, mientras que para 80°C el tiempo en la estufa fue de una semana, puesto que a tiempos superiores se observaron deformaciones en el envase. Una vez finalizado cada tratamiento, volúmenes suficientes de cada muestra se guardaron en botellas de vidrio y en congelador.

Análisis de las muestras

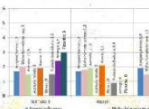
Todos los análisis realizados en esta investigación, se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos para la caracterización de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva establecidos por la normativa del COI [1], o el reglamento de la UE [2].

Análisis Sensorial

AOVE 1. VIRTUDES Y DEFECTOS



AOVE 2. VIRTUDES Y DEFECTOS



Conclusiones

Los aceites de oliva ensayados de la variedad picual mantienen las características propias de la denominación "virgen", a la vista de los resultados obtenidos.

Los componentes minoritarios estudiados conservan la composición propia de un AOVE, lo que permite que se mantengan propiedades tan importantes como la estabilidad frente a la oxidación.

El análisis sensorial pone de manifiesto que las características correspondientes a la denominación de aceite de oliva virgen se mantienen hasta la temperatura de 80°C.

Los resultados de todos los análisis físico-químicos realizados a los AOVE, después de cada tratamiento térmico en estufa, a las temperaturas y tiempos ensayados, para simular una mala conservación o almacenamiento por parte del consumidor o distribuidor comercial, confirman que sigue siendo un alimento seguro y que conserva sus propiedades físico-químicas y nutricionales.

Referencias

- Consejo Oleícola Internacional. 2012 (2012).
- Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC n° 3 (Rev. 2 24 de noviembre de 2006).
- Reglamento (CE) n° 640/2006 de la Comisión, de 4 de julio de 2006. 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.
- Reglamento (CE) n° 1989/2003 de la Comisión, de 6 de noviembre de 2003. 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.
- M.D. Salvador, F. Aranda, G. Fregapane. Chemical composition of commercial Combiabre virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the American Oil Chemists Society* 11 (1998) 1305-1311.
- S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, M.B. Oliveira. Quantification of tocopherols and tocotrienols in portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *J. Agric. Food Chem.* 54, (2006) 3351-3356.
- A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, M.I. Janer del Valle. Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 22 (1972) 350-355.
- Minguez. Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos. Ediciones Universidad de Sevilla. España (1997) Capítulos VI 103-107/VII, p. 111-148/VIII, 155-157.

Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico

Natividad Ramos Martos^{1*}, Laura González Coronado¹, Juan Raúl García Montes¹, Alfredo Escudero Pérez¹, Jose Antonio García Mesa², Antonia Fernández-Hernández²

¹Grupo de Investigación "Química Analítica de la UJA" (FQM 323), Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edificio B-3, 23071 Jaén (Jaén, España). * nramos@ujaen.es

²Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera IFAPA Centro Venta del Llano. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Mengibar (Jaén) España.

RESUMEN

En esta comunicación, se va a realizar un estudio de la degradación de los plaguicidas presentes en aceite de oliva virgen extra (AOVE), de la variedad picual de la provincia de Jaén, como consecuencia de los tratamientos agrícolas con productos fitosanitarios para combatir plagas, enfermedades.

Para ello, se van a someter a las muestras de AOVE, a distintos tratamientos térmicos que se han llevado a cabo en estufa en el laboratorio para temperaturas comprendidas entre 40°C y 80°C y tiempos de dos y tres semanas. Con estos ensayos, se pretende imitar una mala conservación o almacenamiento del aceite una vez obtenido.

Entre los plaguicidas seleccionados están entre otros, carbaril, dimetoato y diuron, que tienen establecidos por la Unión Europea, La Comisión del Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como el Comité Oleícola Internacional (COI), los Límites Máximos de Residuos (LMRs).

La extracción de los plaguicidas de las muestras, se ha realizado mediante dos procedimientos distintos y su posterior análisis químico para la determinación cuantitativa, mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas HPLC-MS.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la producción y uso de compuestos químicos en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas terrestre y acuático. Debido a sus características químicas, los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada. La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos cincuenta años. El uso indiscriminado que en el pasado se ha dado a estos compuestos, ha producido que en la actualidad se detecten residuos de estos en el ambiente y se asocien con riesgo potencial a la salud pública [1].

Se han realizado estudios científicos en referencia al aceite de oliva virgen sobre la salud en los humanos, en la que el aceite de oliva virgen ofrece beneficios saludables. Sin embargo el aceite de oliva virgen por su proceso de elaboración, es uno de los aceites que puede presentar una elevada contaminación por plaguicidas, por los agentes químicos utilizados en la prevención y/o tratamiento de plagas, hierbas, enfermedades, con el fin de garantizar la cosecha, afectan al olivar y a las aceitunas, que posteriormente son molidas y extraído el aceite de oliva virgen [2].

Por lo tanto, con el fin de proteger la salud de los consumidores, la Unión Europea, y La Comisión del Codex Alimentarius [3], Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) [4] y la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como el Comité Oleícola Internacional (COI), han establecido Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los plaguicidas en el aceite de oliva virgen.

Los valores establecidos como LMR de plaguicidas en las aceitunas y el aceite de oliva virgen, se observan en el **Tabla 1**. Los LMR de plaguicidas determinados productos de origen vegetal, incluyendo las aceitunas, son también fijados por la Comunidad Europea en 1976.

De igual manera, la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), han estimado LMR de plaguicidas en aceitunas, en el **Tabla 2**, se muestran los diferentes plaguicidas y sus LMR en aceitunas.

En los últimos años y debido al creciente interés por la contaminación de alimentos y en especial del aceite de oliva virgen, con el objetivo de tratar problemas que se originan por posibles contaminaciones, Martínez y col. [5, 6], ha investigado una metodología para degradar los plaguicidas, mediante la aplicación la luz UV al aceite de oliva virgen.

En este estudio, se diseñaron una serie de experimentos a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30°C) y tiempos de operación, para determinar la influencia de la temperatura – tiempo de



Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico – N. Ramos, L. González, J.R. García, A. Escudero, J.A. García, A. Fernández

exposición UV en la degradación de los plaguicidas así como en los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen.

Recientemente, se han realizado nuevos estudios de degradación más exhaustivos, sobre el comportamiento y la degradación de plaguicidas empleados en el olivar en matrices acuosas y aceite de oliva virgen, al someterse a tratamiento con radiación ultravioleta, identificando los principales productos de degradación generados y su potencial tóxico, así como la efectividad del tratamiento UV para la eliminación de dichos plaguicidas [7], para 34 y 5 plaguicidas, mediante LC-TOFMS y GC-MS/MS, respectivamente, empleando tiempos de exposición a la radiación UV hasta de 150 minutos, obteniéndose una tasa media de degradación del 75 % de los plaguicidas después del tiempo máximo de exposición.

Estudiar los parámetros globales de calidad de los aceites tratados y evaluar el efecto de la radiación ultravioleta sobre estos parámetros que sirven para clasificar el aceite de oliva virgen en sus distintas categorías comerciales.

En investigaciones realizadas por el Instituto de la Grasa [8], se han propuesto otras técnicas para la degradación de los plaguicidas en el aceite de oliva virgen como la refinación física del aceite de oliva. En este estudio, se investigó la degradación de cuatro tipos de plaguicidas, el endosulfan (α -endosulfan, β -endosulfan y endosulfan-sulfato), simazine, oxifluorfen y diflufenican. Se encontró que el blanqueo sólo resultó eficaz para la eliminación de la simazine. La eliminación de los otros plaguicidas en la etapa de desodorización se dio en diferentes periodos (1h para diflufenican, oxifluorfen y α -endosulfan, 2 h para el β -endosulfan y 3 h para el endosulfan-sulfato).

Otras investigaciones [9, 10] en aceites, proponen también la refinación como una poderosa tecnología para la degradación de contaminantes orgánicos entre ellos los plaguicidas. Mediante el uso de esta técnica se garantiza la calidad de los aceites y grasas refinadas. Fukazawa y col. [238], añadieron al aceite de soja, plaguicidas de la familia de los carbamatos, luego realizaron los procesos de refinado de aceite, en el que el contenido de plaguicidas fue determinado inmediatamente después de refinado y se obtuvieron resultados de degradación de los plaguicidas hasta del 70 - 80%.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestras y analitos

Las muestras ensayadas han sido AOVE, de la variedad 'Picual' de la provincia de Jaén. Se han

conservado en condiciones adecuadas hasta su análisis. Para facilitar la manipulación de las mismas, se ha realizado una codificación que nos permite identificar, en este orden:

1. Tratamiento térmico
2. Tiempo del tratamiento
3. Marca comercial

Se ha seleccionado un grupo de plaguicidas atendiendo a su uso intensivo en el cultivo del olivar, se eligieron plaguicidas legislados en la aceituna y en el aceite de oliva, según el Codex Alimentarius, FAO, OMS y COL, y empleados en el cultivo del olivar a nivel mundial, como son: dimetoato, diuron, carbaril, amitrol, Terbutialazina, oxifluorfen y diflufenican, sus estructuras y familias químicas se muestran en la **Tabla 3**.

Equipo

Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS)

El sistema UPLC consiste en un equipo AcQuity Ultra-performance LC (UPLC) con sistema binario de bomba Waters (Mildford, MA, USA) usando una columna C18 Acquity UPLC™ BEH (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μ m) también de Waters. La fase móvil consiste en agua con 0.1% ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B). El método cromatográfico empleando consistió en un gradiente de elución de agua con 0.1% de ácido fórmico como disolvente A y acetonitrilo (de calidad LC-MS) como disolvente B. El método empezaba con un 10% de B, que se mantiene constante durante 1 min, seguido de un gradiente lineal hasta el 70% B a los 3 min, donde el incremento de acetonitrilo se hará más lento, hasta alcanzar el 100% B a los 8 min, donde se mantiene constante durante 2 minutos más, con un flujo de 0.4 mL/min. Se incluye al final una etapa de equilibrado de columna de 5 minutos después de cada análisis. Durante el análisis, la columna se mantiene a 30°C y el volumen de inyección es de 10 μ L.

El UPLC está acoplado con un detector AcQuity UPLC y un espectrómetro de masas TQD (Waters, Mildford, MA, USA). El software usado fue Masslynx 4.1. La ionización se realizó por electrospray (ESI), con la interfase operando en modo positivo y los datos se recogieron en el monitor del equipo (MRM). Los datos de la fuente de ionización fueron: el voltaje del capilar 3kv, 150°C de temperatura y la temperatura del gas de desolvatación 320°C, con un flujo de 600L/h. Los gases de cono y de colisión fueron nitrógeno (>99.995 de pureza) y argón (>99.995 de pureza), respectivamente.



Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico – N. Ramos, L. González, J.R. García, A. Escudero, J.A. García, A. Fernández

Tratamiento de las muestras

Experiencia en el laboratorio. Ensayos en estufa.

Los aceites de oliva ensayados han sido sometidos a distintos tratamientos térmicos en estufa de secado, indicados en la siguiente **Tabla 4**.

Una vez finalizado cada tratamiento, los AOVE han sido conservados en congelador en botes de color ámbar hasta su la etapa de extracción.

Extracción de los analitos

Método 1: Método Quecher

Pesar 3 g de aceite en un tubo de centrifuga de plástico de 50 mL y añadir 7 mL de agua ultrapura. A continuación se adicionan 10 mL de ACN medidos con pipeta aforada. Se agita el contenido de forma manual durante 1 minuto. Después se añaden 4 g de $MgSO_4$ y 1 g de NaCl y se vuelve a agitar de forma inmediata manualmente durante 1 minuto. Después se centrifuga a 3700 rpm durante otro minuto. Tras la centrifugación se toman 5 mL del sobrenadante con pipeta aforada y se transfieren a un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL, al que previamente se le añaden: 0.75g de $MgSO_4$ y 0.25g de PSA. Se agita el tubo durante 30 s y se centrifuga a 3700 rpm durante 1 min. Una vez centrifugado se toman 3 mL del sobrenadante con pipeta aforada.

Método 2

Se pesan 3 g de aceite en un tubo de plástico de centrifuga de 15 mL y se le añaden 10 mL de ACN medidos con pipeta aforada. Se agita el tubo de forma manual durante 2 minutos y se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se toman 5 mL del sobrenadante con pipeta aforada.

En la **Figura 1**, se muestra un esquema comparativo de las etapas de ambos procesos de extracción.

Análisis químico

Identificación de los analitos

Se ha realizado la identificación de los siete plaguicidas con sus respectivos patrones y aplicando el método cromatográfico indicado anteriormente, con los valores experimentales de masa exacta y tiempo de retención. Los valores de los correspondientes parámetros cromatográficos se muestran en la **Tabla 5**.

Calibración

La linealidad del método fue estudiado preparando curvas de calibrado para siete niveles de concentración y el rango dinámico lineal para todos los patrones, estaba comprendido entre 0.1429 y 0.8571 mg/L, para todos los analitos. Los coeficientes de correlación presentan valores oscilan entre 0.972 y 0.997.

Resultados

Todas las muestras de AOVE, se han analizado por triplicado. Para los distintos tratamientos térmicos en estufa se puede observar que los valores de los porcentajes de degradación para los plaguicidas considerados, en primer lugar que no todos sufren el mismo nivel de degradación para las condiciones de ensayo, los que presentan una mayor degradación son, dimetoato, carbaril y diflufenican, los resultados se muestran en la **Tabla 6**. Por otro lado, diuron, amitrol y oxifluorfen, presentan degradación en menor grado a partir de la temperatura de 60°C. Siendo para 80°C, el valor de temperatura de mayor degradación, en todos los casos.

En la **Figura 2**, se muestra la comparación entre los porcentajes de degradación de los tres plaguicidas, más degradados. Comprobando como el carbaril es el que presenta siempre un nivel más alto de degradación, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por otros autores mediante exposición UV [7].

Asimismo, se puede observar en la **Figura 3**, el número de plaguicidas que sufren degradación y su porcentaje sobre el total, para cada valor de temperatura, así para 40 °C lo hacen, dimetoato, carbaril, terbutilazina, oxifluor y diflufenican, para 60°C, todos menos oxifluor y por último para 80°C, dimetoato, carbaril, terbutilazina, y diflufenican.

CONCLUSIONES

1. En los todas las muestras de AOVE que han sido tratadas como testigo, es decir, sin ningún tratamiento, hay presencia en mayor o menor grado de los plaguicidas analizados.
2. Los plaguicidas dimetoato, carbaril y diflufenican, se degradan para todas las valores de temperatura y tiempo ensayadas, aumentando el porcentaje de forma proporcional, fundamentalmente con la temperatura.
3. Para los tiempos ensayados de dos y tres semanas no se aprecian variaciones importantes en los porcentajes de degradación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Oller Alberola, Isabel. Depuración de aguas contaminadas con tóxicos persistentes mediante combinación de fotocatalisis solar y oxidación biológica. (2008).
2. Martínez Nieto, L., Hodaifa, G., Vives, S. R., Casares, J. A. G., Casanova, M. S. Photodegradation of phytosanitary molecules present in virgin olive oil. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 203 (2009). 1-16.
3. CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food. Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits. 2010



Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico – N. Ramos, L. González, J.R. García, A. Escudero, J.A. García, A. Fernández

4. FAO. International Maximum Residue Level Database. Maximum Residue Level Database. International Maximum Residue Level Database.
5. L. Martínez Nieto, G. Hodaifa, S.R. Vives, J.A.G. Casares, M.S. Casanova. Photodegradation of phytosanitary molecules present in virgin olive oil. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 203 (2009) 1-6.
6. L. Martínez Nieto, G. Hodaifa, M.S. Casanova. Elimination of pesticide residues from virgin olive oil by ultraviolet light: Preliminary results. Journal of Hazardous Materials 168 (2009) 555-559.
7. V. M. Yufra Picardo. Tesis Doctoral, Evaluación del tratamiento con radiación UV para la eliminación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen. Jaén (2013)

Tabla 1. Valores Límite Máximo de Residuos. [4]

	Plaguicida	Aceitunas (mg/Kg)	Aceite de oliva Virgen (mg/Kg)
1	Carbaryl	30	25
2	Kresoxim – methyl	0,2	0,7
3	Methidathion	1	2
4	Deltamethrin	1	-
5	Difenoconazole	2	-
6	Dimethoate	0,5	-
7	Fenthion	1	-
8	Paraquat	0,1	-
9	Permethrin	1	-

Tabla 2. Lista de plaguicidas LMR en aceitunas

	Plaguicida	FAO (mg/Kg)	CODEX (mg/Kg)	E.U. (mg/Kg)
1	Buprofezin	3.5	---	2
2	Carbaryl	10	30	5
3	Carfentrazone-ethyl	0.1	---	0.01
4	Diuron	1	---	0.2
5	Fenpropathrin	5	---	0.01
6	Glyphosate	0.2	---	1
7	Methidathion	0.05	1	1
8	Oryzalin	0.05	---	0.01
9	Oxyfluorfen	0.05	---	1
10	Paraquat dichloride	0.05	0.1	0.02
11	Pendimethalin	0.1	---	0.05
12	Pyriproxyfen	1	---	0.05
13	Simazine	0.2	---	0.1

Tabla 3. Estructura y familias químicas

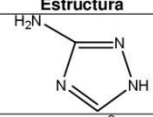
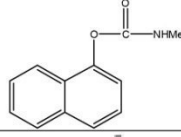
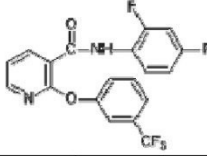
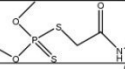
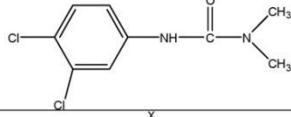
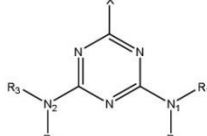
Plaguicida	Familia química	Estructura
Amitrol	Triazol	
Carbaril	Carbamatos	
Diflufenican	Anilidas	
Dimetoato	Organofosforado	
Diurón	Ureas	
Terbutilazina	Triazinas	

Tabla 4. Condiciones de ensayo

Temperatura (°C)	Tiempo (semanas)
40	2
60	2
80	2
40	3
60	3

Tabla 5. Identificación cromatográfica

Plaguicida	Composición elemental	[M+H] ⁺	T _R (min)
Dimethoate	C ₈ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	230.1	2.50
Diurón	C ₈ H ₁₀ Cl ₂ N ₂	233.0	3.15
Amitrol	C ₂ H ₄ N ₄	85.1	11.31
Carbaryl	C ₁₀ H ₉ O ₃	202.0	11.26
Terbutylazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₃	230.0	3.44
Oxifluorfen	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	237.0	4.67
Diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂	395.1	4.22

Tabla 6. Porcentajes de degradación

Plaguicida	Carbaril	Dimetoato	Diflufenican
Temperatura °C	% de degradación		
40	37	50	12
60	43	75	30
80	76	80	40

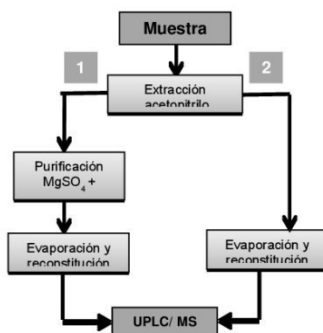


Figura 1. Procesos de extracción



Degradación de plaguicidas en el aceite de oliva virgen, consecuencia del tratamiento térmico – N. Ramos, L. González, J.R. García, A. Escudero, J.A. García, A. Fernández

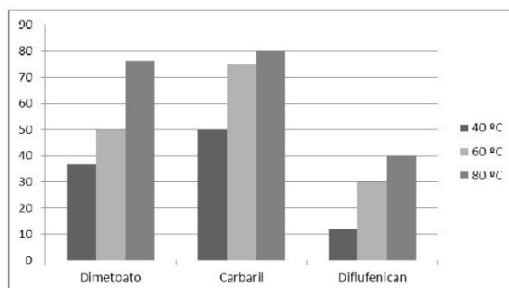


Figura 2. Porcentajes de plaguicidas más degradados

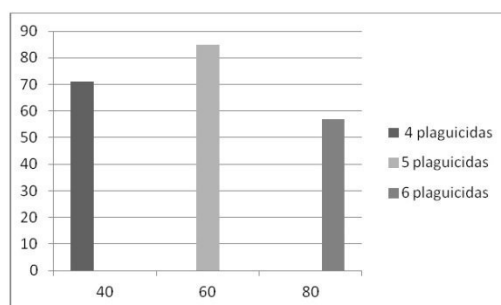


Figura 3. Porcentaje de plaguicidas degradados



Vicerrectorado de Enseñanzas de Grado, Postgrado y Formación Permanente

**Abstracts Book of the 2015 Doctoral
Conference for Young Researchers at the
University of Jaén**



November 23-27, 2015

Doctoral Conference for Young Researchers at the University of Jaén (2015)

Title:

Effects of extreme storage conditions on extra virgin olive oil of the Picual variety

Presenting author, & affiliation:

Escudero Pérez, Alfredo
University of Jaén
Department of Chemical Environmental and Materials Engineering
E-mail: paseosnaturales@yahoo.es

Abstract: (Your abstract must use Arial 10 pt normal style and must fit in this box and page)

Introduction: Virgin olive oil is a basic component of the Mediterranean diet. Its production from the different varieties of olives requires storage at manufacturer's or the final distributor until consumption. During this time, the storage conditions may be affected by weather conditions, especially by the high temperatures in summer in the different production areas.

Two extra virgin olive oil of the Picual variety from the province of Jaén were acquired and stored in optimal conditions until analysis. The samples were packed in polyethylene terephthalate (PET). Extreme storage conditions were simulated by heating treatment in an oven at temperatures of 40, 60 and 80 ° C for two and three weeks. Deformations in the container were observed at the highest temperature.

Once each treatment was finished, samples were taken in glass receipt and frozen until analysis. All the test were carried out following the COI legislation (COI/T.20/ 2007) and the EU Regulation ((CE) nº 299/2013) for the olive oils and olive-pomace oils characterization.

Objectives: The purpose of the present study was to simulate the extreme conditions of storage of extra virgin olive oil, to assess the damage that may suffer quality parameters and other minor components such as fatty acids, polyphenols, pigments and tocopherols; as well as their organoleptic characteristics.

Results and discussion: Minor compounds retained the inherent composition of extra virgin olive oil, maintaining stability against oxidation. Sensory analysis showed that, in general, the characteristics of the term "virgin" are maintained until the temperature of 80°C. These characteristics were also found in the two control samples. The results of all physico-chemical analysis at the simulated conditions confirmed that the AOVE remained as a food with its physicochemical and nutritional properties.

Acknowledgements: Thanks to the Research Group "Bioprocess TEP-138" from the University of Jaén (Spain)

Director(s) of PhD thesis: Dres. ¹R. Pacheco Reyes, ²N. Ramos Martos, ¹M.D.La Rubia García,

¹University of Jaén, Department of Chemical Environmental and Materials Engineering

²University of Jaén, Department of Physical and Analytical Chemistry

This work was also presented as a poster



EFFECTOS DE CONDICIONES EXTREMAS DE ALMACENAMIENTO EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE LA VARIEDAD PICUAL



Alfredo Escudero Pérez^a, Rafael Pacheco Reyes^a, M. Dolores La Rubia García^a, Natividad Ramos Marfó^a

^aGrupo de Investigación "Química Analítica de la UJA" (FOM 323), Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España. E-mail: pramos@uja.es

^aGrupo de Investigación "Bioprocesos" (TEP-136), Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España.

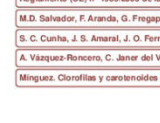
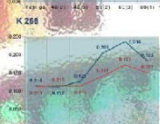
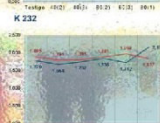
Resumen

El aceite de oliva virgen es un componente básico de la dieta mediterránea; su obtención a partir de las distintas variedades de aceitunas exige un almacenamiento hasta su consumo, que puede corresponder al propio fabricante, empresa comercial o consumidor. En función de ello, en este tiempo, las condiciones de conservación se pueden ver influenciadas por los factores climáticos de los países del Mediterráneo, caracterizados por temperaturas elevadas en épocas estivales, alterándose como consecuencia su calidad.

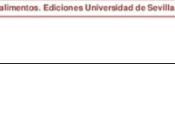
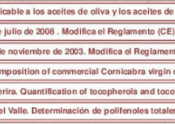
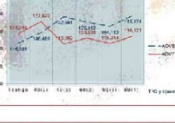
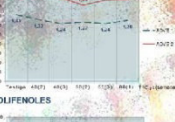
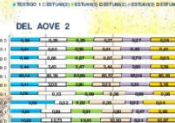
Con este trabajo, se persigue simular en el laboratorio condiciones de almacenamiento extremas mediante tratamientos térmicos en estufa a diferentes temperaturas (40, 60 y 80°C) y tiempos (una, dos y tres semanas), y poder evaluar el deterioro que pueden sufrir sus parámetros de calidad y otros componentes minoritarios que le confieren sus propiedades nutritivas y terapéuticas [1], como son ácidos grasos, polifenoles totales, pigmentos y tocoferoles, y sus características organolépticas. Los valores de calidad y límites establecidos por el COI [2]. Las muestras de aceite estudiadas han sido de oliva virgen extra, de la variedad picual y los resultados obtenidos indican que los parámetros de calidad no se alteran después de los tratamientos en el laboratorio, manteniendo pues su estabilidad y sus propiedades.

Resultados

Parámetros de calidad



Ácidos Grasos



Método Experimental

Tratamiento de las muestras

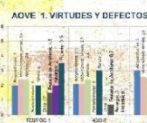
Las muestras, una vez adquiridas, fueron almacenadas hasta el inicio del procedimiento experimental para su análisis en condiciones de almacenamiento adecuadas, al abrigo de la luz y temperatura ambiente, para conservar todas sus propiedades.

Los aceites de oliva eran de las características "Oliva Virgen Extra" (AOVE) de la variedad picual y de la provincia de Jaén. Las muestras estaban envasadas en polietileno (PET). Para el tratamiento térmico en estufa, las temperaturas fueron 40°C y 60°C durante dos y tres semanas, mientras que para 80°C el tiempo en la estufa fue de una semana, puesto que a tiempos superiores se observaron deformaciones en el envase. Una vez finalizado cada tratamiento, volúmenes suficientes de cada muestra se guardaron en botellas de vidrio y en congelador.

Análisis de las muestras

Todos los análisis realizados en esta investigación, se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos para la caracterización de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva establecidos por la normativa del COI [1], o el reglamento de la UE [2].

Análisis Sensorial



Conclusiones

Los aceites de oliva ensayados de la variedad picual mantienen las características propias de la denominación "virgen", a la vista de los resultados obtenidos.

Los componentes minoritarios estudiados conservan la composición propia de un AOVE, lo que permite que se mantengan propiedades tan importantes como la estabilidad frente a la oxidación.

El análisis sensorial pone de manifiesto que las características correspondientes a la denominación de aceite de oliva virgen se mantienen hasta la temperatura de 80°C.

Los resultados de todos los análisis físico-químicos realizados a los AOVE, después de cada tratamiento térmico en estufa, a las temperaturas y tiempos ensayados, para simular una mala conservación o almacenamiento por parte del consumidor o distribuidor comercial, confirman que sigue siendo un alimento seguro y que conserva sus propiedades físico-químicas y nutricionales.

Referencias

- Consejo Oleícola Internacional. 2012 (2012).
- Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. COI/T.15/NC n° 3 (Rev. 2 24 de noviembre de 2006).
- Reglamento (CE) n° 640/2006 de la Comisión, de 4 de julio de 2006. 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.
- Reglamento (CE) n° 1869/2003 de la Comisión, de 6 de noviembre de 2003. 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.
- M.D. Salvador, F. Aranda, G. Fregeante. Chemical composition of commercial Comarcaba virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the American Oil Chemists Society* 11 (1998) 1305-1311.
- S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, M.B. Oliveira. Quantification of tocopherols and tocotrienols in portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *J. Agric. Food Chem.* 54, (2006) 3351-3356.
- A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, M.I. Janer del Valle. Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 22 (1972) 350-355.
- Minguez. Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos. Ediciones Universidad de Sevilla. España (1997) Capítulos VI 103-107/VII, p. 111-148/VIII, 155-157.



Determination of the diffusion coefficient of antimony in waters, oils and juices packaged in PET

M. Dolores La Rubia (1), Felipe Blanca (2), Alfredo Escudero (1), Luis Alfonso Saro (2), Rafael Pacheco (1), Ana B. López (1), Natividad Ramos (2)

(1) Bioprocess Research Group, University of Jaén, (2) Analytical Chemistry Research Group of the University of Jaén

Campus Las Lagunillas s/n Jaén Spain

Email: mdrubia@ujaen.es

Presenting author: M. Dolores La Rubia

Type: Poster
Theme: B. The Environment, Energy, and Sustainability
Topic: B4. Food Chemistry
Keywords: diffusion coefficient, pet, antimony

SUMMARY:

The polyethylene terephthalate (PET) is the main raw material to produce packaging due to its characteristics exceptional and mechanical properties, being Sb₂O₃ the most useful catalysts for synthesis. This compound is categorized by The International Agency for Research on Cancer (IARC) as being possibly carcinogenic to humans [2].

Within the last decade, many studies reported that the migration of PET materials into food is influenced by concentration of migrant in the plastic, type of drink, solubility and storage time and temperature [3, 4].

The objective of this study is to calculate the diffusion coefficient due to migration of Sb from PET to food. For this reason in this study it was evaluated the amount of Sb present in different PET packaging classified into three groups based on their use: bottles of mineral waters, oils and juices.

Samples were coded and subjected to treatment in a heater, controllably varying time (1, 2 and 3 weeks) and temperature conditions (40, 60 and 80 °C) simulating extreme storage conditions. After each treatment, it was determined the Sb amount in food through ICP-MS. The PET samples were weighed, measured and subjected to a predigestion (H₂SO₄, 90 min at T=25°C) and then 8 ml of HNO₃ were added and it was proceed to microwave digestion with temperature ramp to 200°C 10 min, maintaining 15 minutes.

Sb amount contained in the PET samples ranged from 266.35 and 271.30 mg/kg line as described in references [5].

The migration of Sb from PET were calculated according to the simplified equation proposed by Piringir and Baner [6] applicable for migration processes up to 60% of the maximum migration level. The slopes of the plot of the Sb migration against the square root of time were used to the determination of the diffusion coefficient of Sb for each type of PET and food. Table 1 summarizes the results obtained for water samples.

The dependence of the Sb diffusion coefficient on temperature was studied using an Arrhenius equation. The values of the pre-exponential factor and the activation energy for the diffusion process were also calculated for each type of PET and food.

- [1] Bach C, Dauchy X, Chagnon MC, Etienne, S. *Water Research*. 46, 571-583 (2012).
- [2] IARC. *The International Agency for Research on Cancer Monographs*. vol. 47 (1989).
- [3] Westerhoff P, Prapaipong P, Shock E, Hillaireau A. *Water Research*. 42. 551-556 (2008).
- [4] Carneado S, Hernández-Nataren, López-Sánchez JF, Sahuquillo A. *Food Chemistry*, 66, 544-550 (2015).
- [5] Rungchang S, Numthuam S, Qiu X Li, Satake T. *Journal of Food Engineering*, 115, 322-329 (2013).
- [6] Piringir OG, Baner AL. *Plastic Packing*. (2008).



DETERMINATION OF THE DIFFUSION COEFFICIENT OF ANTIMONY IN WATERS, OILS AND JUICES PACKAGED IN PET

Felipe Blanca^a, Alfredo Escudero^a, M. Dolores La Rubia^a, Luis Alfonso Saro^a, Ana B. López^a, Rafael Pacheco^a, Natividad Ramos^a
^aAnalytical Chemistry Research Group of the University of Jaén; ^bBioprocess Research Group of the University of Jaén Campus Las Lagunillas, A2, 23071 Jaén (Spain)



Introduction

The polyethylene terephthalate (PET) is the main raw material to produce packaging due to its characteristics exceptional and mechanical properties, being Sb₂O₃ the most useful catalysts for synthesis. This compound is categorized by The International Agency for Research on Cancer (IARC) as being possibly carcinogenic to humans [2]. Within the last decade, many studies reported that the migration of PET materials into food is influenced by concentration of migrant in the plastic, type of drink, solubility and storage time and temperature [3, 4].

The objective of this study is to calculate the diffusion coefficient due to migration of Sb from PET to food. For this reason in this study it was evaluated the amount of Sb present in different PET packaging classified into three groups based on their use: bottles of mineral waters, oils and juices.

Sb amount contained in the PET samples ranged from 266.35 and 271.30 mg/kg line as described in references [5].

The migration of Sb from PET were calculated according to the simplified equation proposed by Piringer and Baner [6] applicable for migration processes up to 60% of the maximum migration level. The slopes of the plot of the Sb migration against the square root of time were used to the determination of the diffusion coefficient of Sb for each type of PET and food. Table 1 summarizes the results obtained for water samples.

The dependence of the Sb diffusion coefficient on temperature was studied using an Arrhenius equation. The values of the pre-exponential factor and the activation energy for the diffusion process were also calculated for each type of PET and food.

Samples

Different samples of bottled water in PET with different shades of blue and transparent, with the main objective to have evidence of the influence of the same in the different treatments to which they were subjected, as well as the subsequent results were chosen.

It has also used extra virgin olive oil, juices both lemon and orange, all these products have been acquired over a supermarket in the area. So many oils and juices are presented in transparent PET containers of different volumes.



Diffusion Coefficient

The migration of Sb from PET were calculated according to the simplified and modified equation proposed by Piringer and Baner [6] applicable for migration processes up to 60% of the maximum migration level. The slopes of the plot of the Sb migration against the square root of time were used to the determination of the diffusion coefficient of Sb for each type of PET and food.

$$M_{LT} = 2 \cdot A \cdot p_p \cdot c_{p,s} \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}}$$

The dependence of the Sb diffusion coefficient on temperature was studied using an Arrhenius equation. The values of the pre-exponential factor and the activation energy for the diffusion process were also calculated for each type of PET and food.

$$D = D_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \longrightarrow \ln D = \ln D_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Results

Sb amount contained in the PET samples ranged from 266.35 and 271.30 mg/kg as described in references [5].

Oil

T (°C)	Time (weeks)	[Sb] (µg/L)	M _L (µg/L)	D (cm ² /s)
40	0	3.30 · 10 ⁻¹	3.30 · 10 ⁻¹	
	2	1.16 · 10 ⁻²	1.16 · 10 ⁻²	1.70 · 10 ⁻¹⁷
	3	1.06 · 10 ⁻²	1.06 · 10 ⁻²	
60	0	3.30 · 10 ⁻¹	3.30 · 10 ⁻¹	
	2	3.73 · 10 ⁻¹	3.73 · 10 ⁻¹	3.11 · 10 ⁻¹⁷
	3	2.18 · 10 ⁻²	2.18 · 10 ⁻²	
80	0	3.30 · 10 ⁻¹	3.30 · 10 ⁻¹	2.39 · 10 ⁻¹⁷
	1	8.42 · 10 ⁻²	8.42 · 10 ⁻²	

Water

T (°C)	Time (weeks)	[Sb] (µg/L)	M _L (µg/L)	D (cm ² /s)
40	0	0.33	0.33	
	1	0.49	0.49	2.58 · 10 ⁻¹⁸
	3	1.20	0.90	
60	0	0.33	0.33	
	1	3.05	3.05	5.84 · 10 ⁻¹⁸
	2	5.96	5.96	
80	0	0.33	0.33	
	1	25.73	25.73	4.21 · 10 ⁻¹⁷
	2	31.28	31.28	
	3	38.23	38.23	

Lemon Juice

T (°C)	Time (weeks)	[Sb] (µg/L)	M _L (µg/L)	D (cm ² /s)
40	0	0.33	0.33	
	1	0.79	0.79	7.92 · 10 ⁻¹⁷
	2	0.84	0.84	
60	0	0.33	0.33	
	1	2.95	2.95	1.16 · 10 ⁻¹⁶
	2	3.31	3.31	
80	0	0.33	0.33	1.03 · 10 ⁻¹⁶
	1	25.40	25.40	

Orange Juice

T (°C)	Time (weeks)	[Sb] (µg/L)	M _L (µg/L)	D (cm ² /s)
40	0	0.33	0.33	
	1	0.63	0.62	3.32 · 10 ⁻¹⁷
	2	0.39	0.39	
60	0	0.33	0.33	
	1	1.40	1.40	2.50 · 10 ⁻¹⁶
	2	1.50	1.50	
80	0	0.33	0.33	4.68 · 10 ⁻¹⁶
	1	17.25	17.25	



	D ₀ (cm ² /s)	E _a (KJ/mol)
Oil	2.94 · 10 ⁻¹⁸	229.12
Lemon Juice	1.17 · 10 ⁻¹²	162.81
Orange Juice	1.58 · 10 ⁻¹⁶	150
Water	3.10 · 10 ⁻¹⁸	201.21

References

- [1] Bach C, Dauchy X, Chagnon MC, Etienne S. Water Research. 46, 571-583 (2012).
- [2] IARC. The International Agency for Research on Cancer Monographs, vol. 47 (1989).
- [3] Westerhoff P, Prapaipong P, Shock E, Hillaireau A. Water Research. 42, 551-556 (2008).
- [4] Carnado S, Hernández-Nataren, López-Sánchez JF, Sahuquillo A. Food Chemistry, 66, 544-550 (2015).
- [5] Rungchang S, Numthum S, Qiu X, Li, Satake T. Journal of Food Engineering, 115, 322-329 (2013).
- [6] Piringer OG, Baner AL. Plastic Packaging. (2008).

Acknowledgments

University of Jaén: Action by grant 14 aid introduction to research for students of Official Master of the University of Jaén.

Conclusions

- PET colour does not interfered with the antimony migration in water samples thermal treatments tested.
- The join study of time and temperature, show the existence of both parameters in the amount of antimony in the mineral waters packaged, increasing as increase both variables without exceeding the maximum limit allowed of 40 µg/L.
- Of the four types of samples studied, the lemon juice is the food product in which greater amount of antimony is transferred from the material to the food, followed by orange juice and finally the oil with a very low content in antimony.
- The diffusion coefficient and the activation energy obtained in the study correspond to the revised bibliography for authors working in the same temperature range, being the higher coefficient for the lemon juice.



Migration levels of antimony in juices, olive oils and waters bottled in PET. Study of the influence of storage conditions

Rafael Pacheco (1), Alfredo Escudero (2), Luis Alfonso Saro (3), Maria Isabel Soler (3), Lorena López (3), M.Dolores La Rubia (2), Natividad Ramos (3)

(1) Bioprocess Research Group, University of Jaén, (2) Bioprocess Research Group, University of Jaén, (3) Analytical Chemistry Research Group of the University of Jaén

Campus Las Lagunillas s/n Jaén Spain

Email: rpacheco@ujaen.es

Presenting author: Rafael Pacheco

Type: Poster
Theme: B. The Environment, Energy, and Sustainability
Topic: B4. Food Chemistry
Keywords: migration, antimony, PET, storage conditions, Food safety

SUMMARY:

The world worry for food safety, due to the effects that the contaminated or bad conserved food could have in the consumers and the social alarm that it generates, has done that in the last years, the governmental authorities of different countries have taken measurements directed to exercising a major control on the quality and safety of the food.

Polyethylene terephthalate (PET) is the most widespread polymer used for the manufacture of packaging and films in contact with food, especially beverages and drinking water. PET is produced by the polymerization of the monomers terephthalic acid and ethylene glycol by antimony-, titanium- or germanium-based catalyst. But since antimony-based catalysts are the less expensive they account for more than 90% of PET manufactured worldwide [1-2].

The main objectives of this study are to determine the presence of Sb in waters, juices and olive oils from PET film and the influence of temperature and time over the migrations levels. For this purpose different studies were carried out. Samples were stored at different temperatures between 25 and 80 °C for 1, 2 and 3 weeks. All the samples, at the end of its storage conditions were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Water samples were analyzed directly, whereas oils and juices needed an extraction of antimony of theirs matrix through microwave digestion. The limit of detection and quantification were 0.50 and 0.80 mg/L respectively.

In relation to the newly bottled samples, no Sb was detected at initial time for all temperatures studied. However, the Sb concentration increased with both time and temperature. The levels of Sb started exceeding the European limits of 5 µg/L. when the samples were storage at 60 °C for 2 weeks.

[1] Bach C, Dauchy X, Severin I, François Munoz J, Etienne S, Chagnon MC. *Food Chemistry*, 162, 63-71 (2014)

[2] Szymczycha-Madeja A, Welna M. *Food Chemistry* 141 (2013) 3466-3472 (2013)

Migration levels of antimony in juices, olive oils and waters bottled in PET. Study of the influence of storage conditions

A. Escudero^a, L. A. Saro^b, L. López^a, M. I. Soler^a, M. Dolores La Rubia^b, R. Pacheco^b, N. Ramos^a

^a Bioprocess Research Group of the University of Jaén

^b Analytical Chemistry Research Group of the University of Jaén. Campus Las Lagunillas, A2, 23071 Jaén (Spain)



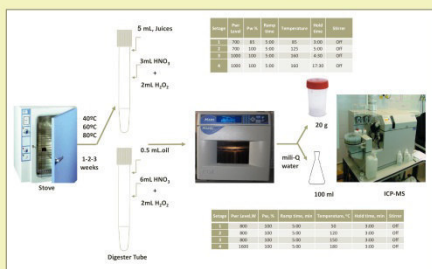
ABSTRACT

The world worry for food safety, due to the effects that the contaminated or bad conserved food could have in the consumers and the social alarm that it generates, has done that in the last years, the governmental authorities of different countries have taken measurements directed to exercising a major control on the quality and safety of the food [1].

Polyethylene terephthalate (PET) is the most widespread polymer used for the manufacture of packaging and films in contact with food, especially beverages and drinking water. PET is produced by the polymerization of the monomers terephthalic acid and ethylene glycol by antimony-, titanium- or germanium-based catalyst. But since antimony-based catalysts are the less expensive they account for more than 90% of PET manufactured worldwide [2-3].

The main objectives of this study are to determine the presence of Sb in waters, juices and olive oils from PET bottle and the influence of temperature and time over the migrations levels. For this purpose different studies were carried out. Samples were stored at different temperatures between 25 and 80 °C for 1, 2 and 3 weeks. All the samples, at the end of its storage conditions were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

EXPERIMENTAL



SAMPLES



Extra Virgin Olive Oil

Variety { Hojiblanca
Picual

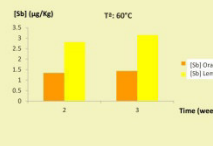
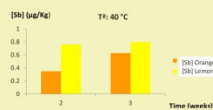


ANALYTICAL PARAMETERS

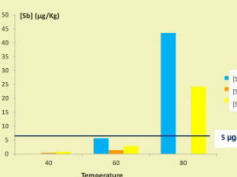
Linear Dynamic Range, µg/L	0.5-10
Regression coefficient	0.9999
Detection limit, µg/L	0.09
Quantification limit, µg/L	0.27
Precision, %	2.64 (10 µg/L)
	2.98 (100 µg/L)
Recovery, %	103.30 (25 µg/L)
	97.20 (100 µg/L)

EXPERIMENTAL RESULTS

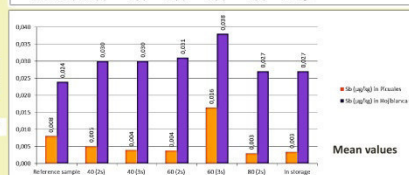
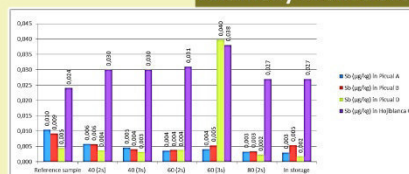
Antimony in juices



Comparison antimony in juices and water



Antimony in olive oils



CONCLUSIONS

- ✓ In this study of migration, samples of juices, have higher Sb than oil extra virgin olive oil samples. These results can be explained by the different PET used to bottled them.
- ✓ The migration levels of Sb into the food show a higher influence with time and temperature in juices than oils.
- ✓ In the lemon juices the antimony concentration at 60 °C is doubled, from two to three weeks.
- ✓ Among the extra virgin olive oil varieties tested, the "hojiblanca" variety has the highest amounts of Sb.
- ✓ Compared to juices, the variation is lower with the heat treatment in oils.
- ✓ Comparing the results of juices and oils with water, only lemon juices exceeds the limit set by the EU, of 5 mg / kg.

REFERENCES

- [1] Regulation (EU) number 10/2011 of 14 January, the Commission, on plastic materials and articles intended to come into contact with foods. As amended by Regulation (EU) number 1183/2012 of 30 November.
- [2] Bach C, Dauchy X, Severin I, François Munoz J, Etienne S, Chagnon MC. *Food Chemistry*, 162, 63-71 (2014)
- [3] Szymczycha-Madeja A, Welna M. *Food Chemistry* 141 (2013) 3466-3472 (2013)

Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido en arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades

Alfredo Escudero Pérez; Rafael Pacheco Reyes*; M. Dolores La Rubia García; Natividad Ramos Martos

Grupo de Investigación "Bioprocesos" (TEP-138). Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071-Jaén, España. * rpacheco@ujaen.es

RESUMEN

Debido a la salubre composición química del Aceite de oliva virgen extra (AOVE) su consumo está experimentando un considerable aumento. El mercado de esta grasa natural, muy localizada por su producción y uso en los países del entorno del Mediterráneo, se está extendiendo tanto en consumo como producción a otras partes del mundo, donde hasta ahora, ha predominado el consumo de otras grasas, tanto vegetales como animales.

Con vistas a la obtención de un producto de calidad, que cumpla con los estándares actuales de Seguridad Alimentaria que se precisan para un mercado destinado al gran consumo, en este trabajo se ha considerado interesante estudiar, la influencia de unas condiciones de almacenamiento inadecuadas durante la trazabilidad del AOVE, sobre la concentración de los metales legislados para dichos aceites, arsénico y plomo.

Las muestras de aceite estudiadas han sido de oliva virgen extra (AOVE), de la variedades, *arbequina*, *hojiblanca* y *picual*, de la provincia de Jaén, envasadas en polietilentereftalato (PET). Para ello, se han sometido a ensayos en el laboratorio, con tratamientos térmicos en estufa a diferentes temperaturas (40°C y 60°C) y tiempos (dos y tres semanas), para posteriormente proceder a la digestión asistida por microondas de las muestras, y su análisis químico mediante ICP-MS. Los resultados obtenidos indican, que el arsénico no ha sido detectado en ninguna muestra de los AOVE, para ninguno de los tratamientos térmicos. Sin embargo, el plomo, presenta concentraciones, en algunas condiciones de tiempo y temperatura, que superan el Límite Máximo de Residuo (LMR), permitidos en las legislaciones actuales.

Palabras Clave: aceite de oliva virgen extra, *arbequina*, *hojiblanca*, *picual*, ICP-MS

INTRODUCCIÓN

Los metales y los metaloides presentes en la corteza terrestre, los suelos, el agua, la atmósfera y la biosfera, que a través de la cadena trófica llegan a los alimentos y a través de la ingesta a personas y animales, son especies estables, ambientalmente persistentes, de eliminación lenta, que se acumulan fácilmente en las plantas y tejidos y sufren transformaciones que llegan a ser aún especies más tóxicas. La importancia de los oligoelementos y los efectos toxicológicos de los metales pesados sobre la salud y la nutrición han sido ampliamente estudiados en los últimos años [1]. Algunos

elementos como Cu, Zn y Fe pueden actuar como nutrientes y son importantes para la salud, mientras que otros como Ni, Pb, Cd, As y Hg pueden ser peligrosos en cantidades excesivas. Por lo tanto, algunos metales pueden ser tóxicos a concentraciones muy bajas (es el caso del Cd y Pb para los que en muchos alimentos, su LMR es de 0.05 y 0.1 mg / kg, respectivamente) [2].

Es relevante indicar, que la ingesta de alimentos se considera una de las principales fuentes de metales tóxicos para los seres humanos. En este sentido, la presencia de algunos metales en la composición mineral de los aceites de oliva, puede deberse a una contaminación natural o indeseables prácticas agrícolas, que permitan que los contaminantes metálicos pasen a través de la aceituna al aceite. De igual modo, durante el proceso de elaboración industrial y de almacenamiento, puede aumentar la incorporación de metales, y empeorar su calidad para el consumo humano [3].

Actualmente, la Seguridad Alimentaria, con todos los antecedentes de crisis alimentarias ocurridos en la últimas décadas, como fueron entre otras la enfermedad de las "vacas locas" (que ocasionó grandes pérdidas en el sector ganadero), la gripe aviar, (que generó en 2006 una alarma que supuso beneficios espectaculares para el sector del pescado congelado), la presencia de dioxinas en los productos cárnicos, (que provocó el cierre de casi 5.000 explotaciones en Alemania), induce a los organismos responsables, a llevar a cabo políticas que apuestan por un enfoque global e integrado de los eslabones de la cadena alimentaria (trazabilidad). Es decir, un control que abarque todas las etapas del proceso productivo y procesado de alimentos, desde la fase primaria hasta el momento en que llegan al consumidor ("de la granja a la mesa"), puesto que todas ellas son determinantes para la inocuidad y calidad del producto alimenticio final. Asimismo, la conservación y manipulación por parte del consumidor están íntimamente relacionadas con la Seguridad Alimentaria, por lo que es una cuestión fundamental conocer en qué condiciones pueden verse alterados los alimentos, como consecuencia de la influencia de distintos factores físico-químicos, así como de las condiciones ambientales.



Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido en arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades - A. Escudero, R. Pacheco, M.D. La Rubia, N. Ramos

Dada la importancia que tiene el consumidor como manipulador de los alimentos, y en nuestro caso del AOV, en este trabajo, se quiere simular el almacenamiento prolongado del AOVE, envasado en polietileno tereftalato (PET), bajo condiciones inadecuadas por parte del consumidor. De esta forma, se podrá comprobar si el contenido en metales pesados, presentes inicialmente en las muestras de aceites, puede verse alterado por fenómenos relacionados con la migración desde el material de plástico utilizado en el envase. Para ello, se han utilizado aceites de las variedades, *arbequina*, *hojiblanca* y *picual* de la provincia de Jaén, que se han almacenado a distintas temperaturas y tiempo, de forma que se imite una mala conservación en los periodos estivales de Andalucía y en otros países de clima similar, con temperaturas muy altas. Considerando también, situaciones debidas al comercio internacional, que este alimento, de gran importancia en la actualidad tiene, como es el caso de los transportes marítimos, durante largos periodos de tiempo y por latitudes muy distintas, lo que suponen, unas condiciones climatológicas muy adversas y diferentes, que hay que tener en cuenta para asegurar una trazabilidad correcta, lo que conllevaría también a establecer una normativa apropiada para su transporte y así asegurar la conservación de su categoría comercial.

Respecto a los niveles máximos de metales pesados en aceite comerciales y en particular de aceite de oliva, a nivel internacional la legislación vigente está regulada por Consejo Oleícola Internacional (COI) [4], siendo la concentración máxima permitida para el Plomo (Pb) y Arsénico (As) de 0.1 mg/kg. En la Unión Europea, la legislación actual [5], para el contenido máximo de determinados contaminantes en alimentos, se encuentra en el Reglamento 1881/2006.

En la bibliografía, se encuentran un elevado número de trabajos científicos sobre la determinación de minerales en aceites Bakkali, K. *et al.*, (2012) [6], Llorent, E. *et al.*, (2014) [7], y Gouvinhas, I. *et al.*, (2016) [8], pero en ningún caso se hace referencia a la influencia que las condiciones de conservación, presentan en el contenido de estos elementos traza legislados.

Por otro lado, no hay que olvidar, que además de los estudios de los minerales considerados de relevancia nutricional, en la última década la determinación de oligoelementos, sirve especialmente para controlar que los procesos de elaboración del aceite, cumplen las normativas de seguridad establecidas. Siendo aún más relevante entonces, la determinación de algunos metales como Al, As, Cd y Pb, verdaderos parámetros de toxicidad [9], que se describen como perjudiciales para la salud humana, por encima de ciertos concentraciones. Este hecho, confirma el

interés y la importancia de los resultados de este trabajo, cuando además los aceites se han sometido a unas condiciones de conservación habituales en algunos de los eslabones de la trazabilidad de la cadena alimentaria.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Preparación de las muestras.

Se ensayaron muestras comerciales de AOVE de las variedades: *picual*, *arbequina* y *hojiblanca* de la temporada de cosechas 2012-13 en Andalucía. Todas las muestras, embotelladas en PET transparente, se compraron en grandes superficies y almazaras. Las muestras de los aceites, se almacenaron correctamente hasta el comienzo del procedimiento experimental.

Para el tratamiento térmico en estufa, las temperaturas fueron, 40°C y 60°C, durante dos y tres semanas. Una vez finalizado cada tratamiento, volúmenes suficientes de cada muestra se guardaron en botellas de vidrio opaco y en congelador.

Tratamiento de las muestras

Para el análisis de las muestras de aceite, se pesó con precisión una cantidad de aproximadamente 0.5 g de todas las muestras, previamente homogeneizadas, en un recipiente de digestión con Teflón. Posteriormente, se sometieron utilizando una mezcla de 6 mL de ácido nítrico y 2 mL de peróxido de hidrógeno en un sistema de digestión por microondas. Las muestras se digirieron según el siguiente programa: etapa 1 (tiempo: 2 min, potencia: 250 W), etapa 2 (tiempo: 2 min, potencia: 0 W), etapa 3 (tiempo: 2 min, potencia: 250 W), etapa 4 (tiempo: 5 min, potencia 400 W), y etapa 5 (tiempo: 5 min, potencia: 600 W).

En la Tabla 1, se muestra la identificación para las muestras de aceite analizadas, en cuanto a su variedad.

Análisis químico mediante ICP-MS

Después de la digestión de las muestras, los extractos se volvieron a disolver en agua ultrapura hasta 100 mL y posteriormente se analizaron mediante ICP-MS. La determinación de As y Pb se midió con un equipo ICP- MS Agilent modelo 7500a, mediante la calibración con patrones de concentraciones conocidas. Cada muestra se analizó por triplicado.

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos experimentalmente, para los diferentes ensayos de tiempos y temperaturas consideradas y para los



Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido en arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades - A. Escudero, R. Pacheco, M.D. La Rubia, N. Ramos

diferentes AOVE, de las variedades estudiadas, en la Figura 1 se muestran los contenidos de Pb en mg/Kg de todas las muestras. Se observa, en primer lugar, que los testigos de picual y hojiblanca ya tienen una concentración presente de Pb ligeramente superior al LMR permitido [4], resultados que en cierto modo se aproximan a los encontrados por otros autores Bakkali, K. *et al.* (2012), y Gouvínhas, I. *et al.* (2016), determinados mediante ICP-MS y GFASS, respectivamente.

En la Figura 2, se representa para cada pareja de valores ensayados de tiempo y temperatura (t, T), la concentración media de Pb en mg/Kg. Se observa que los valores correspondientes a AOVE *picual* y *arbequina* son los más elevados para 60 °C de temperatura y 2 semanas. Sin embargo, el tratamiento de la variedad *arbequina*, presenta un aumento más gradual; apreciándose, que durante una semana más, los valores se mantienen sin variación o, incluso, disminuyen.

En la Figura 3, se observa la variación del aumento por variedad, del contenido en Pb, desde el valor inicial, (testigo), hasta las condiciones más enérgicas del tratamiento. Comprobándose que la variedad *picual* experimenta el mayor aumento en dicho elemento traza.

Por último, en la Figura 4, se representa el aumento, en la diferencia entre el LMR [4] y la máxima concentración obtenida por variedad, que está comprendida en un intervalo comprendido entre un (34.60 y 46.30) %, correspondiendo la mayor diferencia a la variedad *hojiblanca*.

CONCLUSIONES

1. La presencia inicial de Pb en las muestras de AOVE de las distintas variedades de aceitunas, es más frecuente en los de la variedad *picual*.
2. Todos los valores de concentraciones de Pb, encontrados después de los tratamientos térmicos, incluido en testigo, superan el LMR.
3. De las tres variedades de AOVE ensayados, en los de la variedad *arbequina*, la concentración de

plomo muestra un aumento proporcional, a medida que lo hacen los valores de tiempo y temperatura.

4. Los valores máximos de concentración de Pb, para los aceites de las variedades *picual* y *arbequina* se alcanzan para la temperatura de 60°C y un tiempo de dos semanas, mientras que para la variedad *hojiblanca* ocurre a 40°C y a las tres semanas.
5. De los resultados se deduce, la necesidad de controlar los elementos químicos, considerados tóxicos, en los AOVE.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] López S., Bermúdez B, Vareal LM, Ortega A, Jaramillo S, Abial R, Muriana F.J.G. Olives and olive oil: diet and health impacts. *CAB Rev* 7:1-10, (2012).
- [2] Economic European Communities. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Off. J. Eur. Commun. L 364/5-L 364/24, Directive No. 1881/2006, Brussels, 2006.
- [3] Kabata-Pendias A Trace elements in soils and plants, 3rd edc. Taylor & Francis, Boca Raton (2010).
- [4] Consejo Oleícola Internacional, COI/T.15/NC n° 3/Rev. 10 Noviembre de 2015.
- [5] Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión Europea de 19 de diciembre de 2006.
- [6] Bakkali, K. Ramos, N., Souhail, B. Ballesteros, E., Determination of heavy metal content in vegetables and oils from Spain and Morocco by using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Letters*, 454 (2012), 907-919.
- [7] Llorent-Martínez, E., Fernández, ML., Ortega, P., Medina, A., Quantitation of Metals During the Extraction of Virgin Olive Oil from Olives Using ICP-MS after Microwave-assisted acid digestion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2014) 91:1823-1830.
- [8] Gouvínhas, I., Domínguez, R., Nelson, P., Carvalho, T., Matos, C., Barro, A., Effect of Agro-Environmental Factors on the Mineral Content of Olive Oils: Categorization of the Three Major Portuguese Cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2016) 93:813-822.
- [9] Flora SJS, Pachauri V Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* (2010) 7:2745-2788

Tabla 1. Identificación de los aceites

Variedad	
A	picual
B	picual
D	picual
E	arbequina
F	arbequina
G	hojiblanca
H	hojiblanca

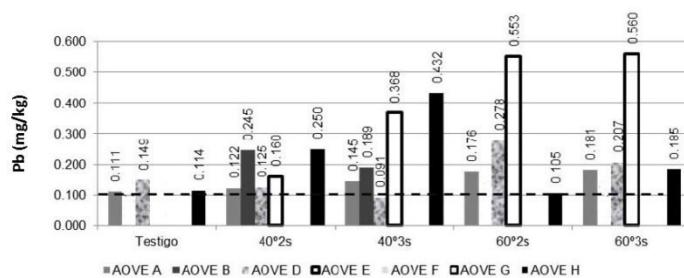


Figura 1. Contenido medio de Pb en mg/kg, por muestra



Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido en arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades - A. Escudero, R. Pacheco, M.D. La Rubia, N. Ramos

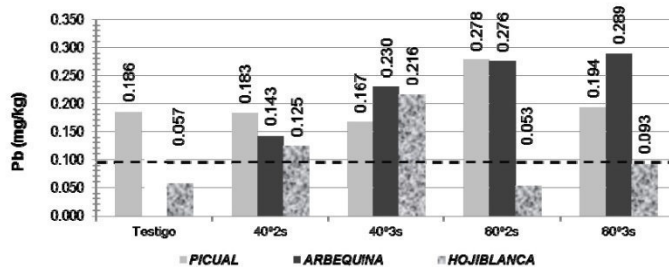


Figura 2. Contenido medio de Pb en mg/kg, por variedad

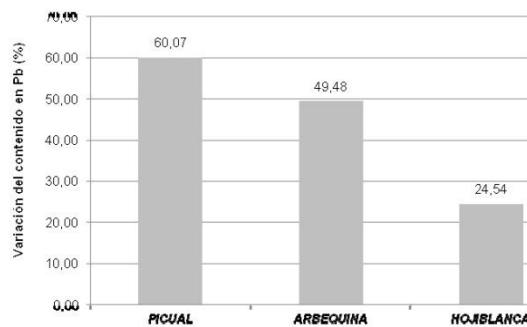


Figura 3. Variación en porcentaje del contenido de Pb



Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido en arsénico y plomo en aceites de oliva virgen extra de distintas variedades - A. Escudero, R. Pacheco, M.D. La Rubia, N. Ramos

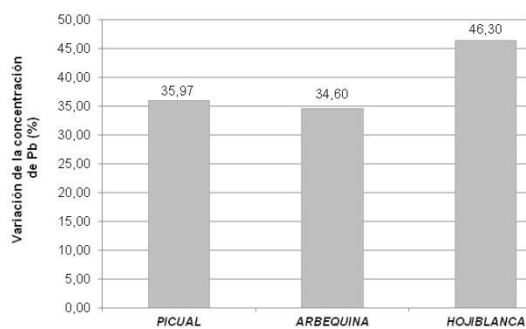
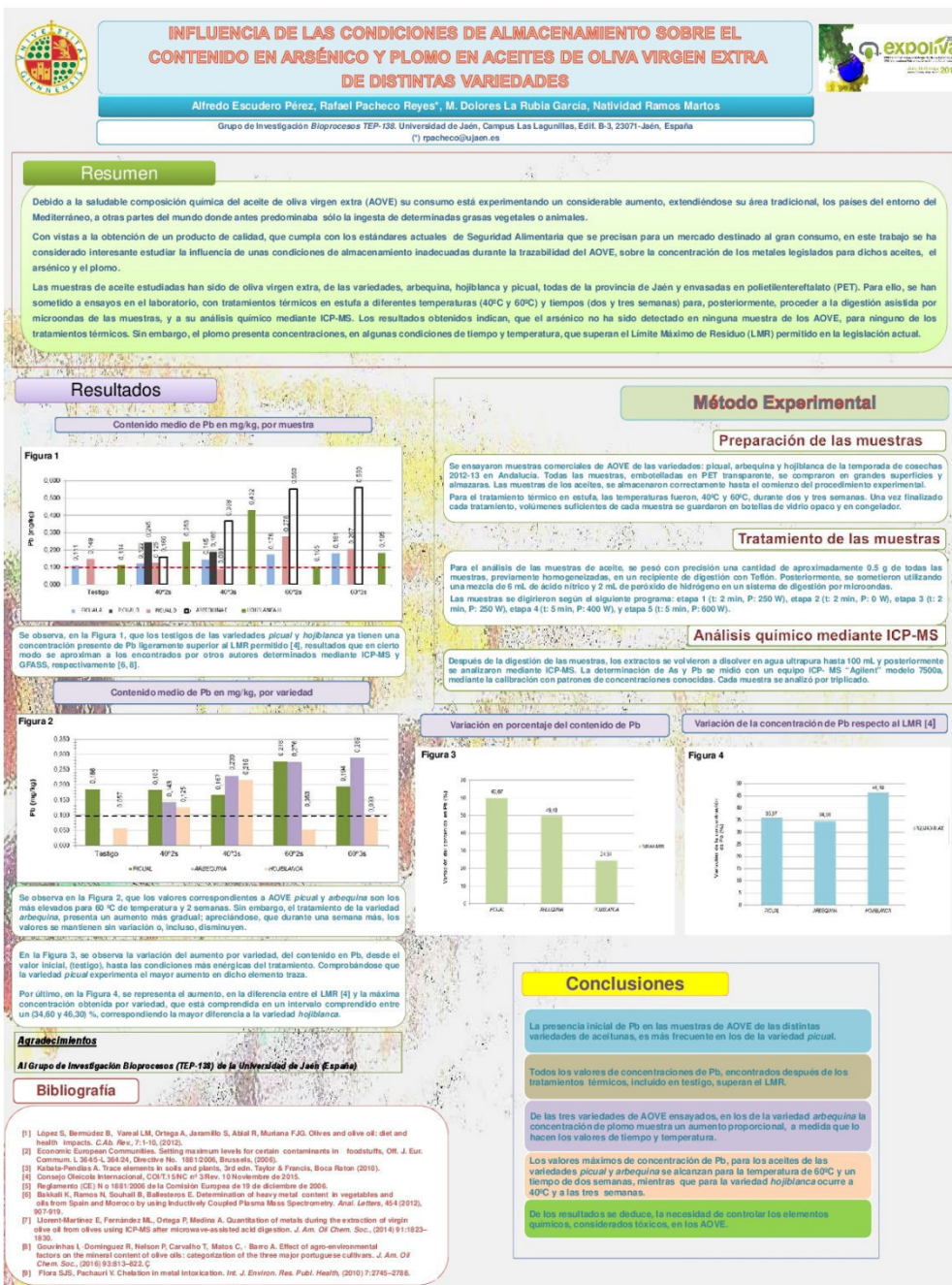


Figura 4. Variación de la concentración de Pb (%), respecto al LMR [4]





ID24469-DETERMINATION OF Sb LEVELS IN TEE, DAIRY AND ISOTONIC DRINKS FROM POLYETHYLENE TEREPHTHALATE (PET) BOTTLES AFTER STORAGE SIMULATION

L. Roldán Lloret, A. Escudero-Pérez, M.D. La Rubia, N. Ramos-Martos.
Bioprocess Research Group of the University of Jaén
Campus Las Lagunillas, B-3 Building, 23071 Jaén (Spain)

Topic 1.- Preparation, packaging and preservation of food and beverages

Nowadays, polyethylene terephthalate (PET) is the most widespread polymer used for the manufacture of packaging and films in contact with food. PET is characterized as a good barrier against gases, high transparency, tensile strength and resistance to wear and great chemical and thermal resistance. PET packages have many advantages as they are suitable for preserving the aroma and flavor of the food.

However, the bad consumer habits such as sunlight exposition, may lead to the degradation of the package and this has a significant impact on the quality of the food [1]. In addition it also affect to the migration of the residual chemical compounds and the rest of the catalysts (Sb_2O_3) or additives used in the manufacture of the plastic.

In this context and in the absence of many scientific works in this field, the objective of this study is to determine the presence of Sb in tee, dairy and isotonic drinks from PET bottle and the influence of temperature and time over the migrations levels. Samples were stored at 40, 60 y 70 °C for 2 and 3 weeks. All the samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) at the end of these storage conditions.

The results show that the Sb concentration is ranged between 0.84 µg/L and 9.25 µg/L. The dairy drinks have the highest Sb concentration, probably due to their complexity in terms of ingredients and composition of the drink. In addition the bottles of these drinks were of minor volume which confirmed the hypothesis of Tukur *et al.* (2012) about the inverse relationship between bottle size and the extent to which Sb migration occurs [2]. For drinks bottled in PET the specific migration levels are 40 µg/L in Europe [3] and 50 µg/L in Japan [4].

REFERENCES

- [1] Greifenstein M, Duvel WW, Stubner A, Hout J and Whelton AJ. Science of the Total Environment 456–457: 376–383 (2013).
- [2] Tukur, A., Sharp, L., Stern, B., Tizaoui, C. and Benkreira, H. Journal of Environmental Monitoring, 14: 1237-1247 (2012).
- [3] European Union (2011). Commission Regulation (EU) No.10/2011. On plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Commission L12: 1–84.
- [4] JETRO (2009). Japan External Trade Organization.

DETERMINATION OF Sb LEVELS IN TEE, DAIRY AND ISOTONIC DRINKS FROM POLYETHYLENE TEREPHTHALATE (PET) BOTTLES AFTER STORAGE SIMULATION



L. Roldán Lloret, A. Escudero-Pérez, M. D. La Rubia, N. Ramos-Martos

Bioprocess Research Group of the University of Jaén. Campus Las Lagunillas, B-3, 23071 Jaén (Spain)



ABSTRACT

Nowadays, polyethylene terephthalate (PET) is the most widespread polymer used for the manufacture of packaging and films in contact with food. PET is characterized as a good barrier against gases, high transparency, tensile strength and resistance to wear and great chemical and thermal resistance. PET packages have many advantages as they are suitable for preserving the aroma and flavor of the food. However, the bad consumer habits such as sunlight exposition, may lead to the degradation of the package and this has a significant impact on the quality of the food [1]. In addition it also affect to the migration of the residual chemical compounds and the rest of the catalysts (Sb_2O_3) or additives used in the manufacture of the plastic. In this context and in the absence of many scientific works in this field, the objective of this study is to determine the presence of Sb in tea, dairy and isotonic drinks from PET bottle and the influence of temperature and time over the migrations levels. Samples were stored at 40, 60 y 70 °C for 2 and 3 weeks. All the samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) at the end of these storage conditions.

The results show that the Sb concentration is ranged between 0.84 $\mu\text{g/L}$ and 9.25 $\mu\text{g/L}$. The dairy drinks have the highest Sb concentration, probably due to their complexity in terms of ingredients and composition of the drink. In addition the bottles of these drinks were of minor volume which confirmed the hypothesis of Tukur et al. (2012) about the inverse relationship between bottle size and the extent to which Sb migration occurs [2]. For drinks bottled in PET the specific migration levels (SML) are 40 $\mu\text{g/L}$ in Europe [3] and 50 $\mu\text{g/L}$ in Japan [4].

METHODOLOGY

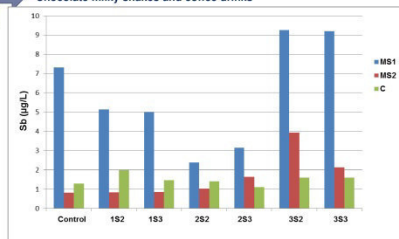


RESULTS

Analytical performance				
Element	MS (ppb)	ICP (ppb)	ICP-MS (ppb)	Recovery (%)
Sb	0.500	0.25	0.25	104.93

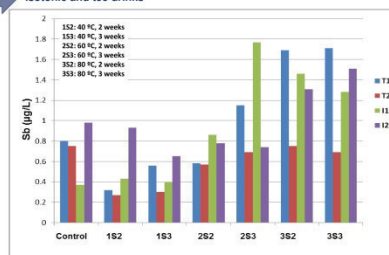
Sb SML in drinks = 40 $\mu\text{g/L}$

Chocolate milky shakes and coffee drinks



Sb SML in water = 20 $\mu\text{g/L}$

Isotonic and tea drinks



REFERENCES

- [1] Gredemann M, Düvel WW, Stübner A, Hout J and Whiston AJ. Science of the Total Environment 456-457: 376-383 (2013).
- [2] Tukur, A., Sharp, L., Stern, B., Tizabi, C. and Benkara, H. Journal of Environmental Monitoring 14: 1237-1247 (2012).
- [3] European Union (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011. On plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Communities L32: 1-24.
- [4] JETRO (2008). Japan External Trade Organization.

CONCLUSIONS

- The Sb concentration present in the food is related to the time and temperature of the storage conditions.
- The relationship between the Sb concentration in food and the volume of the package is inverse.
- The milky shakes reach the maximum of Sb concentration detected after 3 weeks at 70°C.
- The Sb concentrations didn't exceed the SML limited.



ID24468-DETERMINATION OF HEAVY METALS (As, Cd, Pb) IN FOODSTUFFS BY ICP-MS

L. Roldán Lloret, A. Escudero-Pérez*, L. López Montoro, M. D. La Rubia, N. Ramos-Martos, M. I. Soler

Bioprocess Research Group of the University of Jaén
Campus Las Lagunillas, B-3, 23071 Jaén (Spain)

Topic 2.-Food Quality and Safety. Traceability

Currently, the continuous vigilance and perseverance of the food safety authorities in order to maintain the food safety, requires considering environmental pollution as one of the main risk factors in the traceability of foodstuffs. This aspect is not controlled in many countries and it could be a potential contamination risk in the international food trade at any stage of the food chain. Therefore, it is necessary to maintain a continuous investigation to know and update the concentration levels of the chemical contaminants in the raw materials in order to establish new Maximum Residue Limit (MRL) which prevents health risks.

The main objective of this study is to determine the concentrations of heavy metals present in food before packaging. The foodstuffs analyzed were juices, milk products (milk shakes and coffee drinks) isotonic drinks, teas and olive oil of the varieties *arbequina*, *hojiblanca* and *picual*. These foodstuffs are common in the diet and all of them were packaged in polyethylene terephthalate (PET).

The different foodstuffs samples have been adequately treated, using microwave digester and acid treatment, for the extraction of toxic elements. They were analyzed by ICP-MS technique which guarantees detection limits (DL), suitable precision and accuracy.

The Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 and its subsequent amendments, (EC) No 629/2008 and (EC) No 420/2011 set the maximum residue levels (MRL) fixed for heavy metals (Cd, Hg, Pb and Sn) in foodstuffs. The Commission Regulation (EC) No 488/2014, (EC) No 2015/1005 and 2015/1006 are amending of the Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of Cd, organic As and Pb in foodstuffs respectively. MRL for olive oil samples are regulated by COI/T.15/NC No 3/Rev. 11 July 2016 of the International Olive Council.

The results show that Pb is present in all the foodstuffs analyzed in this study. As is only present in the milk products and Cd is present in the juices and milk products. The limit values established in the above-mentioned legislation were not exceeded.

DETERMINATION OF HEAVY METALS (As, Cd, Pb) IN FOODSTUFFS BY ICP-MS



L. Roldán Lloret, A. Escudero-Pérez, L. López Montoro, M. D. La Rubia, N. Ramos-Martos, M. I. Solera



Bioprocess Research Group of the University of Jaén. Campus Las Lagunillas, edif. B-3, 23071 Jaén (Spain)

ABSTRACT

Currently, the continuous vigilance and perseverance of the food safety authorities in order to maintain the food safety, requires considering environmental pollution as one of the main risk factors in the traceability of foodstuffs. This aspect is not controlled in many countries and it could be a potential contamination risk in the international food trade at any stage of the food chain. Therefore, it is necessary to maintain a continuous investigation to know and update the concentration levels of the chemical contaminants in the raw materials in order to establish new Maximum Residue Limit (MRL) which prevents health risks. The main objective of this study is to determine the concentrations of heavy metals present in food before packaging. The foodstuffs analyzed were juices, milk products (milk shakes and coffee drinks) isotonic drinks, teas and olive oils of the varieties *Arbequina*, *Hojiblanca* and *Picual*. These foodstuffs are common in the diet and all of them were packaged in polyethylene terephthalate (PET).

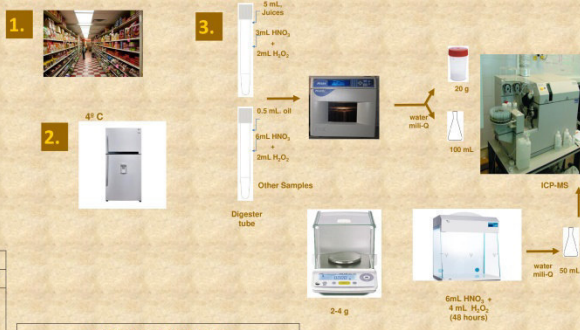
The different foodstuffs samples have been adequately treated, using microwave digester and acid treatment, for the extraction of toxic elements. They were analyzed by ICP-MS technique which guarantees detection limits (DL), suitable precision and accuracy. The Commission Regulation (EC) No 1831/2006 of 19 December 2006 and its subsequent amendments, (EC) No 629/2008 and (EC) No 420/2011 set the maximum residue levels (MRL) fixed for heavy metals (Cd, Hg, Pb and Sn) in foodstuffs. The Commission Regulations (EC) No 488/2014, (EC) No 2015/1005 and 2015/1006 are amending of the Regulation (EC) No 1831/2006 as regards maximum levels of Cd, organic As and Pb in foodstuffs respectively. Maximum residues levels for olive oil samples are regulated by COI/T.15/NC No 3/Rev. 11 July 2016 of the International Olive Council.

The results show that Pb is present in all the foodstuffs analyzed in this study. As is only present in the milk products and Cd is present in the juices and milk products. The limit values established in the above-mentioned legislation were not exceeded.

METHODOLOGY

Samples	Type	Containers
Olive Oil	<i>Arbequina</i>	PET
	<i>Hojiblanca</i>	
Dairy products	<i>Picual</i>	
	Milk chocolate shake	
Isotonic drinks	Coffee drinks	PET
	Brand A	
Teas	Brand B	
	Brand A	
Juice	Lemon	
	Orange	

SAMPLING (1), CONSERVATION (2) AND TREATMENT (3)



RESULTS

Analytical performance				
Element	RDL	LD (µg/L)	CV%	Recovery %
As	0.1-100	0.021		
Cd		0.008	1.40-5.04	96.60-103
Pb	1-200	0.08		

LMR, mg/kg (UE)		
Element	Oils	Food
As	0.1	(0.100-0.300)
Cd	-	(0.005-0.006)
Pb	0.1	(0.020-0.030)

TOXIC ELEMENTS IN SAMPLES				
Food	As	Cd	Pb	
Olive oils	ND	ND	✓	
Juices				
Lemon	ND	ND	✓	
Orange		✓	✓	
Coffee drinks, dairy products	✓	✓	✓	
Isotonic drinks	✓	ND	✓	
Teas	✓	ND	✓	

ND: not detected; ✓: Detected

CONCLUSIONS

- As, Cd and Pb are present in all the samples analyzed.
- Pb is the only toxic element that is present in all the food samples.
- Dairy products and coffee drinks contain the three toxic elements analyzed.

REFERENCES

COI/T.15/NC No 3/Rev. 11 July 2016 of the International Olive Council
Commission Regulation (EC) No 488/2014, (EC) No 2015/1005 and 2015/1006

ANEXOS DE TABLAS Y FIGURAS

1. ANEXO DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de antimonio en el aceite de oliva, en $\mu\text{g}/\text{kg}$, expresado como valor medio $\pm$ desviación típica

Muestra	Concentración			Muestra	Concentración		
Testigo-A	2,203	$\pm$	0,06	Tes-F	16,190	$\pm$	0,10
Estu-40(2)-A	5,232	$\pm$	0,25	Estu402-F	31,199	$\pm$	0,18
Estu-40(3)-A	4,909	$\pm$	0,27	Estu403-F	36,321	$\pm$	0,40
Estu-60(2)-A	4,766	$\pm$	0,03	Estu-602-F	32,930	$\pm$	0,40
Estu-60(3)-A	8,686	$\pm$	0,22	Estu603-F	39,375	$\pm$	0,47
Almacén-A	3,124	$\pm$	0,17	Almacén-F	26,562	$\pm$	0,31
Testigo-B	1,670	$\pm$	0,04	Tes-G	7,060	$\pm$	0,01
Estu402-B	3,990	$\pm$	0,21	Estu402-G	7,996	$\pm$	0,08
Estu403-B	5,301	$\pm$	0,04	Estu403-G	8,911	$\pm$	0,08
Estu602-B	6,253	$\pm$	0,17	Estu-602-G	6,370	$\pm$	0,02
Estu603-B	10,007	$\pm$	0,01	Estu603-G	10,192	$\pm$	0,11
Almacén-B	10,918	$\pm$	0,01	Almacén-G	10,456	$\pm$	0,03
Testigo-C	2,981	$\pm$	0,05	Tes-H	4,627	$\pm$	0,20
Estu-40(2)-C	5,750	$\pm$	0,40	Estu402-H	8,438	$\pm$	0,22
Estu-40(3)-C	10,314	$\pm$	0,43	Estu403-H	9,670	$\pm$	0,12
Estu-60(2)-C	21,397	$\pm$	0,20	Estu-602-H	12,463	$\pm$	0,29
Estu-60(3)-C	15,967	$\pm$	0,14	Estu603-H	12,474	$\pm$	0,23
Almacén-C	18,461	$\pm$	0,80	Almacén-H	14,227	$\pm$	0,05

Tabla 1. (Cont.)

Muestra	Concentración			Muestra	Concentración		
Testigo-D	2,506	±	0,16	LS1-C	16,882	±	0,65
Estu-40(2)-D	4,495	±	0,08	LS2-C	23,904	±	0,17
Estu-40(3)-D	6,482	±	0,35	LS3-C	20,297	±	0,01
Estu-60(2)-D	8,088	±	0,50	LS4-C	19,934	±	0,01
Estu-60(3)-D	8,160	±	0,01	LS1-E	7,014	±	0,45
Almacén-D	3,497	±	0,32	LS2-E	4,215	±	0,38
Testigo-E	3,182	±	0,06	LS3-E	5,151	±	0,24
Estu-40(2)-E	6,433	±	0,01	LS4-E	7,199	±	0,55
Estu-40(3)-E	7,373	±	0,23	LS1-H	9,364	±	0,16
Estu-60(2)-E	10,902	±	0,70	LS2-H	10,793	±	0,01
Estu-60(3)-E	10,971	±	0,26	LS3-H	11,485	±	0,55
Almacén-E	4,217	±	0,01	LS4-H	9,385	±	0,18

Tabla 2. Presencia de metales pesados en el aceite de oliva, en $\mu\text{g}/\text{kg}$ expresado como valor medio $\pm$ desviación típica

Arsénico			
Muestra	Concentración		
Testigo-A	6,802	$\pm$	0,17
Almacén-A	1,752	$\pm$	0,12
Testigo-B	0,463	$\pm$	0,20
Almacén-B	1,680	$\pm$	0,12
Testigo-C	2,492	$\pm$	0,12
Almacén-C	1,850	$\pm$	0,13
Testigo-D	3,237	$\pm$	0,13
Almacén-D	3,390	$\pm$	0,12
Testigo-E	0,240	$\pm$	0,09
Almacén-E	1,590	$\pm$	0,09
Tes-F	1,520	$\pm$	0,10
Almacén-F	0,680	$\pm$	0,07
Tes-G	0,181	$\pm$	0,08
Almacén-G	1,280	$\pm$	0,09
Tes-H	0,700	$\pm$	0,37
Almacén-H	0,530	$\pm$	0,02

Cadmio			
Muestra	Concentración		
Testigo-A	1,439	$\pm$	1,35
Almacén-A	0,136	$\pm$	0,03
Testigo-B	6,661	$\pm$	2,73
Almacén-B	0,620	$\pm$	0,49
Testigo-C	0,430	$\pm$	0,33
Almacén-C	0,560	$\pm$	0,49
Testigo-D	0,400	$\pm$	0,66
Almacén-D	0,950	$\pm$	0,99
Testigo-E	8,679	$\pm$	4,24
Almacén-E	0,921	$\pm$	0,02
Tes-F	2,160	$\pm$	1,15
Almacén-F	1,612	$\pm$	2,22
Tes-G	0,460	$\pm$	0,22
Almacén-G	0,720	$\pm$	0,21
Tes-H	3,168	$\pm$	1,42
Almacén-H	1,700	$\pm$	2,09

Plomo			
Muestra	Concentración		
Testigo-A	90,400	$\pm$	5,47
Almacén-A	329,940	$\pm$	4,11
Testigo-B	83,420	$\pm$	6,50
Almacén-B	33,904	$\pm$	4,79
Testigo-C	178,400	$\pm$	10,35
Almacén-C	202,852	$\pm$	1,86
Testigo-D	53,083	$\pm$	0,64
Almacén-D	18,805	$\pm$	0,25
Testigo-E	55,585	$\pm$	2,69
Almacén-E	64,208	$\pm$	5,49
Tes-F	30,503	$\pm$	1,50
Almacén-F	24,698	$\pm$	0,32
Tes-G	169,633	$\pm$	5,23
Almacén-G	28,143	$\pm$	1,81
Tes-H	109,434	$\pm$	1,75
Almacén-H	24,085	$\pm$	0,32

Tabla 3. Parámetros de calidad y componentes minoritarios del AOVE (resultados expresados como valor medio $\pm$ desviación típica)

Muestra	Grado acidez (%)	Peróxidos	k232	k268	Polifenoles (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)	Carotenoides (mg/kg)	Tocoferoles (mg/kg)
Testigo-B	0,090 $\pm$ 0,001	10,6 $\pm$ 0,9	1,77 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,01	116,6 $\pm$ 18,1	1,43 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,04	169,7 $\pm$ 6,4
Estu-40(2)-B	0,140 $\pm$ 0,001	7,2 $\pm$ 0,2	1,66 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	146,5 $\pm$ 4,9	1,32 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,11	162,3 $\pm$ 4,5
Estu-40(3)-B	0,180 $\pm$ 0,002	7,8 $\pm$ 0,3	1,74 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	192,6 $\pm$ 9,0	1,24 $\pm$ 0,17	0,88 $\pm$ 0,09	167,5 $\pm$ 11,7
Estu-60(2)-B	0,130 $\pm$ 0,001	5,6 $\pm$ 0,2	1,84 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	176,4 $\pm$ 25,7	1,27 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,05	109,9 $\pm$ 5,5
Estu-60(3)-B	0,130 $\pm$ 0,001	6,3 $\pm$ 0,1	1,71 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,02	164,2 $\pm$ 2,7	1,24 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,02	90,1 $\pm$ 1,5
Testigo-C	0,110 $\pm$ 0,001	8,4 $\pm$ 0,2	1,89 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01	144,0 $\pm$ 0,4	1,78 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,01	148,9 $\pm$ 7,6
Estu-40(2)-C	0,140 $\pm$ 0,002	8,6 $\pm$ 0,1	1,79 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,01	177,7 $\pm$ 4,0	1,82 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,04	165,4 $\pm$ 6,2
Estu-40(3)-C	0,110 $\pm$ 0,001	9,3 $\pm$ 0,3	1,80 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	113,8 $\pm$ 15,6	1,79 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,07	158,5 $\pm$ 3,4
Estu-60(2)-C	0,110 $\pm$ 0,001	6,6 $\pm$ 0,8	1,88 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,01	130,9 $\pm$ 10,5	1,63 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,07	145,8 $\pm$ 0,1
Estu-60(3)-C	0,110 $\pm$ 0,002	6,3 $\pm$ 0,7	1,97 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,01	115,3 $\pm$ 2,4	1,74 $\pm$ 0,02	1,04 $\pm$ 0,01	135,3 $\pm$ 2,7
Testigo-E	0,060 $\pm$ 0,003	9,4 $\pm$ 0,2	0,93 $\pm$ 0,01	0,060 $\pm$ 0,002	69,4 $\pm$ 0,5	1,58 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,04	151,5 $\pm$ 4,0
Estu-40(2)-E	0,080 $\pm$ 0,001	8,0 $\pm$ 0,2	0,96 $\pm$ 0,04	0,080 $\pm$ 0,003	60,6 $\pm$ 2,5	1,53 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,03	168,4 $\pm$ 4,1
Estu-40(3)-E	0,090 $\pm$ 0,001	8,5 $\pm$ 0,3	0,98 $\pm$ 0,01	0,090 $\pm$ 0,001	59,4 $\pm$ 0,263	1,51 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,04	158,9 $\pm$ 10,0
Estu-60(2)-E	0,080 $\pm$ 0,002	6,2 $\pm$ 0,2	0,94 $\pm$ 0,01	0,110 $\pm$ 0,002	50,8 $\pm$ 0,4	1,59 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,00	181,0 $\pm$ 7,1
Estu-60(3)-E	0,090 $\pm$ 0,003	5,46 $\pm$ 0,04	2,15 $\pm$ 0,02	0,180 $\pm$ 0,003	57,1 $\pm$ 12,2	1,50 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,02	160,6 $\pm$ 0,8
Testigo-H	0,030 $\pm$ 0,002	5,2 $\pm$ 0,2	0,72 $\pm$ 0,03	0,050 $\pm$ 0,003	176,0 $\pm$ 2,6	1,02 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,05	116,1 $\pm$ 5,9
Estu-40(2)-H	0,100 $\pm$ 0,004	5,5 $\pm$ 0,1	0,73 $\pm$ 0,02	0,050 $\pm$ 0,002	186,1 $\pm$ 6,2	1,00 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,03	69,6 $\pm$ 2,0
Estu-40(3)-H	0,090 $\pm$ 0,003	6,0 $\pm$ 0,1	0,78 $\pm$ 0,02	0,060 $\pm$ 0,003	185,5 $\pm$ 2,9	1,03 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	59,6 $\pm$ 2,0
Estu-60(2)-H	0,080 $\pm$ 0,002	5,2 $\pm$ 0,2	0,72 $\pm$ 0,03	0,070 $\pm$ 0,002	168,7 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02	41,8 $\pm$ 1,1
Estu-60(3)-H	0,080 $\pm$ 0,002	4,6 $\pm$ 0,02	1,84 $\pm$ 0,05	0,150 $\pm$ 0,001	164,1 $\pm$ 6,0	1,01 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,02	35,8 $\pm$ 0,2

Tabla 4. Ácidos grasos en el AOVE (resultados en % expresados como valor medio $\pm$ desviación típica)

Muestra	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C:20:1	C18:3
Testigo-B	10,52 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,01	0,050 $\pm$ 0,007	0,090 $\pm$ 0,001	3,40 $\pm$ 0,03	80,47 $\pm$ 0,45	4,06 $\pm$ 0,03	0,620 $\pm$ 0,023	0,41 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,03
Estu-40(2)-B	10,41 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,01	0,050 $\pm$ 0,003	0,090 $\pm$ 0,003	3,30 $\pm$ 0,05	80,01 $\pm$ 0,08	4,08 $\pm$ 0,03	0,640 $\pm$ 0,003	0,41 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01
Estu-40(3)-B	10,38 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,01	0,050 $\pm$ 0,004	0,100 $\pm$ 0,001	3,24 $\pm$ 0,02	80,05 $\pm$ 0,09	4,04 $\pm$ 0,01	0,660 $\pm$ 0,002	0,42 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,04
Estu-60(2)-B	10,36 $\pm$ 0,35	0,81 $\pm$ 0,03	0,050 $\pm$ 0,006	0,100 $\pm$ 0,001	3,23 $\pm$ 0,04	80,20 $\pm$ 0,17	4,04 $\pm$ 0,03	0,650 $\pm$ 0,005	0,40 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
Estu-60(3)-B	10,43 $\pm$ 0,41	0,80 $\pm$ 0,01	0,050 $\pm$ 0,006	0,090 $\pm$ 0,001	3,33 $\pm$ 0,02	79,98 $\pm$ 0,08	4,02 $\pm$ 0,01	0,640 $\pm$ 0,001	0,40 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,03
Testigo-C	10,92 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,01	0,060 $\pm$ 0,005	0,090 $\pm$ 0,003	3,11 $\pm$ 0,02	80,14 $\pm$ 0,080	3,44 $\pm$ 0,09	0,660 $\pm$ 0,007	0,410 $\pm$ 0,001	0,280 $\pm$ 0,018
Estu-40(2)-C	10,73 $\pm$ 0,09	0,89 $\pm$ 0,07	0,040 $\pm$ 0,003	0,130 $\pm$ 0,039	3,08 $\pm$ 0,04	80,39 $\pm$ 0,082	3,43 $\pm$ 0,02	0,660 $\pm$ 0,003	0,400 $\pm$ 0,002	0,260 $\pm$ 0,005
Estu-40(3)-C	10,41 $\pm$ 0,22	0,91 $\pm$ 0,02	0,040 $\pm$ 0,001	0,090 $\pm$ 0,004	2,90 $\pm$ 0,04	80,89 $\pm$ 0,232	3,47 $\pm$ 0,03	0,670 $\pm$ 0,011	0,380 $\pm$ 0,004	0,250 $\pm$ 0,001
Estu-60(2)-C	10,60 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,02	0,050 $\pm$ 0,001	0,080 $\pm$ 0,001	3,03 $\pm$ 0,06	80,57 $\pm$ 0,230	3,44 $\pm$ 0,06	0,670 $\pm$ 0,003	0,410 $\pm$ 0,008	0,270 $\pm$ 0,001
Estu-60(3)-C	6,01 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,42	0,040 $\pm$ 0,007	0,090 $\pm$ 0,004	3,33 $\pm$ 0,21	85,09 $\pm$ 4,956	3,60 $\pm$ 0,20	0,70 $\pm$ 0,041	0,420 $\pm$ 0,028	0,270 $\pm$ 0,015
Testigo-E	11,45 $\pm$ 0,02	1,38 $\pm$ 0,07	0,130 $\pm$ 0,010	0,280 $\pm$ 0,009	1,95 $\pm$ 0,04	74,13 $\pm$ 0,02	9,02 $\pm$ 0,07	0,690 $\pm$ 0,014	0,410 $\pm$ 0,015	0,350 $\pm$ 0,020
Estu-40(2)-E	11,06 $\pm$ 0,24	1,44 $\pm$ 0,07	0,120 $\pm$ 0,003	0,260 $\pm$ 0,008	2,03 $\pm$ 0,06	74,43 $\pm$ 0,17	9,10 $\pm$ 0,04	0,650 $\pm$ 0,005	0,410 $\pm$ 0,002	0,370 $\pm$ 0,020
Estu-40(3)-E	10,80 $\pm$ 0,51	1,42 $\pm$ 0,02	0,130 $\pm$ 0,001	0,270 $\pm$ 0,001	2,03 $\pm$ 0,01	74,64 $\pm$ 0,34	9,12 $\pm$ 0,10	0,640 $\pm$ 0,002	0,430 $\pm$ 0,020	0,370 $\pm$ 0,010
Estu-60(2)-E	11,31 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,07	0,120 $\pm$ 0,009	0,270 $\pm$ 0,001	2,06 $\pm$ 0,07	74,18 $\pm$ 0,04	9,00 $\pm$ 0,04	0,670 $\pm$ 0,032	0,440 $\pm$ 0,018	0,360 $\pm$ 0,016
Estu-60(3)-E	12,06 $\pm$ 0,07	1,40 $\pm$ 0,01	0,130 $\pm$ 0,001	0,270 $\pm$ 0,002	2,07 $\pm$ 0,04	73,62 $\pm$ 0,06	8,88 $\pm$ 0,07	0,630 $\pm$ 0,002	0,420 $\pm$ 0,001	0,360 $\pm$ 0,002
Testigo-H	9,93 $\pm$ 0,02	0,820 $\pm$ 0,001	0,100 $\pm$ 0,002	0,570 $\pm$ 0,003	3,18 $\pm$ 0,05	77,25 $\pm$ 0,07	6,58 $\pm$ 0,04	0,760 $\pm$ 0,005	0,430 $\pm$ 0,003	0,300 $\pm$ 0,003
Estu-40(2)-H	8,72 $\pm$ 0,01	0,850 $\pm$ 0,008	0,100 $\pm$ 0,001	0,180 $\pm$ 0,003	3,03 $\pm$ 0,01	78,82 $\pm$ 0,06	6,78 $\pm$ 0,01	0,780 $\pm$ 0,003	0,420 $\pm$ 0,004	0,310 $\pm$ 0,008
Estu-40(3)-H	10,12 $\pm$ 0,06	0,850 $\pm$ 0,007	0,100 $\pm$ 0,002	0,170 $\pm$ 0,001	3,08 $\pm$ 0,02	77,63 $\pm$ 0,03	6,56 $\pm$ 0,05	0,760 $\pm$ 0,001	0,420 $\pm$ 0,001	0,300 $\pm$ 0,007
Estu-60(2)-H	10,47 $\pm$ 0,08	0,820 $\pm$ 0,006	0,110 $\pm$ 0,002	0,170 $\pm$ 0,001	3,32 $\pm$ 0,01	77,14 $\pm$ 0,07	6,48 $\pm$ 0,02	0,750 $\pm$ 0,003	0,440 $\pm$ 0,001	0,300 $\pm$ 0,000
Estu-60(3)-H	10,44 $\pm$ 0,04	0,820 $\pm$ 0,006	0,450 $\pm$ 0,002	0,240 $\pm$ 0,004	3,31 $\pm$ 0,02	76,82 $\pm$ 0,32	6,45 $\pm$ 0,02	0,730 $\pm$ 0,001	0,430 $\pm$ 0,006	0,310 $\pm$ 0,008

Tabla 5. Análisis sensorial. Defectos y virtudes de los aceites de oliva B, C, E y H

Clave	Características de la muestra	Atrojado/ borras	Moho- húmedo terroso	Avinado	Aceituna helada	Rancio	Otros	Frutado de Aceituna	Amargo	Picante	Clasificación
RP8	Testigo B	2	2,4	2,4	0	2	0	1,5	2	3,5	Virgen
LL2	Estu-40(3)-B	2,1	2,1	2,4	0	3	0	0,7	0	0	Virgen
AT4	Estu-60(3)-B	3	2,6	2,5	0	3,6	0	0,9	0	0	Virgen o Lampante
UV1	Estu-80(1d)B	2,9	2,2	2,9	0	0	0	1	0	0	Virgen
JU2	Testigo C	1,7	2	1,5	0	1,9	0	1,5	2,4	3	Virgen
JT7	Estu-40(3)-C	1,7	1,8	1,9	0	2,1	0	0,9	0	0	Virgen
AP6	Estu-60(3)-C	1,9	1,5	2,5	0	2,2	0	0,9	0	0	Virgen
PQ5	Estu-80(1d)C	3,4	2,9	2,2	0	2,5	0	0,9	0	0	Lampante
EU7	Testigo E	2,0	1,6	1,3	0,0	2,4	0,0	2,5	0,0	2,2	Virgen
GN5	Estu-40(3)-E	2,3	2,4	2,0	0,0	3,0	0,0	1,5	0,0	1,8	Virgen
DE5	Estu-60(3)-E	2,5	1,3	3,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	Lampante
GS3	Estu-80(1d)E	2,7	1,0	2,7	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,9	Virgen
CD3	Testigo H	0,0	1,0	1,1	0,0	0,0	0,0	3,5	3,0	3,9	Virgen
CL2	Estu-40(3)-H	2,2	1,5	2,4	0,0	2,0	0,0	2,0	2,5	3,2	Virgen
XR2	Estu-60(3)-H	2,1	2,0	2,2	1,6	2,1	0,0	1,8	2,4	3,8	Virgen
HU4	Estu-80(1d)H	1,0	1,2	1,5	0,0	0,0	0,0	2,4	2,6	3,5	Virgen

2. ANEXO DE FIGURAS

ANEXO .2.1. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL GRADO DE ACIDEZ

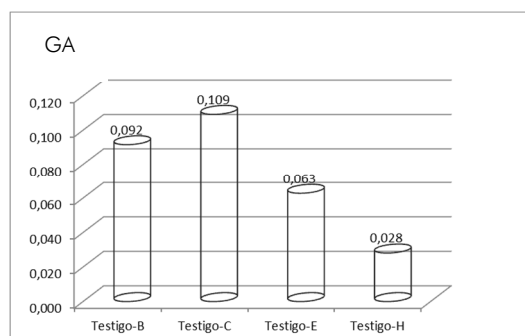


Figura 1. Comparativa para el grado de acidez en Testigos, sin tratamiento térmico

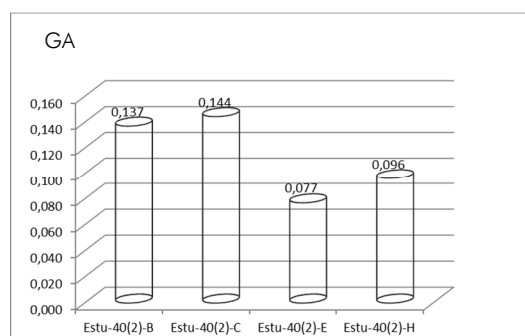


Figura 2. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 40°C durante 2 semanas

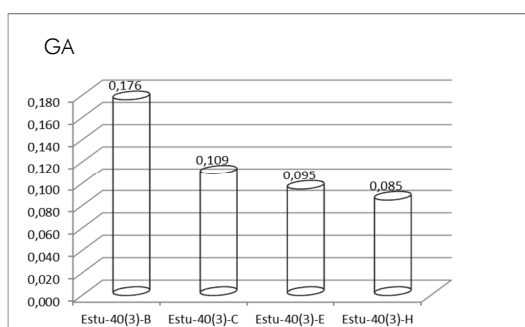


Figura 3. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 40°C durante 3 semanas

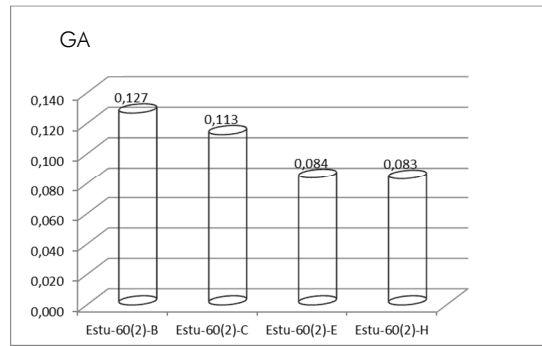


Figura 4. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 60°C durante 2 semanas

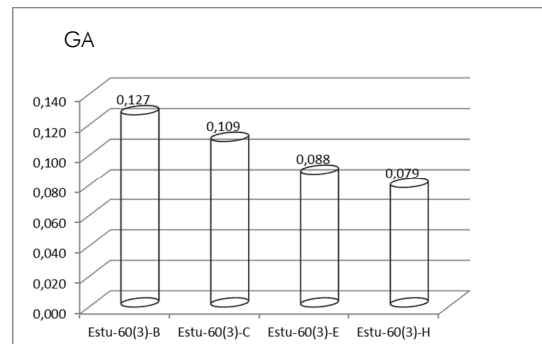


Figura 5. Comparativa para el grado de acidez en Estufa a 60°C durante 3 semanas

ANEXO 2.2. FIGURAS DEL ESTUDIO DE PERÓXIDOS

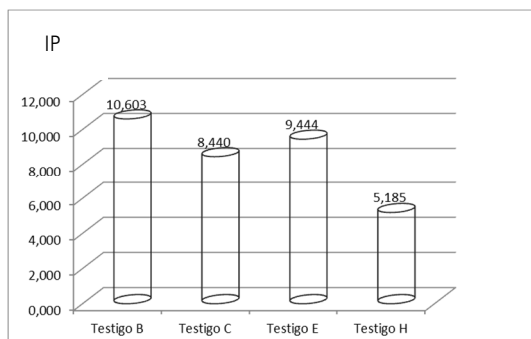


Figura 6. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico

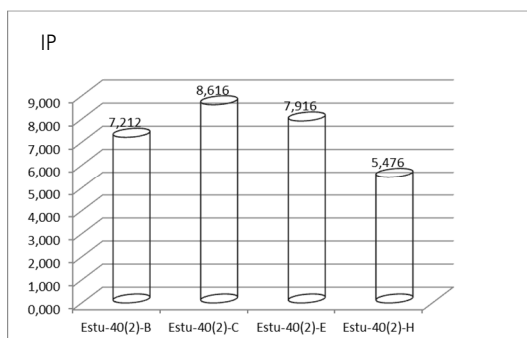


Figura 7. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas

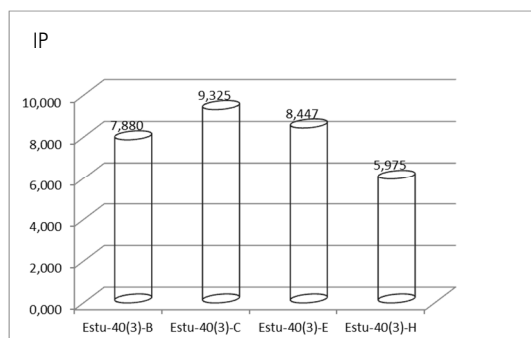


Figura 8. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas

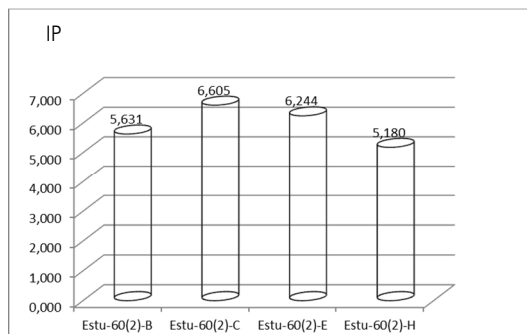


Figura 9. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas

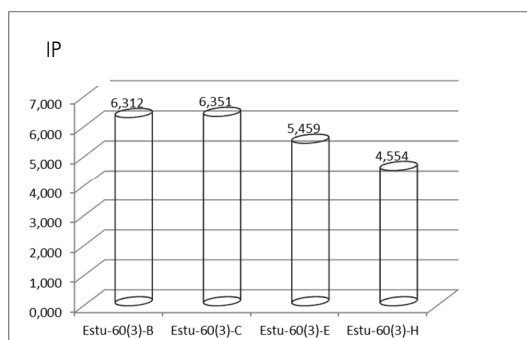


Figura 10. Comparativa de peróxidos (meq/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas

ANEXO 2.3. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN K_{232}

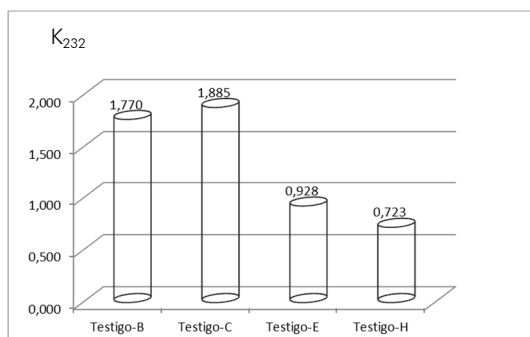


Figura 11. Gráfica comparativa de los K_{232} en Testigos, sin tratamiento térmico

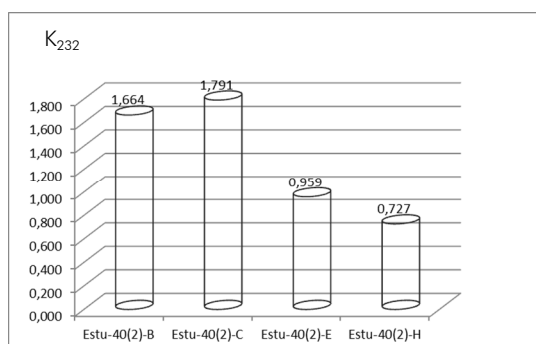


Figura 12. Comparativa de los K_{232} en estufa a 40° durante 2 semanas

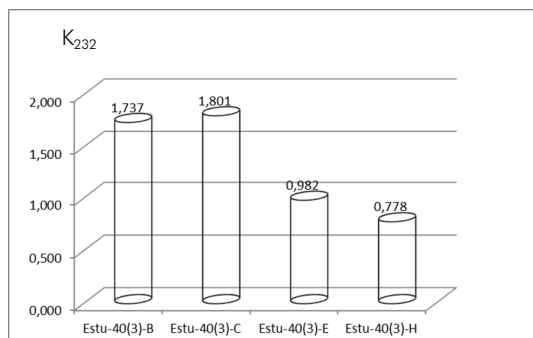


Figura 13. Comparativa de los K_{232} en estufa a 40° durante 3 semanas

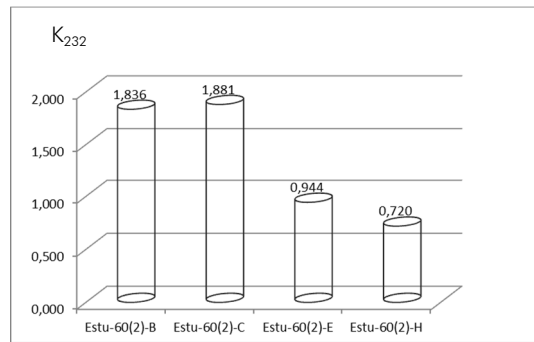


Figura 14. Comparativa de los K_{232} en estufa a 60° durante 2 semanas

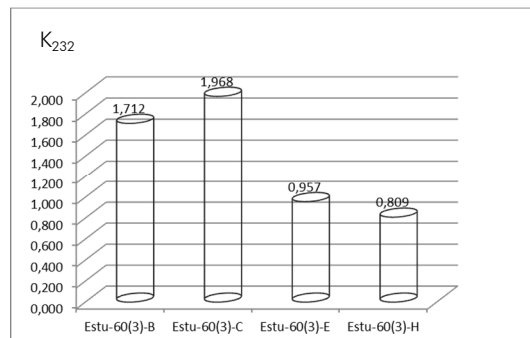


Figura 15. Comparativa de los K_{232} en estufa a 60° durante 3 semanas

ANEXO.2.4. FIGURAS DEL ESTUDIO DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN K_{268}

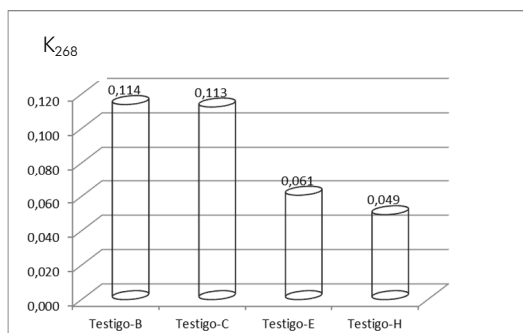


Figura 16. Comparativa de los K_{268} en Testigos, sin tratamiento térmico

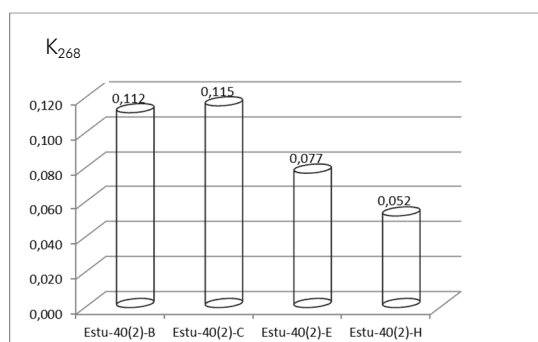


Figura 17. Comparativa de los K_{268} en estufa a 40° durante 2 semanas

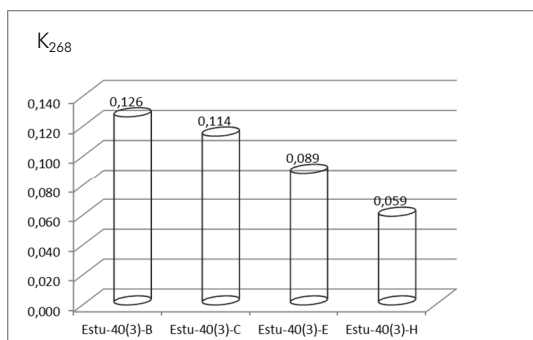


Figura 18. Comparativa de los K_{268} en estufa a 40° durante 3 semanas

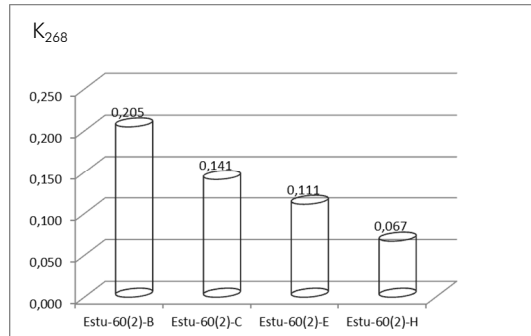


Figura 19 Gráfica comparativa de los K₂₆₈ en estufa a 60° durante 2 semanas

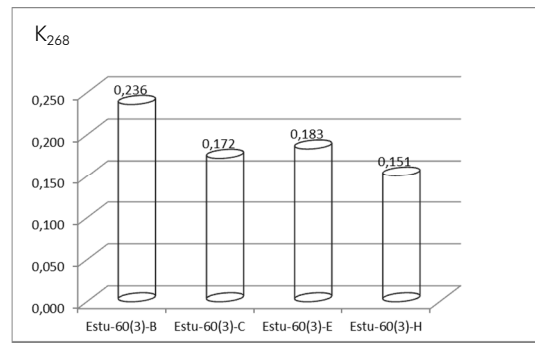


Figura 20. Gráfica comparativa de los K₂₆₈ en estufa a 60° durante 3 semanas

ANEXO 2.5. FIGURAS DEL ESTUDIO DE ÁCIDOS GRASOS

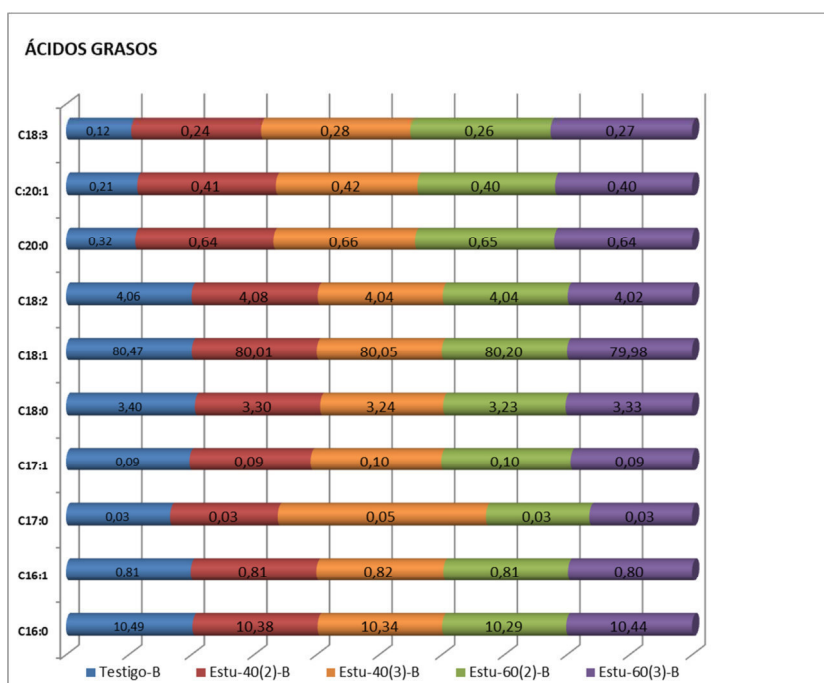


Figura 21. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE B

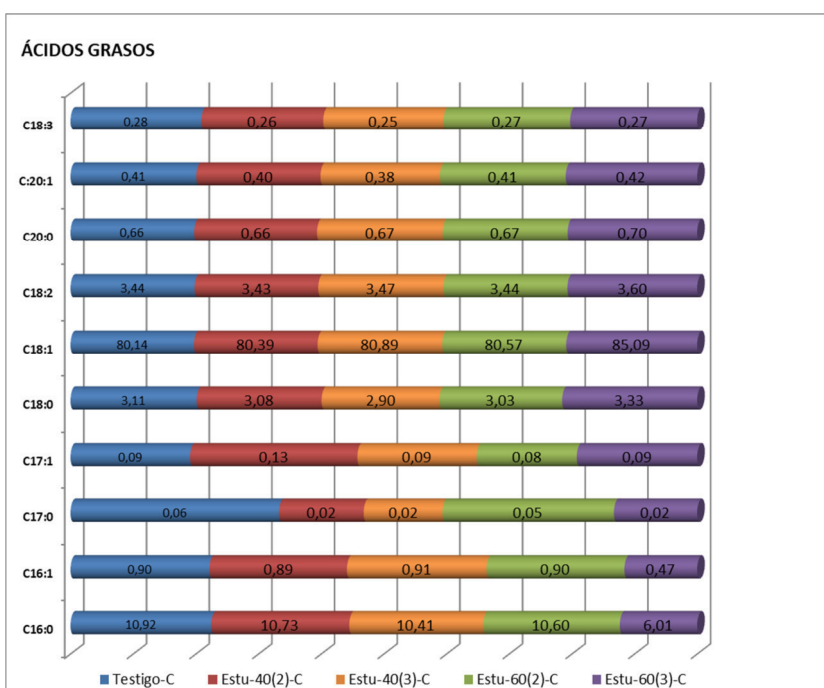


Figura 22. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE C

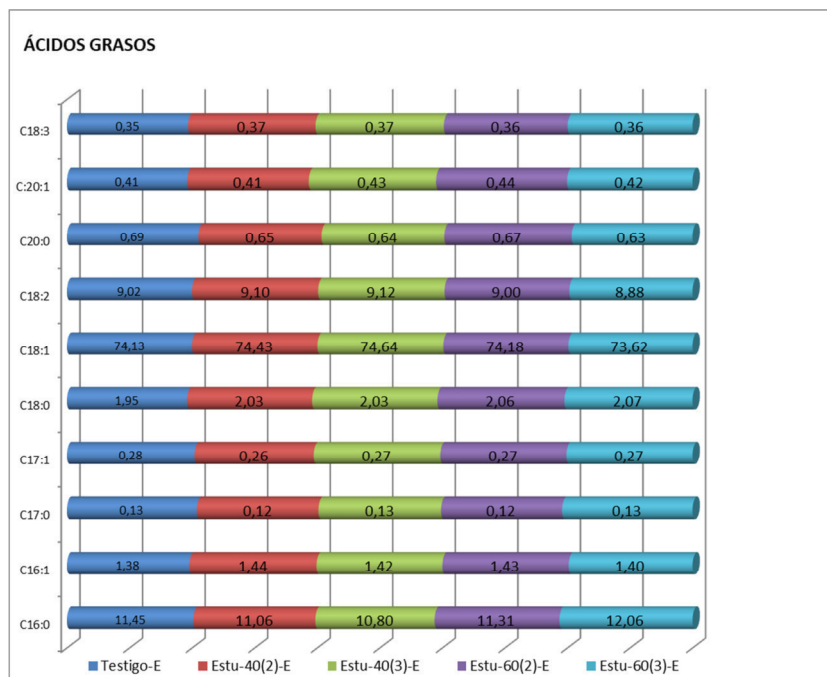


Figura 23. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE E

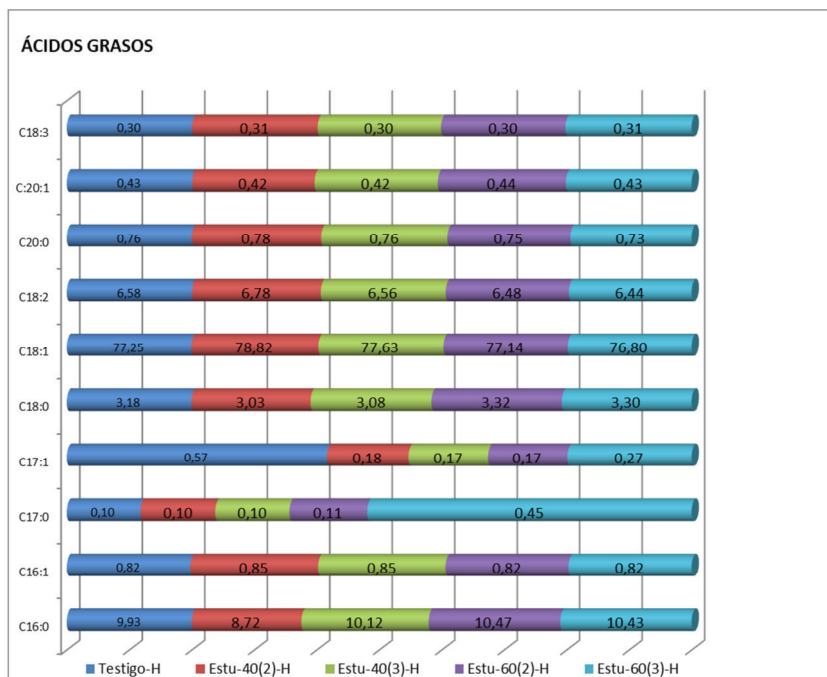


Figura 24. Evolución de los ácidos grasos con el tratamiento térmico en el AOVE H

ANEXO 2.6. FIGURAS DEL ESTUDIO DE LOS COMPONENTES MINORITARIOS

Anexo 2.6.1. Fenoles

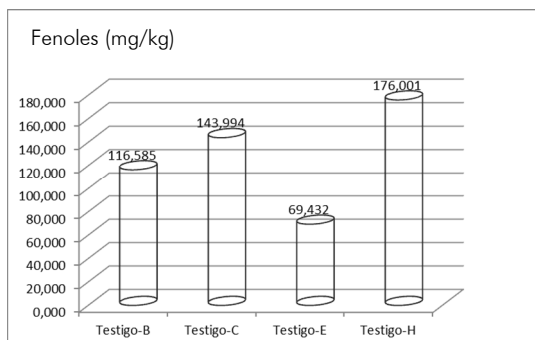


Figura 25. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico

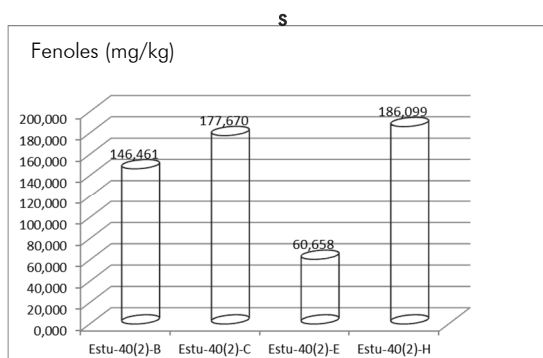


Figura 26. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 40°C y 2 semana

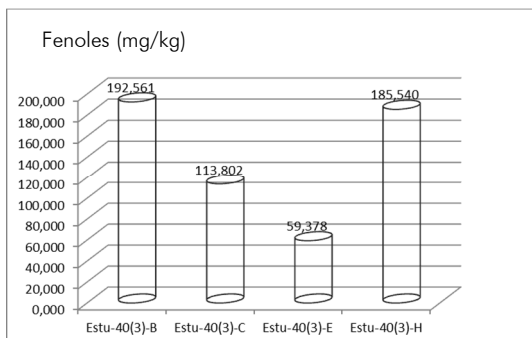


Figura 27. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 40°C y 3 semanas

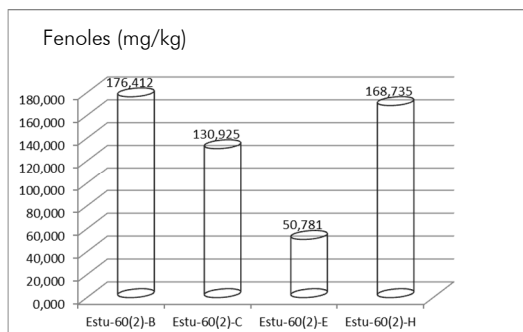


Figura 28. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 60°C y 2 semanas

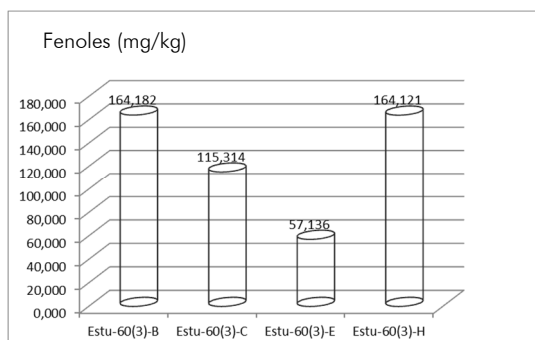


Figura 29. Comparativa de los fenoles totales (mg/kg) en estufa a 60°C y 3 semanas

Anexo.2 6.2. Pigmentos (clorofilas y carotenoides)

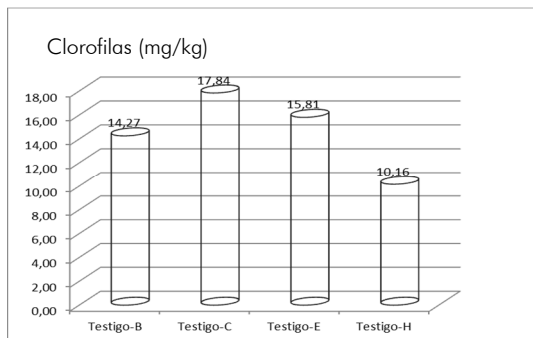


Figura 30. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico

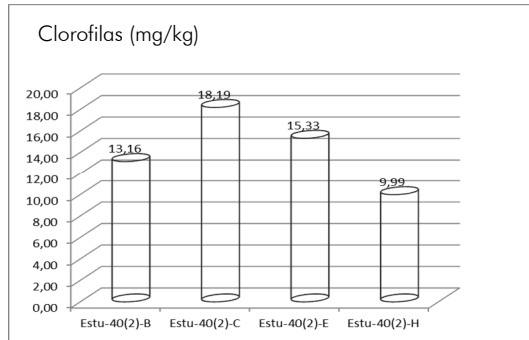


Figura 31. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas

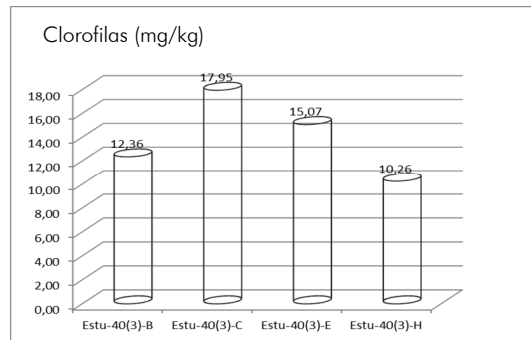


Figura 32. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas

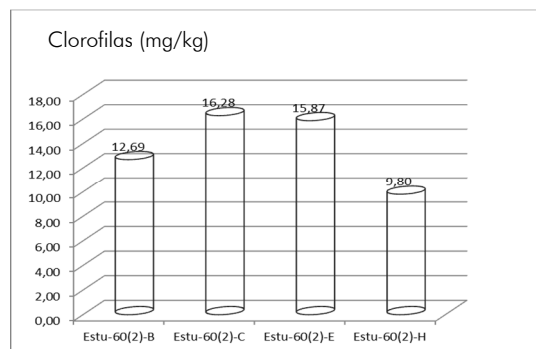


Figura 33. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas

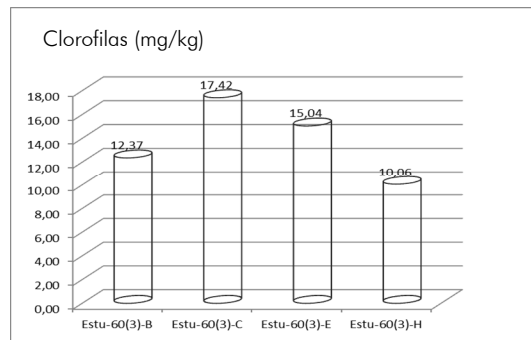


Figura 34. Comparativa de clorofilas (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas

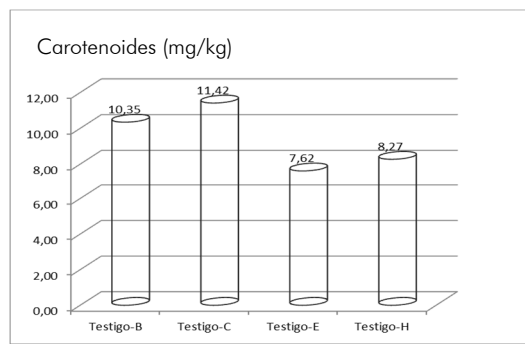


Figura 35. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico

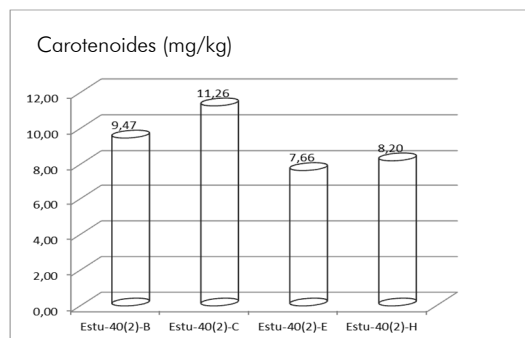


Figura 36. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas

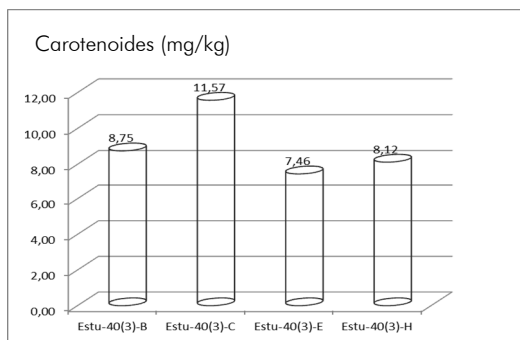


Figura 37. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas

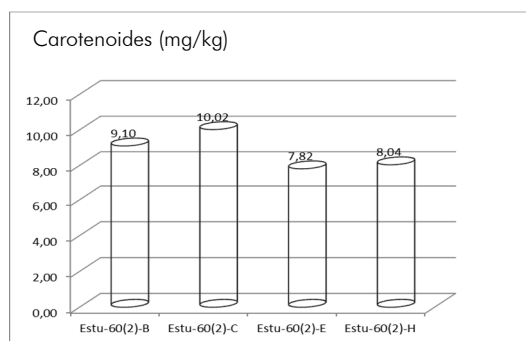


Figura 38. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas

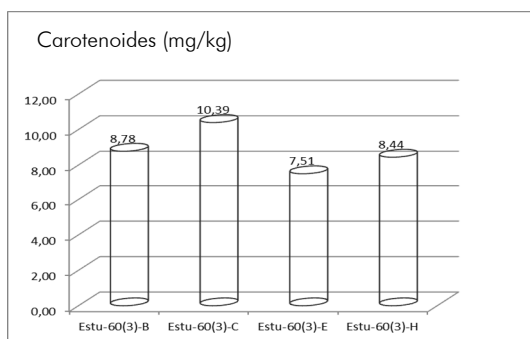


Figura 39. Comparativa de carotenoides (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas

Anexo 2.6.3. α -Tocoferoles

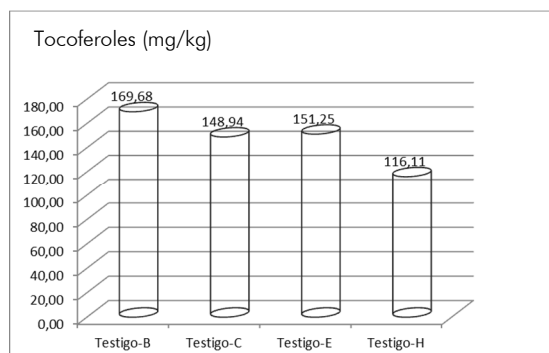


Figura 40. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en Testigos, sin tratamiento térmico

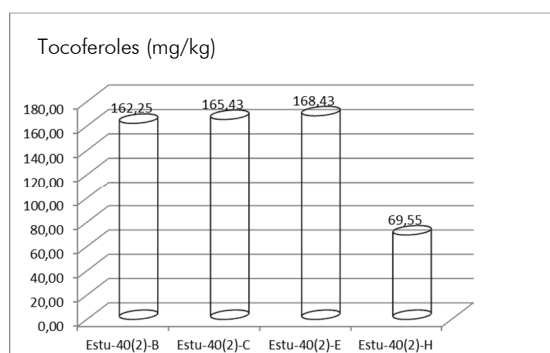


Figura 41. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 40° durante 2 semanas

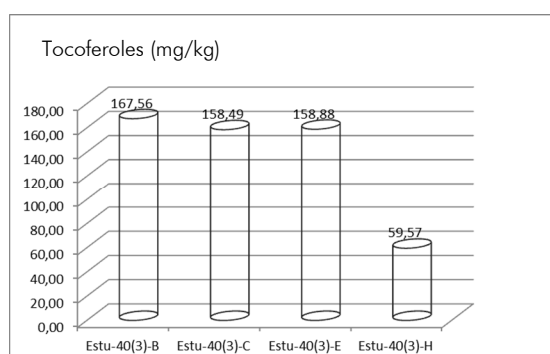


Figura 42. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 40° durante 3 semanas

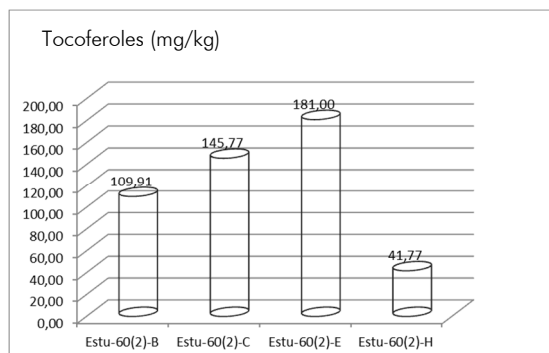


Figura 43. Comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 60° durante 2 semanas

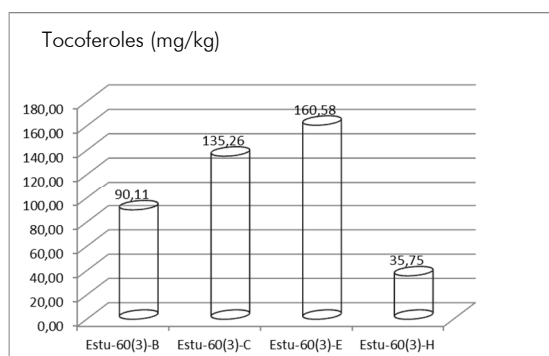


Figura 44. Gráfica comparativa de α -tocoferoles (mg/kg) en estufa a 60° durante 3 semanas

