

Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén

Por A. García Sánchez¹, N. Ramos Martos² y E. Ballesteros^{1*}

¹ Departamento de Química Física y Analítica. Escuela Politécnica Superior de Linares, 23700 Linares, Jaén. E-mail: eballes@ujaen.es;

² Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Ciencias Experimentales, 23071, Jaén.

RESUMEN

Estudio comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén.

Se ha estudiado la viabilidad de dos métodos analíticos (espectroscopía de infrarrojo cercano y espectroscopía de resonancia magnética nuclear) para la determinación de humedad y contenido graso en aceitunas y orujo. Los resultados obtenidos son similares, en términos de precisión y exactitud, con los conseguidos usando el Método Oficial basado en la extracción Soxhlet. Las ventajas que presentan ambos métodos con respecto al Oficial (reducción de la manipulación de la muestra, reducción del consumo de reactivos y disolventes, y disminución del tiempo de análisis) hace que se puedan proponer como métodos normalizados de un laboratorio para la determinación de ambos parámetros en aceitunas y orujo.

PALABRAS-CLAVE: Aceituna - Extracción Soxhlet - Grasa - Humedad - NIR - Orujo - RMN.

SUMMARY

Comparative study of various analytical techniques (NIR and NMR spectroscopies, and Soxhlet extraction) for the determination of the fat and moisture content of olives and pomace obtained from Jaén (Spain).

The suitability of two analytical techniques (viz. near infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy) for the determination of moisture and fat content of olives and pomace was determined. The results obtained from the two techniques were similar in terms of accuracy and precision to those provided by the official method, which is based on Soxhlet extraction. On the other hand, the proposed methods involve less intensive sample handling, use reagents and solvents more sparingly and are faster than the official method. This allows for their adoption as standard laboratory methods for the determination of analytical parameters in both olives and pomace.

KEY-WORDS: Fat - Moisture - NIR - NMR - Olives - Pomace - Soxhlet extraction.

1. INTRODUCCIÓN

En los países de la ribera del Mediterráneo se ha cultivado el olivo desde miles de años. Las aceitunas y el aceite procedentes de este árbol han contribuido de forma muy significativa a la dieta de sus habitan-

tes y es una parte más de la civilización que se ha desarrollado allí. Aunque el aceite de oliva ha tenido otros usos a lo largo de la historia (medicina y combustible), este se puede considerar como un alimento básico en la dieta mediterránea y es muy apreciado internacionalmente por su aroma y por su contribución a la prevención y control de enfermedades cardiovasculares y otras.

Se conocen muchas especies de olivo, pero la más extendida es la «Olea Europea». La composición media de la aceituna es: 50 % de agua, 22 % de aceite, 19.1 % de hidratos de carbono, 5.8 % de celulosa, 1.6 % de proteínas y 1.5 % de minerales (Boskou, 1998). No obstante, la composición de la aceituna puede variar dependiendo del tipo de aceituna, momento de su recolección, método de recogida, almacenamiento, tiempo entre la recogida y el procesado en la almazara. El momento más apropiado para la recolección de las aceitunas destinadas a la extracción de aceite, es cuando el fruto alcanza su maduración óptima. En este momento, el contenido en aceite y la calidad del mismo, se encuentran a su nivel más alto (Kiritsakis, 1991).

La determinación de los dos componentes principales de la aceituna, el aceite y el agua de vegetación, tiene una primordial importancia. El contenido total en aceite es la base para pagar a los agricultores por la riqueza en esta fracción de la aceituna que aportan a la almazara. Por lo tanto, el conocimiento de este parámetro es necesario para evaluar el rendimiento del proceso de fabricación de la aceituna. Por otro lado, el agua de vegetación de la propia aceituna afecta a distintas variables de regulación del sistema de elaboración y sobretodo a los denominados de dos fases y que están relacionadas con el rendimiento industrial, como son: la posición respecto del eje de rotación y del punto de salida del aceite, y la adición de agua al decantador centrífugo (Hermoso et al., 1998).

Se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación del contenido en aceite de las aceitunas. Todos los métodos proporcionan datos de

contenidos totales o parciales de aceite en la aceituna, pero no de la cantidad real de aceite que se va obtener en el proceso de elaboración de este alimento (rendimiento industrial). Este rendimiento se calcula de una manera estimada a partir de la información que ofrecen los diferentes métodos para la determinación del contenido en aceite, realizando una corrección mediante el uso de un factor variable que depende de la humedad, porcentaje de materia seca y desengrasada, extractabilidad, contenido de aceite en el orujo, etc. (Civantos, 1999).

Para la determinación en aceitunas del agua de vegetación y del contenido de aceite se han desarrollado diferentes métodos, en la mayoría de los casos caracterizados por la lentitud de etapas de la desecación en estufa y extracción en Soxhlet (Norma UNE 55030), por el uso de disolventes orgánicos (Soxhlet y Autelec) y por ser métodos destructivos que modifican las características de la muestra respecto al estado original (Frias et al., 1991; Kmiecik et al., 1991). Estos inconvenientes han originado que se desarrollen nuevas metodologías que ofrezcan información rápida y precisa, y que sean limpias para el medio ambiente. Entre las técnicas que emplean en la actualidad las nuevas metodologías, se puede destacar a la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) (Guillen y Cabo, 1997) y a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Guillen y Ruiz, 2001).

La aplicación de la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano en la industria agroalimentaria se perfila como la solución actual para satisfacer las necesidades de un control de calidad de los alimentos. Entre las ventajas que han permitido su desarrollo se encuentran las de ser una técnica no destructiva, escasa preparación de muestra, rapidez de respuesta, bajo coste, alta precisión, ser una técnica no contaminante y suministrar información simultánea de diferentes parámetros de calidad para productos muy diversos (Osborne, 1993). El empleo de la técnica NIR en la industria oleícola resulta de gran interés y utilidad para la determinación de ciertos parámetros analíticos como son contenido graso, humedad, acidez en muestras de aceitunas, aceite y orujo (Sato, 1994; García Mesa et al., 1996; Jiménez et al., 2000; Bertrán et al., 2001; León et al., 2003; Muik et al., 2004).

Por otro lado, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una herramienta que se utiliza con frecuencia en el análisis de alimentos lipídicos, grasas y aceites (Rutledge et al., 1996). La técnica de RMN de baja resolución ha sido empleada desde hace bastante tiempo para la determinación de grasas sólidas en muestras, las curvas de punto de fusión de grasas semi-sólidas, o el porcentaje de grasa y agua en alimentos (Castiñeira, 1989). También la RMN de alta resolución se viene utilizando durante cierto tiempo en el control analítico de ali-

mentos grasos (Belton et al., 1996; Guillen y Ruiz, 2001; Mannina et al., 2002). En la industria oleaginosa se ha determinado el contenido de grasa y de agua en aceitunas mediante RMN de baja resolución a diversos niveles de resonancia (Romero Guzmán et al., 1983). También la RMN se ha utilizado para la detección de adulteraciones de aceites de oliva virgen con otros aceites de semillas (Vigli et al., 2003).

El objeto de este trabajo consiste en el estudio comparativo de dos métodos espectroscópicos (NIR y RMN) y el Método Oficial (basado en una extracción Soxhlet) para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas y orujo. Se aplicarán los dos métodos propuestos al análisis de muestras de distinta procedencia con vistas a probar su viabilidad y sus ventajas con respecto al Método Oficial.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las muestras

Las muestras de aceituna y orujo llegan al laboratorio en bolsas de plástico identificadas con un código de barras, y con una cantidad de 600 a 1000 gramos. Una vez registradas, las muestras de aceituna son molidas en su totalidad en un molino de martillos con eje de molienda vertical, interiormente de acero inoxidable y con alimentación automática por tornillo sin-fin. La primera fracción de la muestra durante la molienda es desechada, para arrastrar los restos de muestra anterior, recogiendo sobre 500 a 750 gramos en una bandeja de plástico.

Si se trata de muestras de orujo, no precisan molienda previa, tan solo homogeneización de la misma.

Una vez homogeneizada la muestra, pesamos sobre un trozo de film termorresistente previamente tarado, 25,00 0,50 gramos de muestra, depositando la misma sobre una bandeja rabanera de acero inoxidable.

2.2. Análisis por Espectroscopía NIR

Las muestras se analizaron empleando el equipo OliveScan (Foss, Hilleroed, Dinamarca). Es un espectrofotómetro que cubre un rango de longitudes de onda comprendido entre 850 a 1050 nm, proporcionando medidas en la zona visible, en modo transmitancia y con un rango de absorbancia de 1 a 5 AU. El equipo utiliza como fuente de energía una lámpara de wolframio y como sistema de detección la modalidad de silicio. La cubeta de muestra (8 mm alto x 140 mm diámetro externo x 90 mm diámetro interno) contiene un anillo soporte de aluminio y la base es de vidrio.

Con 25 gramos de pasta homogeneizada y pesada según se ha explicado anteriormente, se rellena

una cubeta para medida por NIR. Se registra la muestra en dicho equipo, se elige la calibración que usaremos (pasta de aceituna u orujo) y medimos por NIR. La medida se realiza con 16 submedidas o pulsos, presentando tras un minuto aproximadamente, en pantalla el contenido en grasa total y la humedad de dicha muestra.

2.3. Análisis por Espectroscopía de RMN

El espectrómetro de RMN Bruker, NMS 110C/125/40 RTA (Rheinstetten, Alemania) dispone de un imán permanente con campo magnético de 0,237 Tesla, con frecuencia de operación a 10 Mhz para ^1H , protegido de los cambios de temperatura ambiental por medio de un horno controlado a 40°C , con una precisión de $\pm 0,3^\circ\text{C}$ y una estabilidad de $0,01^\circ\text{C}$. Con detector mecánico de introducción de la muestra y sonda de alta sensibilidad para mediciones absolutas con tubos de muestra de 40 mm con capacidad equivalente a 40-50 gramos de muestra húmeda. El equipo también posee un preamplificador de señal.

El equipo también posee una unidad de control con generador de radiofrecuencia, un programador de pulsos, un receptor, un convertidor analógico digital, una unidad de control de procesos y un transmisor. Se utiliza una salida RS232 para la conexión al PC o a red existente para la comunicación de datos y control del minispec.

Las mediciones se realizan a través de pulsos de radiofrecuencia a 10 MHz con intervalo de 1 segundo entre pulsos. El tiempo de medición es de 5 segundos aproximadamente. El equipo incluye aplicación para la determinación del rendimiento graso en aceitunas, orujos y derivados.

Para el análisis de las muestras se pesan 25 gramos en un film termoresistente, se introducen en la estufa de secado por convección de aire forzado a 103°C durante toda la noche (aproximadamente 10-12 horas), se sacan de las estufa, se enfrían como mínimo 30 minutos y se realiza la pesada seca de la misma. Previamente, el equipo se ha calibrado, tanto para aceituna como para orujo, en el rango de trabajo del laboratorio. La medida por RMN se lleva a cabo en tres etapas: a) selección de la curva de medida, aceituna u orujo; b) indicación del peso húmedo de la muestra, y c) la muestra introducida en el tubo de medida se analiza en el equipo de RMN, y la medición la realiza a 6 pulsos (scans).

2.4. Métodos de referencia

La determinación de la humedad de las muestras se lleva a cabo mediante el método de secado en una estufa a 105°C para aceitunas (UNE-55-020-73) y orujo (UNE 55-031-73). Una porción de 25 gramos de muestra se deposita en una cápsula de

porcelana y se deseca en la estufa a 105°C durante 6 horas. Se enfría en el desecador se pesa y se lleva de nuevo a la estufa repitiendo estas operaciones hasta que entre dos pesadas consecutivas, la variación en la pérdida de peso de humedad y materias volátiles sea inferior a 0.02 g.

Por otro lado, para determinar el contenido graso total de las muestras tanto de aceituna como de orujo, referido a riqueza grasa húmeda a partir de los datos de humedad y riqueza grasa seca se utiliza el método de extracción de la grasa en Soxhlet con n-hexano para aceitunas (UNE 55030) y orujo (UNE 55-031-73). La muestra desecada, empleada en la determinación de la humedad, se introduce en el extractor Soxhlet y la extracción de la grasa con n-hexano, se lleva a cabo durante 4 horas aproximadamente. A continuación en la estufa a 105°C se eliminan las trazas de disolvente. Con la cantidad de aceite recuperado, se determina la riqueza grasa seca, y a partir de éste la riqueza de grasa húmeda.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Calibración de instrumentos

Calibración del instrumento de NIR

Para la calibración del NIR se tomaron 2000 muestras de pasta de aceituna procedentes de diferentes zonas de producción de España y Australia. En el caso de orujo se partió de 700 muestras procedentes principalmente de molinos que trabajan en dos fases y con diferente porción de hueso.

El rango de intervalo lineal para la pasta de aceituna estudiado estaba comprendido entre 10.7 y 37.8 % para contenido graso, y entre 22.4 y 69.1 % para humedad, empleando para su cálculo Redes neuronales Artificiales (ANA). Para el caso de orujo el rango era entre 0.9 y 9.3 % para contenido graso, y entre 53.2 y 79.9 % para humedad, aplicándose la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS). En ambos casos la evaluación de cada método de calibración se realizó mediante validación cruzada prediciendo el contenido en todas las muestras y comparando los resultados con los obtenidos mediante los métodos de referencia.

Calibración del instrumento de RNM

La calibración para la espectroscopía RMN se ha llevado a cabo pesando cantidades exactas de aceite de manera que los rangos de calibración lineal estén comprendidos entre 10.2 y 40.5 % y entre 2.1 y 6.4 % en contenido graso para aceituna y orujo, respectivamente. En el caso de la determinación de la humedad el rango de estudio ha sido (20.2– 70.9) % y (50.2-75.9) % para aceituna y orujo, respectiva-

Tabla 1
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas de la Sierra de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	24,58	47,15	24,68	47,02	24,33	47,35
V	6,84	3,33	7,28	3,09	6,40	3,85
t _{cal} ³	-	-	0,13	0,34	0,34	0,29
F _{cal} ⁴	-	-	1,06	1,07	1,07	1,16

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X = valor medio; V = varianza

³t_{cal} = test de Cochran; t_{tab} = 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab} = 1,71 (α = 0,05; 24, 1 cola)

⁴F_{cal} = test F de Fisher; F_{tab} = 1,98 (α = 0,05; 25,25, 1 cola)

mente. Los coeficientes de correlación (r) eran próximos a la unidad (0.992-0.999).

3.2. Estudio comparativo entre las distintas técnicas analíticas

Para este estudio se analizaron muestras de aceituna de distinta procedencia (campaña y sierra) y orujo. Cada muestra se analizó por triplicado mediante las tres técnicas (Soxhlet, espectroscopia NIR y RMN), siguiendo las metodología indicada en el apartado 2 (Material y Métodos) para la determinación de contenido graso y humedad en este tipo de muestras. Con vistas a tener un estudio comparativo más exhaustivo se analizaron 25 muestras de cada tipo de aceituna y orujo.

Con vistas a realizar una comparación de precisión de los tres métodos utilizados se utilizó el test F de Fisher (Valcárcel y Ríos, 1992) en el cual se comparan las varianzas de dos conjuntos de datos (F_{cal} = V₁/V₂, donde V₁ > V₂). Finalmente el resultado de F_{cal} se compara con el F tabulado (Miller y Miller, 2002). Si F_{cal} es menor F_{tab} se concluye que no existe una diferencia significativa entre los dos grupos de resultados (método NIR ó RMN y el método de referencia).

Para la comparación de la exactitud de los métodos propuestos en este trabajo (NIR Y RMN) con respecto al método de referencia (extracción con Soxhlet), se utiliza el test de Cochran (Valcárcel y Ríos, 1992), en el cual se calcula el valor de t de la siguiente manera:

$$t_{cal} = |X_1 - X_2| / [(V_1/n_1) + (V_2/n_2)]^{1/2}$$

(donde X₁ y X₂ son los valores medios de las medidas, V₁ y V₂ son las varianzas, y n₁ y n₂ es el número de determinaciones en cada grupo de resultados)

Finalmente el valor de t_{cal} se compara con el valor de t tabulado (Miller y Miller, 2002) y si es inferior el valor de t calculado, se deduce que no hay diferencias significativas entre las medias aritméticas de los análisis realizados por ambos métodos (método NIR ó RMN) y el método de referencia (extracción con Soxhlet).

Los resultados obtenidos para la comparación de los distintos métodos para el análisis de aceitunas (campaña y sierra) y orujo se resumen en las Tablas 1-3. Como se puede observar en todos los casos los valores de la F son inferiores al valor de F tabulado [F_{tab} = 1,98 (α = 0,05, 25,25, 1 cola)], por lo cual se demuestra que los métodos espectroscópicos NIR y RMN presentan precisiones del mismo orden que el método de referencia (extracción con Soxhlet). Por otro lado, los valores de t también son inferiores a los t tabulados [t_{tab} = 2,06 (α = 0,05, 24, 2 colas); t_{tab} = 1,71 (α = 0,05, 24, 1 cola)], demostrándose que los métodos espectroscópicos propuestos para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas y orujo son exactos para un nivel de significancia de α = 0,05.

Por otro lado, se han realizado las representaciones de Youden (Youden y Steiner, 1987) para la comparación de los resultados obtenidos por los métodos propuestos (NIR y RMN) del contenido graso y humedad para 25 muestras de aceitunas (sierra y campaña) y orujo, y los procedentes de la aplicación del método de referencia a las mismas muestras, respectivamente. En la Tabla 4 se incluyen los

Tabla 2
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en aceitunas de la Campiña de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	22,08	51,68	22,12	51,61	22,03	51,44
V	4,74	6,23	4,49	6,20	4,54	6,08
t _{cal} ³	-	-	0,07	0,11	0,08	0,34
F _{cal} ⁴	-	-	1,06	1,01	1,04	1,02

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X= valor medio; V= varianza

³t_{cal}= test de Cochran; t_{tab}= 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab}= 1,71 (α = 0,05; 24, 1 cola)

⁴F_{cal}= test F de Fisher; F_{tab}=1,98 (α = 0,05; 25,25, 1 cola)

Tabla 3
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN con el Método de Referencia para la determinación del contenido graso y humedad en orujo de Jaén

Parámetro ²	Método ¹					
	Soxhlet		NIR		RMN	
	% CG	% H	% CG	% H	% CG	% H
n	25	25	25	25	25	25
X	2,14	60,09	2,21	60,22	2,20	59,78
V	0,15	5,51	0,14	5,25	0,17	5,46
T _{cal} ³	-	-	0,64	0,19	0,53	0,47
F _{cal} ⁴	-	-	1,12	1,05	1,12	1,01

¹CG = contenido graso; H = humedad

²n = número de muestras analizadas; X= valor medio; V= varianza

³t_{cal}= test de Cochran; t_{tab}= 2,06 (α = 0,05; 24, 2 colas); t_{tab}= 1,71 (α = 0,05; 24, 1 cola)

⁴F_{cal}= test F de Fisher; F_{tab}=1,98 (α = 0,05; 25,25, 1 cola)

resultados de estas representaciones. Los valores del coeficiente de determinación múltiple (R^2) son 0.9198-0.9782 y 0.9228-0.9828 para los métodos espectroscópicos NIR y RMN, respectivamente. Las pendientes de las gráficas son próximas a la unidad en todos los casos (0.9408-1.0558). Como ejemplo, en la Figuras 1 y 2 se pueden observar las representaciones de Youden para la comparación de la determinación del contenido graso en muestras de

aceituna de sierra por NIR y el método estándar, y la determinación de la humedad en muestras de orujo por RMN y el método estándar, respectivamente.

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de la comparación de los métodos espectroscópicos NIR y RMN con el método de referencia se puede concluir que los pri-

Tabla 4
Resultados obtenidos de la comparación de los Métodos NIR y RMN y el Método de Referencia mediante la Representación de Youden.

Parámetro ¹	Aceituna Sierra ²				Aceituna Campiña ²				Orujo ²			
	% CG		% H		% CG		% H		% CG		% H	
	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN	NIR	RMN
CCM	0,9890	0,9838	0,9772	0,9814	0,9817	0,9880	0,9814	0,9913	0,9591	0,9606	0,9674	0,9848
CDR2	0,9782	0,9679	0,9548	0,9632	0,9638	0,9762	0,9631	0,9828	0,9198	0,9228	0,9359	0,9699
R2A	0,9773	0,9665	0,9529	0,9616	0,9622	0,9752	0,9614	0,9820	0,9163	0,9195	0,9331	0,9686
EE	0,3937	0,4791	0,3961	0,3574	0,4231	0,3429	0,4903	0,3350	0,1134	0,1112	0,6042	0,4157
n	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
a	-0,4026	0,9532	2,6199	-2,4737	1,0242	0,6827	1,0292	0,8385	0,2713	0,0256	3,4686	0,8632
b	1,0203	0,9510	0,9408	1,0558	0,9555	0,9669	0,9786	0,9792	0,9056	1,0160	0,9444	0,9805

¹CCM = coeficiente de correlación múltiple; CDR2 = coeficiente de determinación múltiple R²; R2A = R² ajustado; EE = error estándar; n = número de muestras; a = ordenada en el origen; b = pendiente
²CG = contenido graso; H = humedad

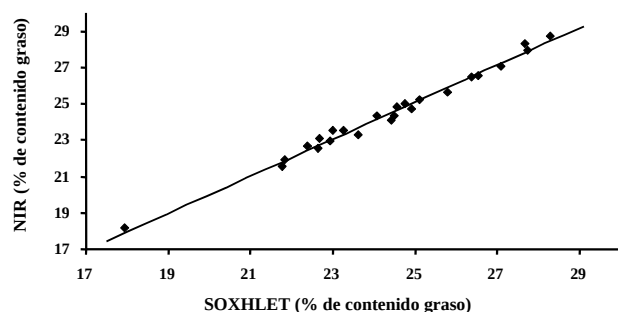


Figura 1

Comparación de los resultados obtenidos en la determinación del contenido graso en muestras de aceituna de sierra mediante el método de referencia (extracción con Soxhlet) y NIR.

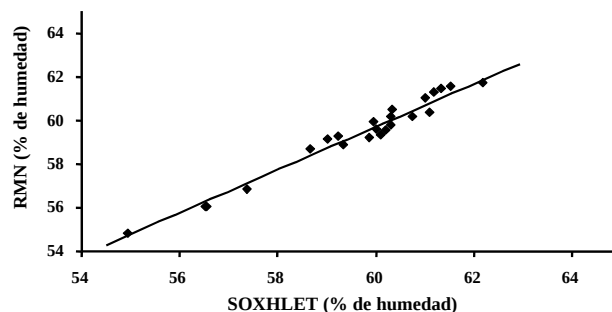


Figura 2

Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de la humedad en muestras de orujo mediante el método de referencia (extracción con Soxhlet) y RMN.

meros pueden usarse en el laboratorio para el control del contenido graso y humedad en muestras de aceituna y orujo. Estos métodos son más rápidos y menos laboriosos, por tanto son una buena solución para el análisis de un gran número de muestras, hecho muy demandado en los laboratorios de control de calidad de aceiteras. Con ello se demuestra la viabilidad de la metodología espectroscópica NIR y RMN para el análisis de rutina en los laboratorios de empresas dedicadas a la elaboración y distribución de aceite de oliva y derivados, independientemente del contenido graso y de humedad que posean las muestras analizadas.

También se ha realizado un estudio comparativo de dos tipos de muestras de aceituna procedentes de campiña y de sierra de la provincia de Jaén. En las muestras analizadas, el contenido graso es más elevado en la aceituna de sierra (Tablas 1-2) que en la aceituna procedente de campiña. En cambio, la humedad es superior en las muestras procedentes de la zona de campiña.

Del análisis en orujo (Tabla 3) se puede concluir que el contenido graso es pequeño, si se compara con el contenido en aceituna, siendo el contenido de humedad superior que al de la aceituna.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Universidad de Jaén por la ayuda ofrecida a través del Proyecto de Investigación propio de esta Universidad (Plan de Ayudas para el Fomento a la Investigación, UJA-2002).

BIBLIOGRAFÍA

Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1961). Cuerpos Grasos. Determinación del contenido en materia grasa total de la aceituna. Norma UNE 55030, Madrid, España.

- Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Humedad y materias volátiles (Método de la estufa de aire). Norma UNE 55-020-73, Madrid, España.
- Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Determinación de la humedad y materias volátiles en orujo de aceituna. Norma UNE 55-031-73, Madrid, España.
- Aenor, Asociación Española de Normalización y Certificación. (1973). Materias Grasas. Determinación del contenido en materia grasa total del orujo de aceituna. Norma UNE 55-032-73, Madrid, España.
- Belton, P. S., Delgadillo, I., Holmes E., Nicholls, A., Nicholson J. K. y Spraul, M. (1996). Use of high-field ^1H NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1483-1487.
- Bertran, E., Iturriaga, H., MasPOCH, S. y Montoliu, I. (2001). Effect of orthogonal signal correction on the determination compounds with very similar near infrared spectra. *Anal. Chim. Acta*, **431**, 303-311.
- Boskou, D. (1998). Historia y características del olivo en *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*, p. 13-24. Boskou, D. (Ed.). A. Madrid Vicente Ediciones y Mundi Prensa Libros S. A., Madrid.
- Castiñeira, M. (1989). La RMN de pulsos en industrias agroalimentarias. II. Aplicaciones. *Revist. Agroquim. Tecnol. Alim.*, **24**, 449-469.
- Civantos, C. (1999). Obtención del Aceite de Oliva. 2ª Edición. Editorial Agrícola Española, S. A., Madrid.
- Frias, L., García-Ortiz, A., Hermoso, M., Jiménez, A., Llaverro, M. P., Morales, J., Ruano, M. T. y Uceda, M. (1991). Analistas de Laboratorio de Almazara. Serie apuntes nº 6/1991. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla.
- García Mesa, J. A., Hermoso Fernández, M. y Cáceres Alonso, P. (1996). Determinación del contenido graso y la humedad en orujos de dos fases mediante infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*, **47**, 317-322.
- Guillen, M. D. y Cabo, N. (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J. Sci. Food Agric.*, **75**, 1-11.
- Guillen, M. D. y Ruiz, A. (2001). High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends Food Sci. Technol.*, **12**, 328-338.
- Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortiz, A., Morales, J., Frías, L. y Fernández, A. (1998). Elaboración de Aceite de Oliva de Calidad. Obtención por el Sistema de Dos Fases. Serie apuntes nº 61/1998.

- Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Jiménez, A., Izquierdo, E., Rodríguez, F., Dueñas, J. I. y Tortosa, C. (2000). Determinación de grasa y humedad en aceitunas mediante medidas de reflectancia en infrarrojo cercano. *Grasas y Aceites*, **51**, 311-315.
- Kiritsakis, A. K. (1991). El Aceite de Oliva. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid.
- Kmiecik, S., Meziane, S., Kadl, H. y Moussaoui, R. (1991). Oil extraction from olive foot cake with acid hexane. *Grasas y Aceites*, **42**, 46-50.
- León, L., Rallo, L. y Garrido, A. (2003). Análisis de aceituna intacta mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS): una herramienta de utilidad en programas de mejora del olivo. *Grasas y Aceites*, **54**, 41-47.
- Mannina, L. y Segre, A. (2002). High Resolution Nuclear Magnetic Resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites*, **53**, 22-33.
- Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice-Hall, Madrid.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., Pérez-Villarejo, L. y Ayora-Cañada, M. J. (2004). Determination of oil and water content in olive pomace using near infrared and Raman spectrometry. A comparative study. *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 35-41.
- Osborne, B. G. (1993). Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis, 2nd Ed. Wiley, New York.
- Romero Guzmán, F. y Gracian Tous, J. (1983). Aplicación de la resonancia magnética nuclear a la determinación de la riqueza grasa en oleaginosos. III. Aceitunas: factores que afectan a la respuesta del agua. *Grasas y Aceites*, **34**, 249-252.
- Rutledge, D. N. y Tome, D. (1996). Nuclear magnetic resonance NMR en *Analytical Techniques for Food and Agricultural Products*, Linden, G (Ed.), p 249-167. VCH Publisher Inc., New York.
- Sato, T. (1994). Application of principal-component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable-oils for their classification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 293-298.
- Valcárcel, M. y Ríos, A. (1992). La Calidad en los Laboratorios Analíticos, Capítulo II y III. Reverté, Barcelona.
- Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A. y Dais, P. (2003). Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5715-5722.
- Youden, W. J. y Steiner, E. H. (1987). Statistical Manual of the AOAC. 5^a Edición. AOAC Publisher, Arlington.

Recibido: Octubre 2004
Aceptado: Marzo 2005