

Estudio de la efectividad de las columnas de extracción de octadecilo C_{18} en la evaluación del amargor (K_{225}) del aceite de oliva virgen. Error y esquema analítico del método de valoración

Por F. Gutiérrez Rosales y S. Perdiguero Camacho
Instituto de la Grasa y sus Derivados
Avda. Padre García Tejero, 4
41012-Sevilla

RESUMEN

Estudio de la efectividad de las columnas de extracción de octadecilo C_{18} en la evaluación del amargor (K_{225}) del aceite de oliva virgen. Error y esquema analítico del método de evaluación.

El presente trabajo ha perseguido dos objetivos fundamentales: 1) estudiar la posibilidad de utilizar repetidamente las columnas "disposable" (de un sólo uso) C_{18} y 2) determinar el error y esquema analítico apropiado del método de evaluación del amargor del aceite de oliva virgen.

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que las recuperaciones de los productos responsables del amargor del aceite no disminuyen al reutilizarse las columnas al menos durante las diez utilizaciones probadas. Se han determinado los errores del método de evaluación del amargor para determinar su precisión. Los límites de confianza calculados para definir los esquemas de trabajo han dado suficiente precisión.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de oliva - Amargor - Columna de extracción - Error experimental - Método analítico.

SUMMARY

Study of effectiveness of octadecyl C_{18} extraction columns in the evaluation of the bitter taste (K_{225}) in virgin olive oil. Error and analytical scheme of method the evaluation.

The present study developed two objectives: 1) to study the possibility of repeatedly using disposable C_{18} columns 2) to determine an appropriate analytical scheme and the inherent systematic error in the method to evaluate bitter substances in virgin olive oil.

The results confirmed that we were able to recover the principles of olive oil without reducing the effectiveness of the C_{18} columns with repeated uses at least ten times. The evaluation method errors of the bitter taste have been determined, in order to determine its precision. The confidence limits calculated for defined work schemes have given sufficient precision.

KEY-WORDS: Analytical method - Bitterness - Experimental error - Extraction column - Olive oil.

1. INTRODUCCION

El gusto amargo intenso de los aceites va creando cada vez mayores problemas en todas las áreas oleícolas; por ello y dado el interés del tema se han desarrollado en este Instituto dos métodos para su evaluación, (Gutiérrez F. et al 1989) y (Gutiérrez F. et al 1992). Ambos métodos tienen de común la obtención de un extracto amargo mediante el empleo de columnas de extrac-

ción de un sólo uso octadecilo C_{18} , que resultan muy caras. Por ello, se ha creído de interés, siendo el primer objetivo del presente trabajo, estudiar si su poder de absorción y desorción, es decir su efectividad, se mantiene suficiente constante y pueden reutilizarse o si, por el contrario, disminuyen con el uso y no es aconsejable su posterior utilización. Calcular el error del método de evaluación del amargor por medida de la absorbancia a 225 nm y fijar el esquema óptimo de trabajo, segundo de los objetivos, se considera también de interés pues además de determinar la precisión del mismo nos permite poder rechazar valores anormales.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material y reactivos

Se ha utilizado un aceite de oliva virgen de intensidad de amargor 3,1, determinada por el panel analítico del Instituto de la Grasa utilizando una escala estructurada de 5 puntos (0=no percepción, 5= percepción extrema), del que se han obtenido 50 extractos mediante cinco columnas (6 ml) de extracción octadecilo C_{18} de J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, N.J.), que se han utilizado diez veces cada una, sometiéndolas entre paso y paso al proceso de activación con metanol (Gutiérrez F. et al 1992). Espectrofotómetro de doble haz HP 8450A, equipado con Plotter HP 7225A. Reactivos, calidad para análisis.

2.2. Procedimiento de extracción de los componentes amargos

Una muestra de $1,0 \pm 0,01$ gr de aceite de oliva virgen se disuelve en 4 ml de hexano y se pasa por la columna octadecilo (previa activación de ésta con metanol y lavada con hexano). Después de la elución se pasan 10 ml de hexano para eliminar totalmente la grasa y finalmente los compuestos retenidos son eluidos con metanol: agua (1:1) hasta 25 ml en matraz aforado.

2.3. Evaluación del extracto

Al extracto obtenido se le mide su absorbancia a 225 nm frente a metanol agua 1:1 en cubeta de 1 cm.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Reutilización de las columnas

Un hecho que se había observado en experiencias anteriores es que, en algunas ocasiones, las columnas presentaban un comportamiento anormal, unas veces fácilmente detectable durante el proceso por un comportamiento extraño de difusión de la muestra en la columna y otras veces, menos patente, pero que se manifestaba después en una baja absorbancia del extracto recuperado, sin que se haya/h podido aún establecer la/s causa/s de este especial comportamiento.

En la Tabla I se recogen los resultados obtenidos. En una primera observación de los valores, aparece como

claramente anormal el obtenido en la columna A en su primera utilización, lo que se había previsto por el comportamiento de la misma a lo largo del primer ensayo, a pesar de lo cual se continuó utilizando hasta el décimo ensayo. Pueden observarse también, otros valores aparentemente bajos, cuya anomalía debe comprobarse para excluirlos o no, en el posterior análisis de los resultados. Como primer paso para esta comprobación se ha realizado una representación gráfica en curva de frecuencia del conjunto de datos, que presenta la forma de campana de una distribución normal, pero en la que algunos puntos tienen absorbancias excesivamente bajas, quedando evidentemente fuera de la población a la que pertenecen las demás, señal del comportamiento anormal citado. Para su eliminación se ha escogido como criterio el que la probabilidad de haberse dado tan bajos por azar, perteneciendo a la población de los restantes, fuese menor del 0,001 (1%). Con este criterio se rechazaron como anormales los cuatro valores siguientes: 0,152, 0,237, 0,255 y 0,263, los dos primeros de la columna A y los otros dos de las columnas D y E respectivamente.

TABLA I

Valores obtenidos del $K_{225} E_{cm}$ 1%

Columnas

n	A	B	C	D	E
1	0,152	0,305	0,307	0,314	0,290
2	0,291	0,288	0,288	0,302	0,293
3	0,295	0,314	0,304	0,301	0,309
4	0,293	0,296	0,294	0,300	0,309
5	0,303	0,297	0,298	0,255	0,299
6	0,297	0,271	0,288	0,303	0,306
7	0,295	0,298	0,296	0,290	0,311
8	0,317	0,310	0,313	0,315	0,306
9	0,237	0,293	0,303	0,315	0,285
10	0,308	0,299	0,306	0,316	0,263

n = n.º de reutilizaciones.

Una vez eliminados estos valores anormales, se ha estudiado la posibilidad de reutilizar las columnas, objetivo fundamental de esta faceta del trabajo. Para poder aceptar la reutilización se han establecido tres exigencias o requisitos:

1. Que los valores obtenidos en el reuso de las columnas pertenezcan a la población de los obtenidos al emplearlas por primera vez.

2. Que la dispersión de los resultados en la reutilización de las columnas no difiera significativamente de los de un primer uso, pues de ser mayor supondría una confianza menor en los mismos.

3. Que no exista una tendencia significativa en la variación de los resultados con el número de reutilizaciones, pues lo contrario indicaría una progresiva disminución de la efectividad, bien por pérdida del poder de absorción o desorción de la columna (tendencia a valores cada vez más bajos).

Para el primer requisito se calculan la media y la desviación típica de los valores obtenidos, eliminando el de la columna A, en el primer uso. Los resultados obtenidos son 0,304 y 0,0101 respectivamente. Del conjunto de resultados, sólo uno de los conservados 0,271, de haber sido la única determinación hecha, ten-

dría una probabilidad de pertenecer a la población ligerísimamente inferior al 5%, pero al haberse hecho 42 determinaciones, la probabilidad será mucho mayor y no hay razón para afirmar que no pertenezca a la misma población.

Para comparar las dispersiones de los resultados se han calculado las varianzas de las mismas, Tabla II, obtenidas en un primer uso y en las reutilizaciones sucesivas de las distintas columnas una vez eliminados los valores anormales.

TABLA II
Estimación de las varianzas

Columnas

B, C, D, E		A		B		C		D		E	
$\frac{n}{1}$	$\frac{\phi}{3}$	$\frac{n}{8}$	$\frac{\phi}{7}$	$\frac{n}{9}$	$\frac{\phi}{8}$	$\frac{n}{9}$	$\frac{\phi}{8}$	$\frac{n}{8}$	$\frac{\phi}{7}$	$\frac{n}{8}$	$\frac{\phi}{7}$
s^2_{n-1}		1,0201.10 ⁻⁴	1,3398.10 ⁻⁴	1,5394.10 ⁻⁴	1,5036.10 ⁻⁴	8,5643.10 ⁻⁴	8,4214.10 ⁻⁴				

$n = n.^{\circ}$ de replicados
 $\phi =$ grados de libertad

Aplicada la prueba F se concluye que no hay diferencia entre la varianza de los resultados de un primer uso y las de los varios usos.

No hay motivos para suponer que aún existiendo una tendencia a que las recuperaciones de los productos responsables del amargor y por tanto las absorbancias, disminuyan o aumenten en las sucesivas reutilizaciones las disminuciones o aumentos han de seguir una función lineal. Por ello, para estudiar esa posible tendencia se ha empleado el coeficiente de correlación de Spearman (O'Mahony M. 1986) (Calvo F. 1978). La correlación se ha ensayado en cada una de las columnas, considerando como variable, X, los órdenes de las sucesivas reutilizaciones y como variable, Y, los órdenes de las correspondientes absorbancias, habiendo eliminado previamente los resultados anormales. En todos los casos el valor de P calculado es inferior al tabulado para un nivel de probabilidad del 5%, lo que indica que no hay correlación entre los órdenes de las reutilizaciones y los de las absorbancias, que es tanto como afirmar que estas absorbancias y, por tanto, las recuperaciones de los productos responsables del amargor, ni disminuyen ni aumentan de forma sistemática al reusarse las columnas, si ellas son regeneradas convenientemente, al menos durante las diez utilidades probadas.

radas convenientemente, al menos durante las diez utilidades probadas.

3.2. Determinación de los errores analíticos y elección del esquema óptimo de trabajo

A la vista de los resultados comentados en el apartado 3.1, ha parecido de interés estudiar la influencia que la utilización de diversas columnas y los repetidos usos de las mismas tienen sobre los resultados obtenidos, con objeto de escoger un sistema económico de trabajo con un error final aceptable y de fijar un criterio que permita rechazar los resultados procedentes de comportamientos anómalos de las columnas.

Se ha realizado un análisis de la varianza considerando los ensayos enmarcados en un diseño factorial no balanceado de clasificación jerárquica con dos causas aleatorias de variación, las columnas y los usos de las mismas (replicados) (Davies, O.L. 1956) (Ruiz Maya, L. 1983).

En la Tabla III se recogen los resultados de dicho análisis. Con estos valores pueden calcularse los errores típicos y los límites de confianza de las medias obtenidas para diferentes esquemas de trabajo, Tabla IV.

TABLA III
Análisis de la varianza y varianzas estimadas

CV	G.L.	SC	C.M.	Significación
Entre columnas	4	0,0004965	1,24125.10 ⁻⁴	$s^2_o + 9,185s^2_c$
Entre utilidades	41	0,0049393	1,20471.10 ⁻⁴	s^2_o
Total	45	0,0054358		

$$s^2_o = 1,205.10^{-4}$$

$$s^2_c = 4,0.10^{-6}$$

TABLA IV
Precisión del método: límite de confianza de las medias

$$s_c^2 = 4,0 \cdot 10^{-6} \quad t_{\frac{\alpha}{2}} = 37 \quad s_{\bar{x}}^2 = \frac{s_c^2}{c} + \frac{s_o^2}{cn}$$

$$s_o^2 = 1,205 \cdot 10^{-4} \quad 5\% = 2,027$$

s	n	cn	$s_{\bar{x}}^2$	$s_{\bar{x}}$	Límites de confianza 95%
1	1	1	$1,24500 \cdot 10^{-4}$	$1,116 \cdot 10^{-2}$	$\bar{x} \pm 0,023$
	2	2	$0,64250 \cdot 10^{-4}$	$0,802 \cdot 10^{-2}$	0,016
	3	3	$0,44167 \cdot 10^{-4}$	$0,665 \cdot 10^{-2}$	0,013
	4	4	$0,34125 \cdot 10^{-4}$	$0,584 \cdot 10^{-2}$	0,012
	5	5	$0,28100 \cdot 10^{-4}$	$0,530 \cdot 10^{-2}$	0,011
	6	6	$0,24083 \cdot 10^{-4}$	$0,491 \cdot 10^{-2}$	0,010
2	1	2	$0,62250 \cdot 10^{-4}$	$0,789 \cdot 10^{-2}$	0,016
	2	4	$0,33125 \cdot 10^{-4}$	$0,567 \cdot 10^{-2}$	0,011
	3	6	$0,22083 \cdot 10^{-4}$	$0,470 \cdot 10^{-2}$	0,010
3	1	3	$0,41500 \cdot 10^{-4}$	$0,644 \cdot 10^{-2}$	0,013
	2	6	$0,21417 \cdot 10^{-4}$	$0,463 \cdot 10^{-2}$	0,009

Como cabía esperar, por el hecho de ser la varianza entre columnas treinta veces menor que la varianza entre reutilizaciones, y por tanto, ser insignificante en la expresión que da $s_{\bar{x}}^2$ el primer sumando frente al segundo, es al aumentar el número de utilizaciones lo que hace únicamente disminuir el error de la medida. Obsérvense los valores, prácticamente iguales, en el caso de 6 análisis en total (bien 1 columna y 6 utilizaciones, 2 columnas y 3 utilizaciones de cada una o 3 columnas y 2 utilizaciones), del error típico de la media y, por tanto, de los límites de confianza.

Puesto que hacer un sólo análisis llevaría consigo el no poderse poner de manifiesto un comportamiento anormal de la columna, a no ser que fuera claramente visible por su aspecto, se estima necesario hacer, al menos, dos análisis, bien duplicado sobre la misma columna, tras su regeneración o mejor lógicamente sobre dos columnas simultáneamente. De esta manera al compararse los resultados individuales puede apreciarse un comportamiento anómalo, si lo hubiera, y repetir un análisis más y, además rebajar apreciablemente los límites de confianza del valor medio (de 0,023 a 0,016). El hacer triplicado supone disminuir aún más dichos límites (a 0,013) y el poder utilizar sólo dos de los resultados si uno de ellos fuese anormal.

Es interesante, también, el disponer de un criterio, previamente establecido que permita detectar la existencia de un valor anormal y poder eliminarlo. Este criterio se basa en la diferencia máxima, que a una probabilidad dada, se podría esperar por azar entre dos análisis efectuados en una misma muestra. Dando por supuesto que los replicados van a proceder de columnas diferentes, se tomará como desviación típica de los mismos, el valor $1,116 \cdot 10^{-2}$, obtenido haciendo intervenir no sólo el error procedente de haber hecho varios análisis (s_o) sino el haber trabajado con más de una columna (s_c) con 37

grados de libertad. Para el caso de determinaciones duplicadas, el criterio se tomará del test de Student y será que la diferencia máxima entre los dos valores deberá ser menor que $t_{(0,05)} \sqrt{2s} = 0,032$.

En el caso de triplicados se compara la diferencia entre los valores extremos con la máxima que podría esperarse por azar y en caso de ser igual o mayor se elimina el que más se separa de la media de los tres y si los dos restantes cumplen el requisito de los duplicados se toma la media de ellos. Para triplicados se estima más apropiado utilizar el fundamento del test de Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar el criterio de detección de anomalía, estableciéndose, en este caso que la diferencia máxima deberá ser menor que q_p , siendo q_p el valor de la "tabla de recorrido studentizado" para tres muestras comparadas y 37 grados de libertad. Al nivel del 5% $q_p = 3,45$, saliendo, pues, dicha diferencia 0,039.

BIBLIOGRAFIA

- Calvo, F. (1978).- "Estadística aplicada".- Ediciones Deusto, S.A. Bilbao.
 Davies, O.L. (1960).- "Métodos Estadísticos Aplicados a la Investigación y a la Producción".- Aguilar. Madrid.
 Gutiérrez, F., Albi, M.A., Palma, R., Ríos, J.J. and Olías, J.M. (1989).- "Bitter Taste of Virgin Olive Oil: Correlation of Sensory Evaluation and Instrumental HPLC Analysis".- J. Food Sci. 54, 68-70.
 Gutiérrez, F., Perdiguero, S., Gutiérrez, R. and Olías, J.M. (1992).- "Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil".- J. Am. Oil Chemists' Soc. 69, 394-395.
 O'Mahony, M. (1986).- "Sensory Evaluation of Food".- Marcel Dekker, New York.
 Ruiz Maya, L. (1983).- "Métodos Estadísticos de Investigación".- Instituto Nacional de Estadística. Madrid.

(Recibido: Septiembre 1991)